

UCH-FC
MAG-EBE
F 634
C.I



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Postgrado. Programa de Magíster
Departamento de Ecología Evolutiva



**DETECTANDO CAUSAS DE ASOCIACION FENOTIPO-FITNESS
EN UNA ESPECIE AUTOCOMPATIBLE: SELECCIÓN,
ALOMETRÍA Y ERROR ESTADISTICO TIPO I**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y
Biología Evolutiva

POR

MA. FRANCISCA FLORES SAAVEDRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RODRIGO MEDEL C.

CO-DIRECTORA: DRA. CAREZZA BOTTO

Santiago, Chile

2013



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Postgrado. Programa de Magíster
Departamento de Ecología Evolutiva

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

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

MARÍA FRANCISCA FLORES SAAVEDRA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de junio de 2013.

Directores de tesis:

Dr. Rodrigo Medel

Dra. Carezza Botto

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Mary Kalin Arroyo

Dra. Fernanda Pérez



M. R. / Karol de G. /

A Joaquín, mi felicidad.



María Francisca Flores Saavedra, nació en Santiago de Chile el día 08 de abril de 1982. Sus estudios secundarios los terminó en el Liceo Juana de Ibarbourou, ingresando en el año 2000 a estudiar Pedagogía en Biología en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. Es en el Instituto de Entomología, donde conoce al Dr. Daniel Frías quien la aproxima hacia la investigación científica enfocada en las interacciones insecto – hospedero. En el año 2009 decide ingresar al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile y, siguiendo sus intereses en las asociaciones entre plantas y polinizadores, se incorpora al laboratorio de Ecología y Biología Evolutiva realizando su tesis con el Dr. Rodrigo Medel. Terminando hoy esta etapa en su vida pretende continuar perfeccionándose, postulando próximamente al programa de Doctorado en Ciencias en la misma institución.

AGRADECIMIENTOS

A mi gran familia por su cariño y apoyo incondicional, especialmente a mi abuela, mi tía Yolanda, mi primo Rodrigo y mi hermana quien me dio dos hermosos sobrinos que alegran mi vida. A Jose porque me equilibra y entrega lo necesario para fortalecer y llevar a cabo mis proyectos de vida. Al profesor Dr. Daniel Frías quien me motivó a dedicarme a la investigación científica y a quien tengo un gran cariño y respeto. A mis tutores de tesis Dr. Rodrigo Medel y Dra. Carezza Botto por la entrega de sus conocimientos, dedicación y preocupación en el desarrollo de este trabajo. A mis compañeras de laboratorio Carmen Gloria y Maureen Murúa por su ayuda en terreno y en estadística siempre con la mejor disposición. A Mariza Quijón y Viviana Órdenes por su gran amistad. Y a mi querida Pelu que siempre me acompañó en las largas jornadas de estudio hasta altas horas de la noche.

Especialmente agradezco el financiamiento para el desarrollo de esta tesis otorgado por los proyectos: Anillo ACT34-2006, FONDECYT 1120155, SECYT 2003068.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
INTRODUCCION	- 1 -
OBJETIVOS	- 5 -
<i>Objetivo general</i>	- 5 -
<i>Objetivos específicos</i>	- 5 -
HIPÓTESIS	- 6 -
METODOLOGÍA	- 7 -
<i>Historia natural de Oenothera affinis</i>	- 7 -
<i>Sitio de estudio</i>	- 7 -
<i>Muestreo de polinizadores</i>	- 9 -
<i>Potencial dicogamia y hercogamia</i>	- 9 -
<i>Morfología floral de Oenothera affinis</i>	- 10 -
<i>Producción de gametos</i>	- 10 -
<i>Matriz de correlación- covarianza entre caracteres florales y las medidas reproductivas</i> ...	- 11 -
<i>Sistema reproductivo</i>	- 11 -
<i>Éxito reproductivo</i>	- 12 -
<i>Calidad de frutos</i>	- 12 -
<i>Características reproductivas</i>	- 15 -
<i>Eficacia reproductiva (fitness relativo)</i>	- 15 -
<i>Estudio de selección fenotípica</i>	- 16 -
<i>Análisis de vías y modelos de ecuaciones estructurales (SEM)</i>	- 18 -
RESULTADOS	- 20 -
<i>Características de la población de estudio</i>	- 20 -
<i>Ausencia de polinizadores</i>	- 21 -
<i>Sistema reproductivo</i>	- 21 -
<i>Variabilidad floral y características reproductivas</i>	- 25 -
<i>Correlación de los caracteres morfológicos</i>	- 27 -
<i>Coefficientes de selección</i>	- 28 -
<i>Análisis de ecuaciones estructurales</i>	- 30 -
DISCUSION	- 34 -
CONCLUSIONES	- 38 -
REFERENCIAS	- 39 -
ANEXOS	- 42 -

ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1.** FRUTOS OBTENIDOS EN RELACIÓN AL NÚMERO DE FLORES TRATADAS, PORCENTAJE DE FRUCTIFICACIÓN Y PROMEDIO DE SEMILLAS/ FLORES CRUZADAS DE *O. AFFINIS* PARA CADA TRATAMIENTO DE POLINIZACIÓN..... - 23 -
- TABLA 2.** PRUEBA DE TUKEY – KRAMER PARA LA COMPARACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS/CANTIDAD DE FLORES CRUZADAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS..... - 23 -
- TABLA 3.** ESTADÍSTICOS CORRESPONDIENTES A LOS CARACTERES FLORALES (MEDIA ± DE) EXAMINADOS EN *O. AFFINIS* EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. N = 100 FLORES A RAZÓN UNA FLOR/PLANTA..... - 26 -
- TABLA 4.** VALORES PROMEDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE *O. AFFINIS*. N = 100 FLORES A RAZÓN UNA FLOR/PLANTA..... - 26 -
- TABLA 5.** MATRIZ DE CORRELACIÓN SOBRE LA DIAGONAL, Y MATRIZ DE COVARIANZA BAJO LA DIAGONAL PARA LOS CARACTERES FENOTÍPICOS DE LA FLOR Y LA PRODUCCIÓN DE GAMETOS. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001..... - 27 -
- TABLA 6.** DIFERENCIALES DE SELECCIÓN Y COEFICIENTES DE SELECCIÓN FENOTÍPICA EN RASGOS DE LA POBLACIÓN DE *O. AFFINIS*. SE PRESENTAN LOS RESULTADOS DE LOS DOS MODELOS ESTUDIADOS..... - 29 -
- TABLA 7.** DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS DE ECUACIONES ESTRUCTURALES ALTERNATIVOS PARA LA POBLACIÓN DE *O. AFFINIS*..... - 32 -
- TABLA 8.** VALORES DE SIGNIFICANCIA DE LOS MODELOS ANALIZADOS PARA ESTRUCTURA CAUSAL DE EFECTOS SOBRE EL FITNESS EN LA POBLACIÓN DE *O. AFFINIS*..... - 32 -

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** FLOR DE *O. AFFINIS* EN UNA POBLACIÓN ARGENTINA POLINIZADA POR *MANDUCA SEXTA* (SPHINGIDAE). - 8 -
- FIGURA 2.** PANORÁMICA DEL SITIO DE ESTUDIO MAITENCILLO (32°40'35.8"S, 71°26'10" W, 45MSNM) EN LA V REGIÓN DE VALPARAÍSO. - 8 -
- FIGURA 3.** A LA IZQUIERDA FLORES ANTES DE LA ANTESIS, APROXIMADAMENTE A LAS 19:00 HORAS. A LA DERECHA, BOTONES DE LAS FLORES EMBOLSADAS AL INICIO DEL TRATAMIENTO PARA FALLA DE POLINIZADORES. - 13 -
- FIGURA 4.** ATRIBUTOS FLORALES DE *O. AFFINIS*. FOTOGRAFÍA LATERAL DEL TUBO FLORAL SIN LOS PÉTALOS Y FOTOGRAFÍA FRONTAL DE LA COROLA. - 14 -
- FIGURA 5.** GRANO DE POLEN DE *O. AFFINIS* (298,2 X 291,8 μ M). - 14 -
- FIGURA 6.** FLORES DE *O. AFFINIS*. A LA IZQUIERDA SE PRESENTA EL ESTIGMA AÚN NO RECEPTIVO CUANDO LA FLOR SE ENCUENTRA AÚN ENCAPSULADA. A LA DERECHA, EL ESTIGMA RECEPTIVO SE PRESENTA ALEJADO DE LAS ANTERAS AL MOMENTO DE LA ANTESIS. - 20 -
- FIGURA 7.** EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS FRUTOS OBTENIDOS EN CADA TRATAMIENTO. A.- PROMEDIO DE SEMILLAS OBTENIDAS POR FRUTO \pm EE; B.- PROPORCIÓN DE SEMILLAS ABORTADAS EN EL FRUTO \pm EE. - 24 -
- FIGURA 8.** ESTIMACIÓN NO PARAMÉTRICA DE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA EN RELACIÓN AL TUBO FLORAL. SPLINE CÚBICO ESTIMADO PARA EL NÚMERO DE SEMILLAS POR INDIVIDUO DE *O. AFFINIS* EN RELACIÓN CON LOS DESCRIPTORES DE TAMAÑOS DE LA FLOR ($\lambda = 1$). LOS DESCRIPTORES ESTÁN EXPRESADOS EN UNIDADES DE DESVIACIÓN ESTÁNDAR (VER SCHLUTER 1988). - 30 -
- FIGURA 9.** MODELO 5 DE ESTRUCTURA CAUSAL DE LA POBLACIÓN DE *O. AFFINIS* MAITENCILLO. LOS ASTERISCOS REPRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN LOS SIGUIENTES NIVELES *** $P < 0.001$; * $P < 0.05$. LAS LÍNEAS PUNTEADAS INDICAN EFECTOS NEGATIVOS. - 33 -



RESUMEN

La alometría se refiere a las relaciones entre las dimensiones estructurales de los organismos y su tamaño general. En este trabajo se examinaron las asociaciones entre la morfología floral y la adecuación biológica relativa en una población de *Oenothera affinis* (Onagraceae), una hierba anual de pequeñas flores amarillas ubicada en la V Región de Chile. Previos análisis en el sitio de estudio la han caracterizado como una población desprovista de polinizadores, autofecundable, autocompatible y con una importante fuerza de selección para el incremento en la longitud del tubo floral. Estos antecedentes permitieron proponer que un mayor desempeño reproductivo de las plantas de *O. affinis* con tubos florales largos tendría un efecto ligado al tamaño de los órganos reproductivos y la producción de gametos más que a efectos selectivos. Esta parsimoniosa explicación se avala indirectamente por varias publicaciones que han demostrado que el tamaño de la flor con la producción de polen y óvulos se correlaciona positivamente, y aumentos en las dimensiones florales suelen vincularse con una mayor asignación de recursos a los órganos reproductivos.

Por lo tanto, ¿es la alometría un factor generador de covarianza fenotipo-*fitness* en plantas autocompatibles?. Para responder esta pregunta, primero se midieron seis caracteres florales y la producción de gametos masculinos y femeninos, luego se realizó una prueba de polinización confirmando un alto índice de autofecundación y autocompatibilidad, para determinar algunas características de la biología reproductiva se determinó la relación polen/óvulo, semillas/óvulo, carga polínica y proporción de semillas abortadas. Finalmente, se determinaron las vías causales en la red de interacciones e identificar el modelo más apropiado que diera cuenta de la estructura de covariación de los datos morfológicos y reproductivos de los organismos y su aporte a la adecuación relativa.

Los resultados indicaron un coeficiente de selección direccional significativo para la longitud del tubo floral. Sin embargo, al aplicar un modelo de ecuaciones estructurales se determinó que este factor corresponde a un efecto indirecto asociado al

tamaño del tubo en conjunto con el tamaño del ovario y la producción de óvulos, siendo ésta una vía causal significativa en la producción de semillas.

Las conclusiones de este estudio indican que probablemente debido a que una de las consecuencias de la autofecundación es aumentar la plasticidad fenotípica de las estructuras florales para asegurar la producción de semillas, los efectos alométricos pueden confundir las estimaciones de selección en especies autocompatibles, ya sea sobre-estimando los coeficientes, o aumentando la probabilidad de error de tipo I, es decir la probabilidad de detectar selección estadísticamente significativa cuando ésta no existe.

ABSTRACT

Allometry is the association between the dimensional structure of an organism with body size. In this work, the relationship between the floral morphology and fitness of a population of *Oenothera affinis* located in the V Region of Chile was examined. Previous analyses in the study site revealed that the population is devoid of pollinators, presents self-compatibility and autonomous pollination in a large extent. Likewise, a strong gradient of directional selection for increasing tube length was detected. This result suggested that factors unrelated to pollination might account for the observed pattern. In this study, the potential influence of allometric factors on within population fitness variation was examined. More specifically, it is hypothesized that association trait-fitness may occur by simple allometric reasons unrelated to pollinator-mediated selection. To test the allometric hypothesis (AH), we first examined the failure of pollinators, which confirmed a high rate of self-fertilization, and assessed the functional relationship of gamete production with flower size. Estimation of the causal routes in the set of floral characters with fitness permitted identification of the most parsimonious model to understand the covariance structure of morphological and reproductive data in their contribution to fitness. Similar to a previous study, results revealed a significant directional selection for floral tube length. However, the structural model indicate this association emerges from an allometric relationship between anther size and seed production. As pollinators were largely absent in this population, the selective scenario could not be invoked to account for the phenotype-fitness covariation and allometric factors seemed to be relevant. In consequence, allometric associations may confound estimates of pollinator-mediated selection in natural populations, especially in self-compatible plant populations. Unless allometric effects are explicitly included in selection analyses, estimations run the risk of overestimate coefficients, or increase the chance of type-I error, that is the chance of detecting selection when it does not occur. Probably due to the fact that one of the consequences of self-fertilization is increase the phenotypic plasticity of floral structures to ensure the production of seeds in disturbed environments.

INTRODUCCION

La forma, el tamaño y el número de flores son rasgos importantes para dar cuenta de la diversificación morfológica en plantas angiospermas (Worley y Barrett 2000; Galen y Cuba 2001). Un amplio registro de trabajos publicados entre los años 1989 y 2007 ha documentado 732 instancias que vinculan los cambios en la estructura floral a algún agente selectivo externo a la población de interés (Anexo 1). Aunque una covariación rasgo-*fitness* puede reflejar selección ejercida por polinizadores, tal covarianza puede, en principio, también surgir por otras causas (Rausher 1992; Mauricio y Mojonier 1997). Un factor que, para nuestro conocimiento, no ha recibido suficiente atención en los estudios evolutivos es aquel referido a la alometría de las flores. El concepto de alometría se basa en la fórmula algebraica de crecimiento alométrico descrito por Huxley y Teissier (1936) en el cual los autores proponen la ecuación:

$$y = bx^k$$

Donde y es la magnitud de crecimiento de un rasgo, x es una medida del tamaño total, b es la pendiente de la línea de regresión entre ambas variables, y k es una constante de la tasa de crecimiento. Desde un punto de vista estadístico, b representa el valor promedio de y/x de los individuos observados. Se habla de isometría cuando $b = 1$, de alometría positiva cuando $b > 1$ y de alometría negativa cuando $b < 1$.

Para comprender mejor el significado, Gould (1966) diferencia cuatro nociones de alometría: (1) alometría ontogenética, relativo al crecimiento individual; (2) alometría filogenética, referido a la tasa de crecimiento de los linajes; (3) alometría intraespecífica, alusivo a individuos adultos dentro de una especie o una población; (4) alometría interespecífica, referida a la misma clase de fenómeno, pero entre especies relacionadas. El concepto utilizado en el presente estudio corresponde a la alometría intraespecífica, alusivo a la relación entre cambios de las dimensiones de algunas partes de un organismo y su tamaño total dentro de una población (Levinton 1988).

Para ser aplicada a la estructura floral se deben cumplir ciertos criterios de corroboración: una baja actividad de polinizadores, bajo nivel de hercogamia, alto índice de autocompatibilidad, alto índice de autopolinización espontánea, una relación alométrica positiva entre el tamaño floral - número de óvulos - número de granos de polen producidos por la flor y una asociación entre los rasgos florales y el *fitness* relativo. Con el fin de someter a prueba la hipótesis de asociación alométrica entre rasgos de la morfología floral y su implicancia en la producción de semillas se escogió la especie *Oenothera affinis*, una hierba anual asociada a polinizadores de esfingidos nocturnos y distribuida en regiones templadas de Sudamérica (Dietrich 1977). Se tomó una población ubicada en la Zona Central de Chile que, según los antecedentes bibliográficos, cumple con tres de los principios necesarios:

1. Baja actividad de polinizadores. Aún cuando en principio ocho especies de esfingidos descritos para la zona podrían actuar como vectores de polen de *O. affinis* (Ureta et. al. 1956), no se ha detectado la presencia de los lepidópteros en la población seleccionada al observar un total de 15 cuadrantes de 12m² con un rango entre 41 - 91 flores y un promedio de 67,1 flores (0 especies, 0 visitas por flores⁻¹ h⁻¹ y solo un 1,7% de flores con escamas en los estigmas; N=298) (R. Medel, datos no publicados).

2. Alto nivel de polinización autónoma. La especie se identifica por presentar diferentes niveles de heterocigocidad y estados fenotípicos entre poblaciones, la evolución de esta compleja heterocigocidad puede ser caracterizada por cuatro estados: en el primer estado no existen diferencias morfológicas entre homocigotos y heterocigotos. En el segundo estado, los heterocigotos presentan grandes flores y largos tubos florales. En el tercer estado, las flores son pequeñas, pero conservan su largo tubo floral. En el cuarto estado, las poblaciones tienden a tener flores más pequeñas y tubos florales más cortos. Las poblaciones chilenas poseen un fenotipo caracterizado por flores pequeñas y cortos tubos florales, caracteres que tienden a persistir debido a la autopolinización (Dietrich 1977).

3. Asociación rasgo floral - *fitness*. En esta localidad de Chile Central, las poblaciones de *O. affinis* presentan características peculiares, en ausencia de

polinizadores se encuentran coeficientes de selección significativos para algunos rasgos florales. Los estudios se efectuaron bajo un modelo de relación entre los caracteres florales y la producción de semillas por fruto como medida de *fitness* femenino y un segundo modelo donde se incluyó dentro de las variables los rasgos reproductivos (tamaño de la antera, tamaño del estigma y tamaño del ovario) como una forma de examinar la importancia de la autofecundación en los patrones de selección (Anexo 2). Los resultados de la investigación mostraron una significativa selección disruptiva para el tamaño de la corola, indicando que los tamaños extremos de las flores estarían siendo favorecidos dentro de la población (Anexo 3.A). Además, se observó un fuerte gradiente de selección direccional en el incremento de la longitud del tubo floral bajo el primer modelo, sugiriendo que en principio los polinizadores estarían seleccionando el largo del tubo floral. Pero la magnitud de selección se redujo en un 50% al aplicar el segundo modelo volviendo este atributo irrelevante como predictor del *fitness* femenino. De manera interesante, el segundo modelo reveló una fuerte relación lineal entre los órganos reproductivos y el *fitness* femenino (Anexo 3.B; R. Medel, datos no publicados). Además, se comparó la población de estudio con otra mayormente exogámica ubicada en Argentina. Los resultados indicaron que a diferencia de la chilena, la población argentina posee grandes flores, alta producción de néctar, plantas con un menor número de flores abiertas por noche y frutos que producen un número de semillas tres veces mayor a la población autógena (anexo 4). Partiendo de la base que la variación del tamaño del tubo floral afecta la expresión de otros rasgos como el tamaño de ciertos caracteres morfológicos, la asignación reproductiva (producción de polen y óvulos por flor) y finalmente la producción de semillas (Mazer y Wheelwright 1993), es interesante que con estos antecedentes no se revelara selección sobre la longitud del tubo floral en la población argentina a diferencia de fuertes gradientes de selección direccional obtenida en la población autógena chilena en el año 2006 (anexo 3). Estos antecedentes permitieron plantear la hipótesis que relaciones alométricas podrían ser suficientes para generar la asociación rasgo-*fitness* en esta población sin polinizadores.

En esta tesis se abordaron las siguientes preguntas: (1) ¿es consistente la ausencia de polinizadores en la población de estudio? (2) ¿existen relaciones alométricas entre las diferentes estructuras florales y el *fitness* relativo en la población de *O. affinis*?, (3) ¿cuáles son las rutas causales de impacto de los rasgos florales sobre la adecuación biológica? Las respuestas a estas interrogantes nos permitirá responder la pregunta más general, (4) ¿es la alometría un factor generador de covarianza fenotipo-*fitness* en plantas autocompatibles?

Para revelar estas interrogantes se efectuaron una serie de estudios en la población de análisis: a) se examinó la presencia o ausencia de polinizadores, b) se reconoció la presencia o ausencia de hercogamia, c) se estableció el sistema reproductivo para establecer la importancia de la autogamia y la autocompatibilidad, d) se determinaron las correlaciones entre los caracteres florales, e) se realizaron estimaciones de covariación fenotipo floral – *fitness* relativo, y f) se estipuló la estructura causal entre los caracteres florales medidos, la producción de gametos (polen y óvulos) y su contribución a la adecuación biológica relativa mediante la implementación de modelos de ecuaciones estructurales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si existe un efecto alométrico que explique las relaciones entre morfología floral y *fitness* relativo en una población chilena de *Oenothera affinis* autocompatible y carente de polinizadores.

Objetivos específicos

- 1) Cuantificar caracteres florales: longitud del tubo floral, área de la corola, apertura del tubo floral, longitud antera, longitud estigma y longitud ovario; producción de gametos: número de granos de polen, número de óvulos y las correlaciones entre las variables.
- 2) Estimar el sistema de reproducción en ausencia de polinizadores utilizando una prueba de polinización y evaluar la biología reproductiva a partir de características como la relación polen/óvulos, la carga polínica, la relación semillas/óvulos y la proporción de semillas abortadas para determinar la contribución de la autofertilización en la población.
- 3) Identificar el modelo más apropiado para dar cuenta de la estructura de covariación de los datos morfológicos, producción de gametos y su aporte al *fitness*.
- 4) Establecer si existen relaciones alométricas entre fenotipo floral y *fitness*.

HIPÓTESIS

Se espera que la ausencia de polinizadores en el sitio de estudio se traduzca en una baja hercogamia para asegurar la reproducción por autopolinización. Luego, la covariación fenotipo floral – *fitness* relativo tendrá un origen alométrico y no funcional en *Oenothera affinis*. Esto significa que la eficacia reproductiva aumentará con el tamaño de las estructuras florales, donde flores más grandes tenderán a producir una mayor cantidad de granos de polen y un mayor número de óvulos, lo cual, debido a mecanismos de autogamia, se traducen en una mayor fecundidad que flores más pequeñas.

METODOLOGÍA

Historia natural de Oenothera affinis

Oenothera affinis Cambess. (Onagraceae) comúnmente conocida como “Don Diego de la noche” se distribuye en las regiones templadas de Uruguay, Brasil, Bolivia, Argentina y Chile (Dietrich 1977). Crece en suelos arenosos y en laderas secas de los cerros hasta 2500 msnm. Son hierbas erguidas semestrales o perennes, con una altura que varía entre los 40 y los 80 cm y ramas que emergen cerca de la base. Las flores amarillas emergen hacia el final de las ramas, mostrando un ovario inferior y un largo tubo floral del cual nacen los sépalos y pétalos. Las flores abren de noche hasta la mañana siguiente, durando sólo una noche. Las flores son polinizadas por la noche por esfingidos (Sphingidae) que liban néctar de la base del largo tubo floral (Gregory 1963-1964; Figura 1). La estación de floración ocurre entre octubre y abril. El fruto es una cápsula de 2,5 a 4,0 cm. de largo (Dietrich 1977).

Sitio de estudio

El estudio se efectuó en los meses de marzo 2011 y febrero 2012 en una zona intervenida cerca de Maitencillo (32°40'35.8"S, 71°26'10" W, 45 msnm) en la V Región de Valparaíso (Figura 2). En este sitio, *O. affinis* se distribuye en parches monoespecíficos y asociada principalmente a plantas de *Baccharis sp.*, *Peumus boldus*, *Chrysanthemum sp.*, *Convolvulus chilensis* y algunas gramíneas.



Figura 1. Flor de *Oenothera affinis* en una población argentina polinizada por *Manduca sexta* (Sphingidae).



Figura 2. Panorámica del sitio de estudio Maitencillo ($32^{\circ}40'35.8''\text{S}$, $71^{\circ}26'10''\text{W}$, 45msnm) en la V Región de Valparaíso, Chile.

Muestreo de polinizadores

La tasa de visitas fue determinada por observación directa por lapsos de 10 minutos durante cuatro noches entre las 19:00 y las 22:00 horas y por tres mañanas entre las 6:00 y las 9:00 horas del 13 al 16 de Febrero de 2012. Se calculó la tasa de visita como: (número de flores visitadas)/ número de flores observadas x tiempo. Los individuos contabilizados correspondieron a aquellos visitantes que ingresaban a la flor o que mantenían contacto con las estructuras reproductivas para asegurar que sus visitas fueran válidas como vectores de polen. El contacto entre los posibles polinizadores y las flores se registró en un total de cuarenta flores por hora. Los individuos se guardaron en tubos eppendorf con 1ml de alcohol 70° para la posterior identificación y recuperación de polen de las distintas estructuras corporales. Además, se examinó la presencia de escamas en los estigmas florales usando una lupa (10x) durante los muestreos de cada mañana.

Potencial dicogamia y hercogamia

Se evaluó una potencial dicogamia en la población, es decir, un desfase temporal en la madurez o receptividad de los órganos reproductivos de la flor (Richards 1986; Bertin 1993). Además, se observó cuantitativamente la distancia antera-estigma, lo cual permitió conocer la intensidad de la hercogamia, atributo que evita la interferencia polen-estigma y promueve la polinización cruzada.

*Morfología floral de *Oenothera affinis**

Se estudió la conformación floral sobre la base de seis caracteres en un total de cien plantas considerando una flor por planta. Se obtuvieron dos fotografías digitales de cada flor (frontal y lateral) tomadas en el campo con una cámara digital Nikon (D700), las que luego se procesaron con ImageJ 1.45 (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las siguientes medidas fueron consideradas a una escala milimétrica (Figura 4):

1. Área de la corola siguiendo el contorno de los pétalos de la flor (AC).
2. Apertura del tubo de la corola dado por el diámetro máximo de la apertura del tubo de la corola (AT).
3. Longitud de la rama estigmática (LBE).
4. Longitud de la antera (LA).
5. Longitud del tubo floral según la distancia entre la base del ovario y la porción apical del tubo donde se insertan los pétalos (LT).
6. Longitud del ovario (LO).

Producción de gametos

1. Disponibilidad de óvulos en el ovario (OVU): Se contabilizó la cantidad de óvulos por ovario en un total de cien flores en anthesis, una flor por planta, correspondientes a las mismas utilizadas en la determinación de la morfología floral. Para ello se disectó el ovario y bajo microscopio se contabilizó la cantidad de óvulos.

2. Producción de polen en anteras (POLAN): Se calculó el número de granos de polen presentes en las anteras para las flores que fueron medidas. Primero se extrajeron cuatro de las ocho anteras en tubos eppendorf independientes y se preservaron en 1 ml de alcohol 70°. Cada tubo se agitó por un minuto en un vortex del cual se extrajeron 20µl y se contabilizó bajo microscopio el número de granos de polen con un hematómetro (Figura 5). Posteriormente se obtuvo un promedio de granos de polen por flor.

Matriz de correlación y covarianza entre los caracteres florales y las medidas reproductivas

Para estudiar la relación entre las variables morfológicas y la producción de gametos se realizó una matriz de correlación de Pearson (P) y luego una matriz de covarianza (S) entre los pares de variables.

Sistema reproductivo

Los mecanismos de reproducción de la población se establecieron bajo la metodología descrita por Ruiz y Arroyo (1978), realizando cuatro tratamientos de polinización con un total de cuarenta plantas por cada uno:

1. Polinización autónoma (PA): cuarenta flores embolsadas antes de la antesis, se dejan hasta la formación (o no) de frutos.
2. Autopolinización manual (AM): cuarenta flores embolsadas en estado de yema, una vez abiertas se polinizan manualmente con polen de una flor de la misma planta, luego se encierran hasta la formación (o no) de frutos.
3. Polinización cruzada (PC): cuarenta flores que una vez abiertas son embolsadas luego de recibir polinización manual con polen de otro individuo conespecífico aproximadamente a una distancia de 3km hasta la formación (o no) de frutos.
4. Agamospermia (AG): emasculación de las ocho anteras de la flor en estado de yema y exposición directa sin embolsar hasta la formación (o no) de frutos con un total de cuarenta flores.

Las muestras se embolsaron individualmente utilizando mallas de gasa transparente que dejan pasar la luz, pero impiden el ingreso de polinizadores, cerrando las bolsas bajo el ovario con hilo de cobre (Figura 3). Luego de realizar los cruces controlados se esperó dos semanas para recoger los frutos. Se calculó el porcentaje de fructificación a partir de la relación: número de frutos producidos sobre el número de flores tratadas por cien ($n^\circ \text{ frutos} / n^\circ \text{ flores} \times 100$). Las estrategias reproductivas fueron interpretadas de acuerdo al trabajo publicado por Ruiz y Arroyo (1978). El índice de auto-incompatibilidad (ISI) fue estimado dividiendo el número promedio de semillas por

flores cruzadas obtenidas por autopolinización manual (AM) sobre el número promedio de semillas por flores cruzadas bajo polinización cruzada (PC). Valores entre 0.2 - 1 son indicadores de parcial a completa autocompatibilidad, valores < 0.2 son indicadores de autoincompatibilidad. El índice de autopolinización espontánea (IAS) se calculó como la razón entre el porcentaje de fructificación del tratamiento de polinización autónoma (PA) y el porcentaje de fructificación del tratamiento de autopolinización manual (AM). Este índice mide la capacidad de las flores de producir semillas en ausencia de polinizadores. Los valores entre 0.2 - 1 son indicadores de autofertilización y < 0.2 son indicadores de baja o nula autogamia. Para determinar si las diferencias entre los grupos eran significativas, se comparó la cantidad de semillas por flores cruzadas en cada tratamiento usando una ANOVA y una prueba de Tukey – Kramer a posteriori.

Éxito reproductivo

Según Dafni (1992), se estimó el éxito reproductivo para cada uno de los tratamientos [(número de frutos obtenidos / número de flores tratadas) x (número promedio de semillas obtenidas por fruto / número promedio de óvulos por flor)]. El número promedio de óvulos por flor se obtiene de la variable reproductiva calculada de cien flores tomadas al azar de diferentes plantas (Tabla 4).

Calidad de frutos

Se cuantificó para cada fruto la cantidad de semillas obtenidas y la proporción de semillas abortadas para identificar diferencias entre la calidad de los frutos obtenidos en los diferentes tratamientos, además se compararon con cuarenta frutos sin manipular tomados al azar considerando un fruto por planta. El análisis estadístico se realizó con el programa JMP10 y constó de una ANOVA para contrastar diferencias significativas entre los tratamientos y un test de Tukey como prueba a posteriori.



Figura 3. A la izquierda flores antes de la antesis, aproximadamente a las 19:00 horas. A la derecha, botones de las flores embolsadas al inicio de los cruces de polinización.

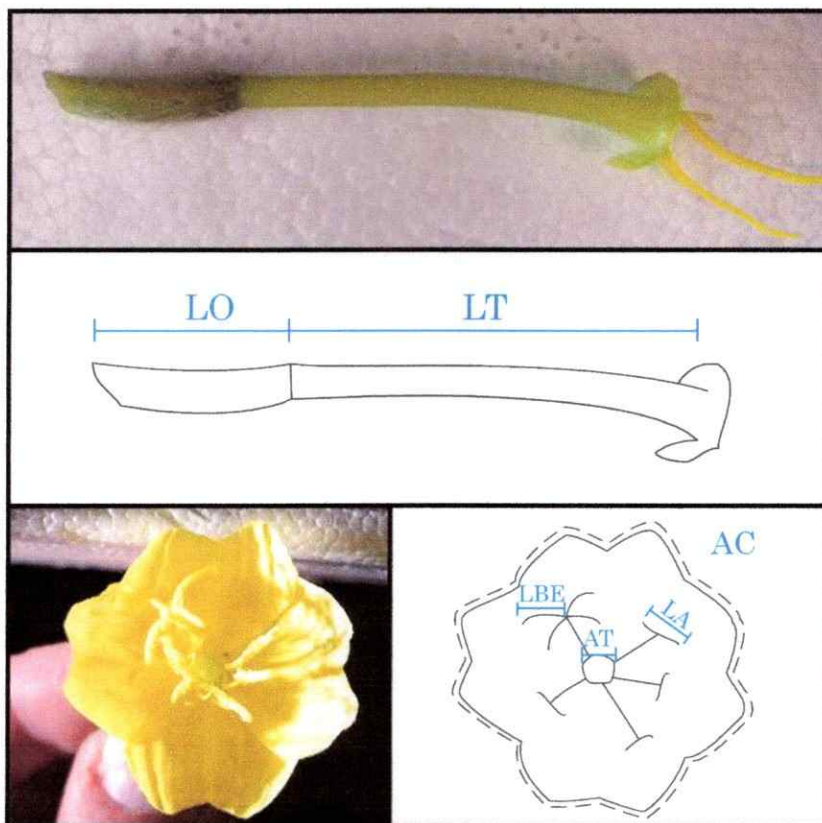


Figura 4. Atributos florales de *Oenothera affinis* (Onagraceae). Fotografía lateral del tubo floral sin los pétalos y Fotografía frontal de la corola.

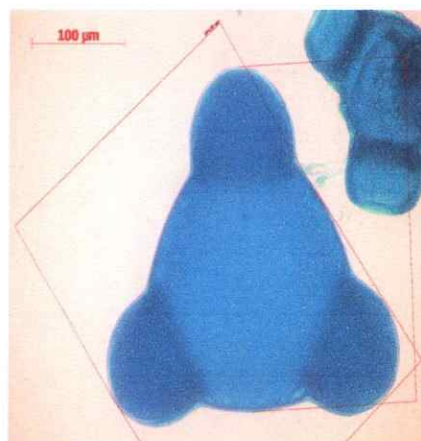


Figura 5. Grano de polen de *Oenothera affinis* (298,2 x 291,8 μm).

Características reproductivas

Con el fin de establecer relaciones entre la biología reproductiva y los altos índices de autopolinización se calcularon las siguientes características en la población de *O. affinis*:

Carga polínica: Del total de cien flores estudiadas se obtuvieron los estigmas expuestos a polinización natural colectados dos horas después de la anthesis. Los estigmas fueron puestos en tubos eppendorf, agitados en vórtex y contabilizados bajo microscopio sobre un hematocitómetro calculando la cantidad de granos de polen por 1ml de solución.

Relación polen/óvulos: Se dividió el número de granos de polen por flor obtenido de las anteras sobre el número de óvulos por flor.

Relación semillas/óvulos: Se determinó dividiendo el número promedio de semillas viables por fruto sobre el número de óvulos por flor en cien plantas.

Semillas abortadas: El número de semillas abortadas por fruto se estableció discriminando del total de semillas por fruto, aquellas que se encontraron mal formadas, de tamaño reducido, aplastado o carente de embrión. La fracción de semillas abortadas se calculó dividiendo el número de semillas abortadas por fruto entre el número promedio de semillas por fruto (Ramírez 1995).

Eficacia reproductiva (fitness relativo)

Para estimaciones de selección se evaluó la contribución relativa individual al *fitness* poblacional dividiendo el número de semillas producidas por individuo por el promedio de semillas en la población.

Estudio de selección fenotípica

Se efectuó un análisis de selección fenotípica para evaluar, si aún en ausencia de polinizadores, se observaban coeficientes significativos de asociación entre rasgos morfológicos y los componentes de *fitness* relativo. Se realizaron dos modelos diferentes para los cálculos de selección. En el primer modelo, se evaluó la magnitud, signo y curvatura de la selección sobre los rasgos de tamaño floral previamente descritos. En un segundo modelo, se incluyeron los componentes asociados a la reproducción (producción de polen por flor y óvulos en los ovarios) para examinar si la inclusión de estas variables amortiguan los patrones de selección.

Primero se estimó el diferencial de selección (S), para evaluar la fuerza total de la selección actuando sobre un rasgo z , el cual calcula la selección directa (relación directa entre un rasgo y el *fitness*) e indirecta (cambio resultante de correlaciones con otros rasgos que afectan el *fitness*) según:

$$S_i = \text{COV}(z_i, w) \quad (1)$$

Donde z_i es el carácter i , y w es el *fitness* relativo. El diferencial de selección (S) será mayor cuanto mayor sea la covarianza entre la característica y el *fitness*.

Para describir la fuerza directa de la selección actuando sobre el carácter i , excluyendo la selección indirecta, se aplicó la ecuación lineal de Lande y Arnold (1983):

$$w = \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i z_i + \varepsilon \quad (2)$$

Donde w es el *fitness* relativo del individuo, α es la constante, β_i representa la pendiente promedio de la superficie de selección a lo largo del rasgo y ε es un término de error. La magnitud de β_i describe cuánto es el cambio del *fitness* por unidad de cambio en el carácter i , manteniendo los otros caracteres constantes. El signo de β_i indica la dirección de cambio esperado de la selección que actúa sobre el carácter i .

Luego se calculó el gradiente de selección no lineal γ que describe la naturaleza de la selección en desviaciones cuadráticas del promedio para los caracteres singulares o en combinaciones de pares. El gradiente no lineal es estimado por:

$$w = \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i z_i + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \gamma_{ii} z_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{i=j}^n \gamma_{ij} z_i z_j + \varepsilon \quad (3)$$

Donde γ_{ii} indica la curvatura de la relación entre el carácter i y el *fitness* relativo. Cuando el signo es negativo, se observa una concavidad descendiente y se interpreta como una selección estabilizadora sobre el carácter i . Cuando el signo es positivo, se observa una concavidad ascendente reflejando una selección disruptiva. El gradiente correlacional de selección γ_{ij} , refleja el grado al cual la selección actúa sobre la correlación de los rasgos i y j , y fue estimado por la regresión del *fitness* relativo sobre los caracteres y todos sus pares de productos. Todos los caracteres fueron estandarizados a promedio 0 y varianza 1 antes del análisis. Esta transformación es equivalente a la resta del promedio del rasgo a cada valor dividido por la desviación estándar. Una vez estandarizados los caracteres, estos fueron utilizados para estimar los coeficientes de selección usando el programa JMP 10. La significancia de los gradientes de selección fue obtenida directamente de las tablas de regresión y corregidas con la técnica de Bonferroni (Rice 1989) a un valor de $\alpha = 0,05$. Esta técnica permite minimizar el error tipo I en los coeficientes de selección y complementar los valores de P originales.

Para evitar los supuestos paramétricos sobre la forma de la selección Schluter (1988) propuso visualizar la forma mediante un procedimiento no paramétrico que se describe como:

$$w = f(z) + \varepsilon \quad (4)$$

Donde w es la adecuación, z es un rasgo, ε es el error y f sólo afirma que existe una función entre w y z . El objetivo básico es estimar el spline que mejor se ajuste a la distribución real investigando mediante sucesivas aproximaciones el rango de valores de

un parámetro lambda (λ) que minimiza la variación de las estimaciones locales entre intervalos sucesivos.

Análisis de vías y modelos de ecuaciones estructurales (SEM)

Un segundo tipo de análisis consistió en el examen de las estructuras causales en una red de interacciones entre los caracteres florales medidos, la producción de gametos, características reproductivas y la adecuación relativa mediante la implementación de análisis de vías y modelos de ecuaciones estructurales. Los análisis de vía son correlaciones entre un conjunto de variables según el modelo de trabajo, lo cual permite evaluar una hipótesis a priori relativa a las conexiones causales entre las variables para ser trasladadas a un modelo estadístico (Mitchell 1992; Shipley 1997). Los modelos de ecuaciones estructurales son una extensión del análisis de vías en un modelo específico, representado como un diagrama de vías (Mitchell 1992, 1993). Este procedimiento permitió identificar el modelo más apropiado para dar cuenta de la estructura de covariación de los datos morfológicos y reproductivos de los organismos y su aporte al *fitness* relativo. El modelo base incluyó todas las posibles vías directas e indirectas que pueden afectar al *fitness* partiendo de las medidas de tamaño de la flor. Después de construir el modelo básico se construyen otros modelos más acotados (hipótesis alternativas) que retienen sólo algunas vías del modelo completo (Mitchell 1994). La decisión de aceptar o rechazar un modelo se relaciona con la bondad de ajuste entre el modelo y la estructura de covariación real de los datos. Una diferencia significativa indica que el modelo propuesto no da cuenta de la estructura real. Por el contrario, ausencia de diferencias significativas indica que el modelo propuesto da cuenta de la estructura de los datos (Mitchell 1993). Por parsimonia, de dos modelos igualmente aceptables se aceptará aquel que presente el menor número de parámetros, es decir, mientras más bajo sean los grados de libertad, más aceptable será el modelo causal propuesto. Cuando dos modelos tienen iguales grados de libertad se aceptará aquel con un menor valor de X^2 . Para determinar la estructura causal entre el conjunto de variables

se realizaron dos modelos, usándose el criterio de información bayesiano (BIC) para seleccionar el mejor entre un conjunto de modelos admisibles. Un modelo será mejor que otro si tiene un valor BIC menor. El BIC se basa en una verosimilitud integrada en la teoría bayesiana según la fórmula:

$$\text{BIC} = G - g_l \cdot \ln N$$

Donde G es el cociente de verosimilitud, g_l son los grados de libertad y N el tamaño de la muestra.

El procedimiento siguió los consecutivos pasos. Primero, se examinó la relación entre los componentes principales asociados al tamaño (área de la corola, longitud del tubo, longitud del ovario) sobre el *fitness*. Segundo, se examinó la relación entre los rasgos florales por separado, los componentes reproductivos y el *fitness*. Luego, se estimaron los efectos directos, indirectos y totales que tienen las variables sobre la adecuación biológica. El análisis se realizó con el programa TETRAD 4.3.10-6 disponible en (<http://3w.phil.cmu.edu/tetrad/current.html>).

RESULTADOS

Características de la población de estudio

Una observación directa de *O. affinis* en terreno describe que las flores son protándricas, las anteras descargan el polen antes de la antesis (19:00 a 20:00 horas) y los estigmas se vuelven receptivos aproximadamente a las 21:00 horas. Esta separación entre la fase masculina y femenina se puede explicar en tres etapas: 1) Una etapa de contacto inicial antera-estigma ocurre con anterioridad a la antesis cuando los botones florales ya cuentan con anteras maduras que liberan el polen mientras el estigma se mantiene cerrado a la misma altura. En esta etapa existe contacto marginal quedando el polen adherido a la superficie estigmática. 2) Una etapa de separación física que ocurre al comienzo de la antesis cuando el estigma cerrado se aleja de las anteras quedando perpendicular al eje de los filamentos, momento en el cual los brazos estigmáticos se abren y se vuelven receptivos. 3) Una etapa de contacto final que ocurre cuando el estigma retorna al centro de la flor quedando en completo contacto con las anteras saturadas de un polen pegajoso, probablemente representando un mecanismo de aseguramiento reproductivo tardío (Figura 6).



Figura 6. Flores de *Oenothera affinis*. A la izquierda se presenta el estigma aún no receptivo cuando la flor se encuentra aún encapsulada. A la derecha, el estigma receptivo se presenta alejado de las anteras al momento de la antesis.



Ausencia de polinizadores

En la población, la antesis ocurre entre las 20:00 - 22:00 horas. Posterior a esa hora todas las flores ya se encuentran abiertas, hasta la mañana siguiente, hasta las 10:00 - 11:00 horas aproximadamente. No se registraron visitas de polinizadores en el sitio de estudio durante las cuatro noches y tres días de observación (0 especies, 0 visitas) y tampoco se registraron escamas en las estructuras florales. Estos resultados son consistentes con datos tomados en el año 2006, lo cual corrobora que los polinizadores no son responsables de cualquier fuerza selectiva detectable sobre los caracteres florales (R. Medel, datos no publicados).

Sistema reproductivo

Los resultados de los cruces controlados indican que *Oenothera affinis* es una especie con un alto índice de autopolinización espontánea (IAS = 0,786) y autocompatibilidad (ISI = 0,992). Estos resultados indican que en ausencia de polinizadores, y si no existe la opción de la fecundación cruzada, la autofecundación juega un importante rol en la producción de semillas.

Los mayores porcentajes de fructificación se encontraron en los tratamientos de autopolinización manual y polinización autónoma, en la polinización cruzada se recaudó sólo un 35% de los frutos (Tabla 1). Debido a que las anteras liberan polen antes de la antesis pudiendo ocurrir contacto con la superficie estigmática, las pruebas de emasculación podrían verse alteradas y el alto porcentaje de fructificación obtenido posiblemente sea resultado del polen adherido a los brazos estigmáticos antes de la antesis siendo suficiente para producir el fruto, a pesar de que esto ocurra en los estigmas aún no receptivos, las sustancias que incorporan el polen permiten que se mantenga unido a la estructura femenina aún después de volverse receptiva. La cantidad de semillas producidas por la cantidad de flores tratadas es significativamente diferente entre los cruces ($F = 10,861$; $P < 0,0001$), con una prueba a posteriori de Tukey - Kramer

significativo para las comparaciones entre AM – PC y PA – PC con un $P < 0,001$ y entre los cruces AM – AG y AG – PC con un $P < 0,05$ (Tabla 2).

Los valores de éxito reproductivo calculados para los tratamientos de PA, AM, PC y AG fueron de 0,217; 0,275; 0,108 y 0,240 respectivamente.

Los análisis que evalúan la calidad de los frutos en cada tratamiento respecto a la producción de semillas (Figura 7A) indican que la polinización cruzada proporcionó un mayor número de semillas que la polinización autónoma (media \pm EE, PC= $99,9 \pm 16,2$; PA= $78,5 \pm 7,2$) pero un número similar de semillas en relación a la autopolinización manual ($94,2 \pm 4,9$) y muy cercano a lo que se obtiene normalmente sin manipular las flores ($102,0 \pm 6,8$). Los tratamientos difirieron globalmente en la cantidad de semillas producidas por fruto ($F = 3,516$; $P = 0,017$). Pero una prueba de Tukey no indicó diferencias significativas entre los tratamientos. Respecto a la proporción de semillas abortadas por fruto (Figura 7B), una ANOVA demostró diferencias significativas entre los grupos ($F = 3,262$; $P = 0,024$). El test de Tukey a posteriori indicó diferencias significativas solo entre los tratamientos de polinización autónoma y polinización cruzada (Diferencial = 0,186; EE = 0,06; $P = 0,019$). No se consideraron los datos de la agamosperma en la evaluación de frutos debido al sesgo que podría existir por la presencia de polen de la misma flor en los brazos estigmáticos antes de ser manipuladas.

Tabla 1. Frutos obtenidos en relación al número de flores tratadas, porcentaje de fructificación y promedio de semillas por flores cruzadas de *O. affinis* para cada tratamiento de polinización. Total cuarenta plantas por tratamiento.

Tratamiento	Nº de flores tratadas	Frutos producidos	Fructificación %Frutos/Flores tratadas	Promedio semillas/flores cruzadas
PA	40	36	90	1,964
AM	40	38	95	2,479
PC	40	14	35	2,498
AG	40	34	85	2,297

Tabla 2. Prueba de Tukey – Kramer para la comparación entre la producción de semillas por la cantidad de flores cruzadas en los diferentes tratamientos.

Comparación	Diferencia de medias	P
AM – PC	62,05	< 0,0001
PA – PC	43,22	0,0009
AM – AG	32,10	0,0242
AG – PC	29,95	0,0409
AM – PA	18,82	0,3374
PA – AG	13,27	0,6371

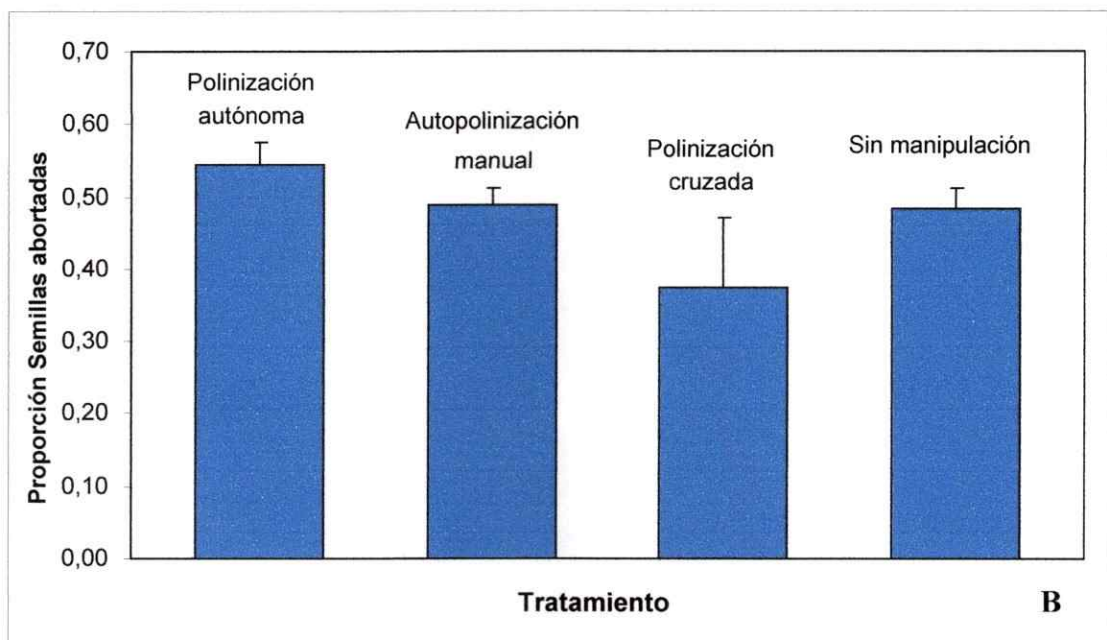
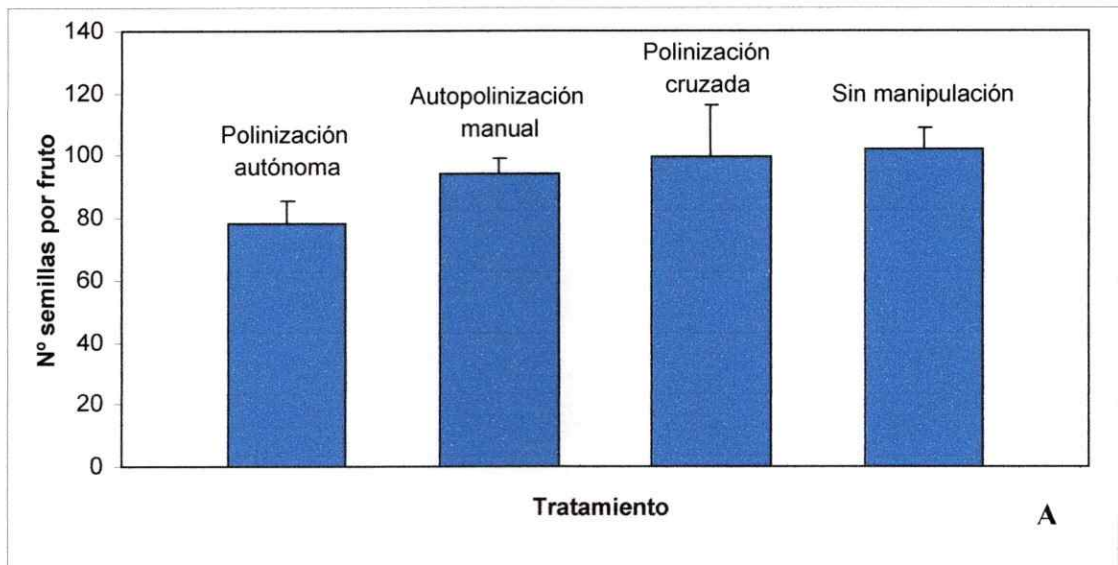


Figura 7. Evaluación de la calidad de los frutos obtenidos en cada tratamiento. A.- Promedio de semillas obtenidas por fruto \pm EE; B.- Proporción de semillas abortadas en el fruto \pm EE.

Variabilidad floral y características reproductivas

La descripción morfológica se muestra en la tabla 3. Herrera (1988) calcula los coeficientes de variación de los caracteres medidos según: $(CV = 100 \times \text{desviación estándar}/\text{media})$. En este contexto, el área de la corola resulta ser el carácter más variable ($CV = 33\%$) seguido por la apertura del tubo floral y la longitud de la antera ($CV = 20$ y 19% respectivamente), menor variabilidad se encuentra en los caracteres medidos para la longitud de los brazos estigmáticos ($CV = 17\%$), longitud del ovario ($CV = 15\%$) y la longitud del tubo floral ($CV = 13\%$).

Respecto a las características reproductivas de la población, la producción natural de frutos por flor fue de un 100% , pero con una producción de óvulos por flor 3,4 veces mayor que la cantidad de semillas viables encontradas en los frutos. Además, se encuentra un alto índice de semillas abortadas que supera el de semillas germinables. La relación polen – óvulo estuvo asociada a un alto número de granos de polen por flor que asciende a 39 veces por sobre la producción de gametos femeninos por flor. La cantidad de gametos masculinos producidos por flor duplica al encontrado en la carga polínica, por último, el número promedio de granos de polen depositados naturalmente sobre los estigmas después de dos horas de antesis fue 19,2 veces mayor al número promedio de óvulos por flor (Tabla 4).

Tabla 3. Estadísticos correspondientes a los caracteres florales (media \pm DE) examinados en *Oenothera affinis* en la población de estudio. N = 100 flores a razón una flor/planta. DE = desviación estándar.

Variable	Media	DE	Rango
Area corola (mm ²)	1068,3	355,2	452 - 2439
Largo tubo floral (mm)	39,1	4,9	28 - 53
Apertura tubo (mm)	3,5	0,7	2 - 6
Longitud antera (mm)	5,2	1,0	3 - 8
Longitud del brazo estigmático (mm)	7,1	1,2	3 - 9
Largo ovario (mm)	13,2	2,0	9 - 19

Tabla 4. Valores promedio de las características reproductivas de *O. affinis*. N = 100 flores a razón una flor/planta. DE= Desviación estándar.

Variabes reproductivas	Media	DE	Rango
Óvulos/flor	325,3	6,2	157 - 457
Granos polen por antera/ml	1.586,0	137,9	200 - 9200
Polen total por flor/ml	12689,4	11036,8	1600 - 73600
Carga polínica	6.260,6	469,7	200 - 23000
Polen/óvulos	39,6	35,1	5 - 233
Semillas/óvulos	0,3	0,14	0,03 - 0,67
Semillas abortadas	0,6	0,17	0,1 - 0,9
Semillas por fruto	94,8	43,6	10 - 189

Correlación de los caracteres morfológicos

Las plantas de *O. affinis* presentaron coeficientes significativos de correlación – covarianza para las medidas de tamaño de la flor y la producción de gametos (Tabla 5). El área de la corola (AC) se correlaciona significativamente con todas las estructuras florales medidas (LT=longitud del tubo floral; LO= longitud del ovario; AP= apertura del tubo; LBE= longitud del brazo estigmático; LA= longitud de la antera). La presencia de correlación implica un cierto grado de dependencia entre estos caracteres por lo que se extrajeron componentes principales de tamaño para examinar su efecto conjunto sobre el *fitness* en los análisis subsecuentes.

Respecto a las asociaciones entre las estructuras florales y la producción de gametos, tanto el área de la corola como la longitud del ovario se correlacionaron positivamente con la producción de óvulos por ovario (OVU). Las correlaciones de los caracteres fenotípicos con la producción de polen por flor (POLFL) son menores.

Tabla 5. Matriz de correlación sobre la diagonal, y matriz de covarianza bajo la diagonal para los caracteres fenotípicos de la flor y la producción de gametos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

	AC	LT	LO	AP	LBE	LA	OVU	POLFL
AC	-	0,651***	0,563***	0,664***	0,603***	0,574***	0,430***	0,245*
LT	1155,5	-	0,540***	0,364***	0,327**	0,291*	0,349**	0,091
LO	403,3	5,437	-	0,319**	0,253*	0,287*	0,601***	0,204*
AP	168,1	1,297	0,458	-	0,349**	0,503***	0,242*	0,065
LBE	255,8	1,949	0,610	0,297	-	0,448***	0,198	0,231*
LA	208,3	1,487	0,591	0,366	0,546	-	0,195	0,291**
OVU	9429,5	107,7	74,78	10,63	14,56	12,303	-	0,154
POLAN	962258	5019,8	4532,6	509,9	3041,7	3276,7	104770	-

Coefficientes de selección

Los diferenciales de selección no revelaron valores significativos de selección total sobre los caracteres florales a través del componente femenino del *fitness* (Tabla 6). Al controlar por efectos correlacionados, se observó evidencia compatible con selección direccional sólo sobre la longitud del tubo floral ($\beta' = 0,332$; $P < 0,05$). El modelo de selección no lineal mantiene la significancia para la longitud del tubo ($\gamma' = 0,192$; $P < 0,05$). Similares resultados se obtuvieron cuando los componentes reproductivos fueron incluidos (Modelo II). No se detectaron gradientes de selección correlacional entre los pares de rasgos florales en ninguno de los dos modelos evaluados (Tabla 6).

En general los valores positivos para el tubo floral indican que flores con tubos más largos se estarían promoviendo en la población a una tasa aproximada de 0.3 unidades de desviación estándar por generación. El valor positivo en la ecuación no lineal para el tubo floral sugiere una superficie de selección mixta con un componente lineal y no lineal. Una aproximación gráfica a la superficie (Figura 9) reveló una leve disminución en la ganancia en *fitness* entre los -3DE y los -1DE seguido por un ascenso desde el fenotipo promedio hasta las 3 DE.

Tabla 6. Diferenciales de selección y coeficientes de selección fenotípica en rasgos de la población de *O. affinis*. Se presentan los resultados de los dos modelos estudiados.

Rasgo	S	β_i' (EE)	γ_{ii}' (EE)
Modelo I			
Área de la corola (mm ²)	-0,006	-0,300 (0,186)	-0,084 (0,073)
Longitud del tubo (mm)	0,189	0,332 (0,142)*	0,192 (0,078)*
Longitud del ovario (mm)	0,083	0,048 (0,130)	-0,055 (0,089)
Longitud del estigma (mm)	-0,012	0,016 (0,132)	-0,013 (0,075)
Longitud de la antera (mm)	0,018	0,072 (0,128)	0,014 (0,089)
R ²		0,069	0,073
Modelo II			
Área de la corola (mm ²)	-0,006	-0,382 (0,198)	-0,065 (0,083)
Longitud del tubo (mm)	0,189	0,376 (0,143)**	0,192 (0,079)*
Longitud del ovario (mm)	0,083	-0,016 (0,147)	-0,026 (0,091)
Longitud del estigma (mm)	-0,012	-0,008 (0,131)	0,004 (0,077)
Longitud de la antera (mm)	0,018	0,047 (0,129)	-0,007 (0,092)
Nº óvulos/ovario	0,080	0,086 (0,131)	-0,092 (0,065)
Nº granos de polen en las anteras/ml	0,176	0,199 (0,109)	0,021 (0,032)
Carga polínica	0,039	0,093 (0,113)	-0,040 (0,065)
R ²		0,118	0,101

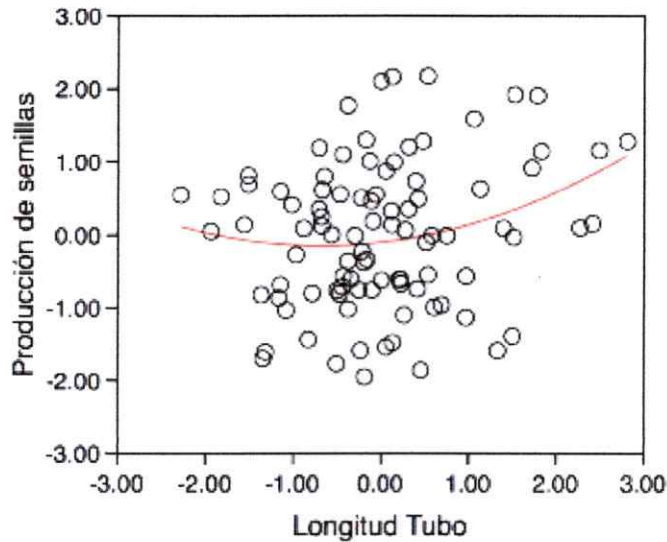


Figura 8. Estimación no paramétrica de la adecuación biológica en relación al tubo floral. Spline cúbico estimado para el número de semillas por individuo de *O. affinis* en relación con los descriptores de tamaños de la flor ($\lambda = 1$). Los descriptores están expresados en unidades de desviación estándar (ver Schluter 1988).

Análisis de ecuaciones estructurales

Considerando los resultados obtenidos en los análisis previos sobre la estructura de la matriz de correlación- covarianza y los caracteres relevantes para la selección, se construyó el modelo básico que describe las rutas posibles por las cuales el tubo floral podría estar contribuyendo a la variación del *fitness*. Si la hipótesis de alometría es correcta es esperable que efectos indirectos del tubo a través de las variables asociadas a rasgos florales (área de la corola, ovario, estambres y anteras), producción de gametos y caracteres reproductivos (carga polínica, relación polen/óvulos, semillas/óvulos y semillas abortadas) estén determinando la autofertilización y así los valores obtenidos en los análisis de selección.

De seis opciones de modelos examinados (Tablas 7 y 8), el modelo 5 (Figura 9) fue la estructura causal más parsimoniosa para dar cuenta de los efectos del tubo floral

sobre la adecuación biológica ($X^2 = 0,885$; $P = 0,97$; $X^2/gl = 0,177$). El modelo de dos rutas presenta una vía femenina significativa desde el componente principal Tubo floral (Tubo*ovario) hasta el *fitness* a través de la producción de óvulos. La otra ruta incorpora dos características reproductivas revelando un efecto positivo del Tubo floral sobre la cantidad de polen que es depositada en los estigmas, al aumentar la carga polínica disminuye la cantidad de semillas abortadas, variable que tiene un efecto negativo sobre el *fitness* relativo de la población. El efecto total del Tubo floral sobre el *fitness* relativo es de 0,016. Este bajo valor se debe en gran parte a los efectos no medidos dentro del modelo, explicado por los altos valores de error asociado a cada variable. El modelo 6, si bien no es tan parsimonioso como el escogido, muestra una importante relación entre el componente principal del tubo polínico y la cantidad de semillas en los frutos en relación con la cantidad de óvulos por flor. Por lo tanto, al aumentar el tamaño del tubo floral incrementa esta relación con un efecto significativo sobre el *fitness* relativo (0,913, $p < 0,001$). Además, el aumento del tamaño del tubo floral tiene un efecto negativo sobre la relación polen/óvulo, es decir, al aumentar el tamaño de esta estructura floral se está produciendo mayor cantidad de gametos femeninos (reforzando el modelo 5 escogido), pero no proporcionalmente a la producción de gametos masculinos, estos resultados fortalecen lo descrito para la vía femenina como la vía causal de mayor implicancia en el *fitness* relativo a partir de varios factores asociados. De este modo, la detección de coeficientes de selección estadísticamente significativos sobre el tubo floral no estaría relacionada con la acción de polinizadores sobre los rasgos florales sino que residiría en la estructura de relaciones causales del tubo con los rasgos involucrados en la reproducción autogámica de las plantas.

Tabla 7. Descripción de los modelos alternativos para la población de *O. affinis*.

Modelo	Descripción de los modelos alternativos
1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tubo a Polen Flor a Semillas/óvulos 2. Tubo a Estigma a Carga polínica 3. Tubo a Ovario a Óvulos
2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tamaño (tubo*área) a Polen Flor a Semillas abortadas 2. Tamaño (tubo*área) a Estigma a Carga polínica 3. Tamaño (tubo*área) a Ovario a Óvulos
3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tubo a Polen flor a Semillas abortadas 2. Tubo a Estigma 3. Tubo a Ovario a Óvulos
4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tubo a Polen flor a Carga polínica 2. Tubo a Estigma 3. Tubo a Ovario a Óvulos
5	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tubo floral (tubo*ovario) a Carga polínica a Semillas abortadas 2. Tubo floral (tubo*ovario) a Óvulos
6	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tubo floral (tubo*ovario) a Semillas/óvulos 2. Tubo floral (tubo*ovario) a Estigma 3. Tubo floral (tubo*ovario) a Polen/óvulos

Tabla 8. Valores de significancia de los modelos analizados para estructura causal de efectos sobre el fitness en la población de *O. affinis*.

Modelo	Grados de libertad	Chi ²	Valor P	BIC
1	19	29,8	0,054	-56,5
2	19	37,8	0,006	-48,5
3	13	22,7	0,045	-36,3
4	13	21,0	0,070	-37,9
5	5	0,89	0,970	-21,8
6	4	4,84	0,305	-13,3

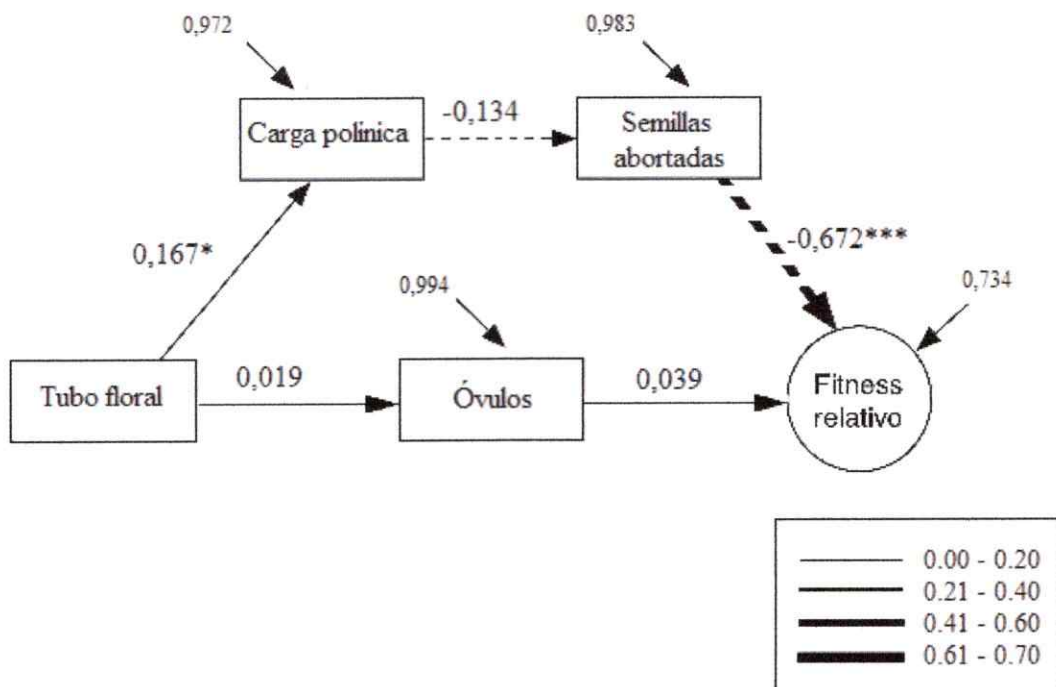


Figura 9. Modelo 5 de estructura causal de la población de *O. affinis* Maitencillo. Los asteriscos representan diferencias significativas en los siguientes niveles *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. Las líneas punteadas indican efectos negativos.

DISCUSION

Este estudio se separó en dos partes. En primer lugar, se corroboró que la población tuviese las características necesarias para plantear una hipótesis de asociación alométrica a partir de una matriz de correlación – covarianza entre caracteres de la morfología floral y producción de gametos, una prueba de polinización, observación directa de hercogamia y una caracterización de la biología reproductiva de la población. En una segunda etapa, se detectaron las vías directas e indirectas causantes de las variaciones en la adecuación biológica realizando análisis de selección y modelos de ecuaciones estructurales.

La matriz de correlación – covarianza señaló una fuerte estructura entre los rasgos morfológicos principalmente entre el área de la corola, la longitud del ovario y la longitud del tubo floral. Las fuertes correlaciones entre caracteres muestran una variación coordinada, indicativa de un fenotipo floral integrado (Herrera 1988). Varios estudios experimentales han demostrado que las respuestas plásticas de distintos caracteres a un ambiente cambiante frecuentemente están correlacionadas entre sí, lo que resulta en variación coordinada de caracteres y un grado apreciable de integración fenotípica (Schlichting 1986).

Dentro de las características reproductivas se observa que aproximadamente un 44% de los óvulos originan semillas. Es decir, menos de la mitad de los óvulos producidos logran fecundación, lo cual sugiere que la ausencia de polinizadores tiene un alto costo reproductivo en el componente femenino. Por otro lado, la producción de polen en las anteras es prácticamente el doble que el encontrado en los brazos estigmáticos, existiría también un costo reproductivo a través del componente masculino de la adecuación biológica. Esta idea se refuerza al calcular la relación entre el polen producido por las anteras y los óvulos por ovario, según la literatura Cruden (2000) determina que las plantas autocompatibles-autógamas por lo general presentan una menor relación polen/óvulo que las especies incompatibles y dado los altos valores obtenidos es probable que exista una depresión por endogamia en la población.

Respecto al sistema de reproducción, es importante destacar que los altos índices de autocompatibilidad y autofecundación detectados son facilitados por la ausencia de hercogamia y la liberación temprana del polen de las anteras antes de que ocurra la anthesis asegurando que el polen sea depositado en el estigma aún no receptivo de la propia flor. En plantas anuales como *Oenothera affinis*, donde la ocurrencia de anthesis en una sola noche y la presencia de polinizadores es nula, los mecanismos asociados a la autofertilización debieran ser fuertemente promovidos debido a una única oportunidad para reproducirse y dejar descendencia (Carvallo y Medel 2010).

En la segunda etapa se detectaron las causas de la asociación entre el fenotipo floral y el *fitness*. Inicialmente los análisis de selección descritos para la población, no revelaron una relación significativa de los diferenciales de selección entre los rasgos florales, reproductivos y el *fitness* femenino. No obstante, las ecuaciones lineales y no lineales de Lande y Arnold (1983) detectaron importantes coeficientes de selección para la longitud del tubo floral bajo los modelos I y II. Sin embargo, como en cualquier estudio de selección fenotípica, estos resultados pueden estar bajo la influencia de otros rasgos no medidos y que se correlacionan con las variables estudiadas, por lo cual es fácil sobreestimar la fuerza de selección (Lande y Arnold 1983, Endler 1986) por ejemplo, cuando la alometría no es controlada en especies autocompatibles.

Para esclarecer lo anterior, se trabajó con modelos de ecuaciones estructurales (SEM), buscando las vías causales que mejor representaran la estructura de covarianza de los datos obtenidos en el terreno. La hipótesis aceptada reveló estrechas conexiones entre los caracteres morfológicos y reproductivos. Es así como la longitud del tubo que revelaba fuertes coeficientes de selección, exhibió efectos importantes a través de una vía femenina al *fitness* encontrando una estrecha relación entre caracteres morfológicos y producción de gametos. Un aumento en el tamaño del tubo se corresponde con un aumento en el tamaño del ovario, el cual tiene un efecto directo en el aumento del número de óvulos y posteriormente en el *fitness* relativo. Los análisis concuerdan con Charlesworth y Charlesworth (1987) quienes demostraron que en especies autocompatibles existe en general una menor asignación de biomasa al androceo y

perianto que al gineceo. Por lo tanto, las especies autógamas presentan características que promueven la producción de semillas por medio de economizar la inversión en las estructuras reproductivas.

El sistema de reproducción principalmente autofecundable podría afectar la capacidad de la población para responder a cambios ambientales según algunos modelos teóricos que pronostican el empobrecimiento genético de las especies de distribución restringida como consecuencia de la rápida fijación de genes debido a deriva genética, selección en pequeñas poblaciones y adaptación a una gama reducida de condiciones ambientales. Sin embargo, otros estudios señalan que se puede mantener los altos índices de autofecundación dentro de una población primero mediante el aumento de la plasticidad y luego fijando esta característica por asimilación genética (Levin 2012). La plasticidad es definida como la variación en la expresión fenotípica de un genotipo en respuesta a las condiciones ambientales particulares aumentando la capacidad del individuo a sobrevivir y reproducirse bajo ciertas condiciones. Esta sería la razón por la cual la población de estudio, a pesar de caracterizarse por presentar pequeñas flores debido a los altos niveles de autofertilización, el modelo de ecuaciones estructurales indica que los tamaños mayores de la morfología floral estarían siendo favorecidos probablemente debido a las condiciones ambientales y su relación con la plasticidad fenotípica.

Los resultados de los modelos de ecuaciones estructurales revelaron un alto valor a las variables no medidas que estarían afectando al *fitness* relativo, esto deja pendiente determinar con precisión la contribución de factores ambientales al sistema experimentando en condiciones controladas.

Por otro lado, es necesario establecer otros factores que determinen la calidad de los frutos como por ejemplo, la masa de frutos y semillas. Además, considerar otros factores que permiten comprobar la eficacia reproductiva, si bien se separaron las semillas abortadas del total de semillas obtenidas por fruto, conviene calcular el porcentaje de germinación tanto para la prueba de polinización como para los estudios de selección y de modelos de ecuaciones estructurales.

Finalmente, Weiner y Thomas (1992), relacionan los cambios en la alometría de plantas con las interacciones competitivas entre individuos dentro de una población en tres especies anuales, demostrando que en ausencia de competencia las plantas siguen una trayectoria simple de alometría, pero al aumentar la densidad de plantas los recursos son mayormente asignados a las estructuras reproductivas obteniendo relaciones discontinuas en la morfología floral. Este es un significativo factor a considerar en futuros trabajos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que a pesar de no ser ampliamente considerada en la literatura, la alometría es un factor que puede contribuir de manera importante a generar resultados compatibles con la idea de selección mediada por polinizadores sobre el tamaño de partes florales en especies autocompatibles y con algún grado de autogamia. Si esto es así, es posible que muchos estudios con coeficientes positivos de selección documentados en la literatura hayan sobre-estimado la importancia de los polinizadores sobre la selección real referente a los fenotipos florales en la naturaleza. Por consiguiente, efectos alométricos asociados con la capacidad de autopolinización espontánea pueden aumentar la probabilidad de error en las estimaciones de selección mediada por polinizadores llegando a obtener resultados que detectan selección natural cuando no la hay, cometiendo un error estadístico de tipo I (Sokal y Rohlf 1981). Se sugiere que futuros trabajos debieran cuantificar explícitamente la contribución de la alometría floral a las estimaciones de *fitness* para así controlar potenciales efectos no deseados en los estudios de selección mediada por polinizadores.

REFERENCIAS

- Alexandersson, R. y S. Johnson. 2002.** Pollinator-mediated selection on flower-tube length a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society of London*. 269: 631-636.
- Bertin, R. I. 1993.** Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. *American Journal of Botany* 80: 557-560.
- Briggs, D y S. M. Walters. 1984.** *Plant variation and evolution*. 2ª ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Inglaterra.
- Carvalho, G. y R. Medel. 2010.** Effects of herkogamy and inbreeding on the mating system of *Mimulus luteus* in the absence of pollinators. *Evolutionary Ecology* 24: 509-522.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1987.** Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 237-268.
- Cruden, R. W. 2000.** Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution* 222: 143-165.
- Dafni, A. 1992.** *Pollination ecology, a practical approach*. Oxford: Oxford University press.
- Dietrich, W. 1977.** The South American species of *Oenothera* sect. *Oenothera* (Raimannia, Renneria; Onagraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 64: 425-626.
- Endler, J. A. 1986.** *Natural selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Galen C. y J. Cuba. 2001.** Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skipitot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 55: 1963-1971.
- Gould, S. J. y N. Eldredge. 1966.** Allometry in size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews* 41: 587-640.
- Gregory, D. P. 1963-1964.** Hawkmoth pollination in the genus *Oenothera*. *Aliso* 5: 375-419.
- Herrera, C. M. 1996.** Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants 1996*. Chapman and Hall, New York, New York, USA. Pages 65-87.
- _____. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63: 251-275.
- _____. 1988. Biology and ecology of *Viola cazorlensis* I. Variability in floral traits. *Anales Jarden Botanical*. Madrid 45 (1): 233-246.
- Huxley, J. S. y G. Teissier. 1936.** Terminology of relative growth. *Nature* 137: 780-781.

- Lande, R. y S. Arnold. 1983.** The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210-1226.
- Levin, D.A. 2012.** Mating system shifts on the trailing edge. *Annals of Botany* 109: 613-620.
- Levinton, J. 1988.** Genetics, paleontology and macroevolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maad, J. y R. Alexandersson. 2004.** Variable selection in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae): phenotypic selection differed between sex functions in a drought year. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 642-650.
- Mauricio, R. y L. E. Mojonier. 1997.** Reducing bias in the measurement of selection. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 433- 436.
- Mazer, S. y N. Wheelwright. 1993.** Fruit size and shape: Allometry at different taxonomic levels in bird-dispersed plants. *Evolutionary Ecology* 7: 556-575.
- Mitchell, R. J. 1994.** Effects of floral traits, pollinator visitation, and plant size on *Ipomopsis aggregata* fruit production. *American Naturalist* 143:870-889.
- _____. 1993. Path analysis: pollination. In S. M. Scheiner and J. Gurevitch, eds. *Design and analysis of ecological experiments*. Chapman and Hall, New York. Pages 211-231.
- _____. 1992. Testing evolutionary and ecological hypotheses using path analysis and structural equation modeling. *Functional Ecology* 6: 123-129.
- Proctor, M. y P. Yeo. 1979.** The pollination of flowers. Williams Collins Sons and Co. Ltd. London.
- Ramírez, N. 1995.** Producción y costos de frutos y semillas entre modos de polinización en 232 especies de plantas tropicales. *Revista Biología Tropical* 43 (1-3): 151-159.
- Rausher, M. D. 1992.** The measurement of selection on quantitative traits: biases due to the environmental covariances between traits and fitness. *Evolution* 46: 616-626.
- Rice, W. 1989.** Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Richards, A. J. 1986.** Plant Breeding Systems. George Allen & Unwin Ltd., London.
- Ruiz Zapata, T. y M.T.K. Arroyo 1978.** Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10 (3): 221-230.
- Schlichting, C. D. 1986.** The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 667-693.
- Shipley, B. 1997.** Exploratory path análisis with applications in ecology and evolution. *American Naturalist* 149:1113-1138.

Schluter, D. 1988. Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42: 849-861.

Sokal, R. y F. Rohlf. 1998. Biometry. Third Edition. W.H. Freeman and Company, New York.

Ureta, E. y R. Donoso. 1956. Revisión de la familia Sphingidae (Lep., Het.) en Chile. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural 26: 237-256.

Weiner, J. y S.C. Thomas. 1992. Competition and allometry in three species of annual plants. *Ecology* 73(2): 648-656.

Worley, A.C. y S.C.H. Barrett. 2000. Evolution of floral display in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): direct and correlated responses to selection on flower size and number. *Evolution* 54: 1533-1545.

ANEXOS

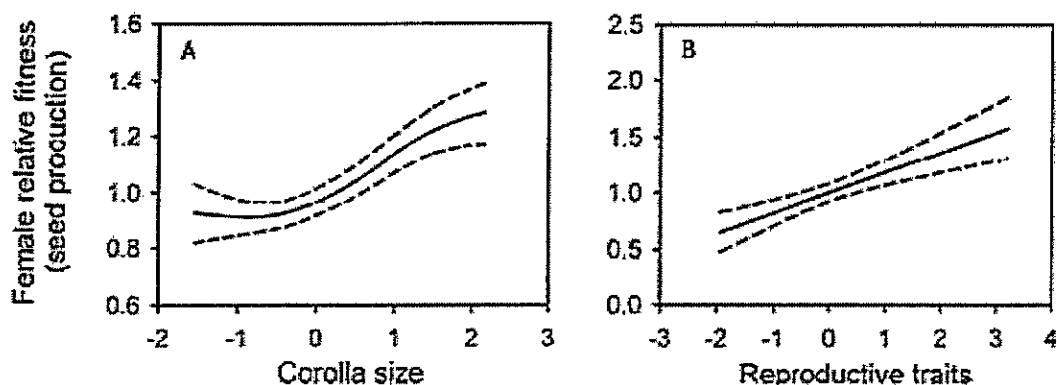
Anexo 1. Tabla resumen de los resultados de los estudios divulgados entre los años 1987 y 2007 en morfología floral.

Grad.lineal. valor - p	S			NS			NA		
Dif.lineal. valor - p	S	NS	NA	S	NS	NA	S	NS	NA
Altura de la planta x rasgo floral									8
Altura del tallo x rasgo floral									11
Área de la flor			6			50			4
Carpelo/flóres			3			2			
Diámetro basal x rasgo floral						1			4
Diámetro del cáliz			2			6			
Diámetro interno x longitud del tubo			1						1
Distancia nectario- estigma				1	2		2	4	
Flores estaminadas			1			1			1
Longitud antera			8			9		4	8
Longitud del carpelo							2	2	
Longitud del corpúsculo		2			1	2			
Longitud del pétalo	3		8	3	1	55	7	5	2
Longitud del pistilo	5								
Longitud de los estambres							2	2	
Longitud estigmas			2		3	1	1	5	
Longitud estigmas x rasgo floral			1			6	6	15	
Longitud del estilo		1				1			
Longitud del tubo	2			1					
Longitud del tubo x rasgo floral									3
Longitud ovario					1				
Longitud nectario			2						
Medidas de la corola	14	1	10	3	9	46	25	87	13
Mid-flowering x rasgo vegetativo									12
Nº de flores x rasgo vegetativo									16
Nº de flores x rasgo floral									13
Nº de tallos x rasgo floral									3
Nº de tallos x nº de flores									1
Nº de óvulos por flor	1		3			4			
Nectar x tamaño de la flor									4
PC (forma floral)			8			13			
Producción polen por flor			2			7			4
Separación antera - estigma	1		3			5			
Tamaño floral x rasgo floral									9
Tamaño del labelo		2		1	3		1	5	
Tamaño del pétalo x rasgo floral									9
Tamaño del sépalo							4	4	
Otras medidas de rasgos	4	4	10	7	18	22			2
TOTAL	32	11	84	18	41	235	50	133	128

Anexo 2. Coeficientes de selección fenotípica de rasgos de *Oenothera affinis* en la población de estudio en el año 2006.

Nota: Se muestran exponentes direccional estandarizado (β_i'), y estabilizador/disruptivo (γ_{ii}) y gradiente de selección (SE). Todos los parámetros son estandarizados a promedio cero y varianza única. El gradiente de selección es significativo bajo el ajuste de Bonferroni con una α -nivel = 0.05. **P<0.001, *P<0.05

Trait	(N = 100)	
	β_i' (SE)	γ_{ii} (SE)
Model I		
Corolla size	0.028 (0.058)	2.323 (0.765)**
Tube length	0.139 (0.046)**	0.809 (0.636)
Tube opening	0.011 (0.052)	-0.511 (0.536)
Open flowers	-0.020 (0.048)	-0.275 (0.307)
Plant size	0.050 (0.050)	0.270 (0.436)
R ²	0.145	0.293
Model II		
Corolla size	-0.023 (0.058)	3.018 (0.788)***
Tube length	0.093 (0.047)	-0.008 (0.720)
Tube opening	0.007 (0.050)	-0.545 (0.513)
Open flowers	-0.012 (0.046)	-0.200 (0.333)
Plant size	0.063 (0.048)	0.500 (0.458)
Reproductive organs	0.143 (0.049)**	1.529 (0.620)
R ²	0.218	0.428



Anexo 3. La estimación cúbica del *fitness* de *Oenothera affinis* para la población en el año 2006 en relación a: (A) tamaño de la corola ($\lambda = 0$), y (B) rasgos reproductivos ($\lambda = 0$). Las líneas entrecortadas ± 1 SE estiman los valores de bootstrap con 1000 réplicas.

Anexo 4. Tabla comparativa de los caracteres florales entre la población de estudio y una población con alta tasa de polinización en Argentina, año 2006.

Character	Argentina		Chile		F
	Mean (SE)	N	Mean (SE)	N	
Corolla area (mm ²)	3564.03 (61.97)	175	1247.21 (30.65)	100	1174.55***
Corolla perimeter (mm)	326.45 (6.99)	175	163.61 (2.85)	100	677.46***
Corolla diameter (mm)	76.70 (0.67)	175	44.18 (0.99)	100	765.61***
Petal width (mm)	37.59 (0.36)	175	24.18 (0.29)	100	678.88***
Tube length (mm)	102.70 (0.58)	186	37.36 (0.40)	100	8268.14***
Tube opening (mm)	4.29 (0.04)	171	2.73 (0.05)	100	584.10***
Anther length (mm)	10.47 (0.12)	173	5.51 (0.09)	100	914.73***
Stigma length (mm)	7.57 (0.09)	175	6.22 (0.09)	100	91.26***
Ovary length (mm)	18.71 (0.15)	186	12.79 (0.17)	100	671.47***
Nectar volume (μL)	13.66 (1.88)	20	0.84 ± 0.17	41	163.86***
Nectar concentration (°Brix)	32.36 (0.49)	20	25.04 ± 1.17	12	31.05***
Flowers open per night	1.28 (0.04)	213	4.97 (0.20)	143	1145.39***
Plant height (cm)	46.35 (0.89)	186	51.25 (1.37)	100	8.54**
Number of branches	6.59 (0.32)	186	18.80 (0.87)	100	251.70***
Seed production per fruit	300.59 (5.71)	186	100.43 (4.44)	100	431.41***

Notes: All F-values are significant after sequential Bonferroni adjustment with a tablewise α -level = 0.05

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$

1