

UCH-FC
MAG-^B
C961
C-1

**SELECCIÓN MEDIADA POR POLINIZADORES Y MANIPULACIÓN
EXPERIMENTAL SOBRE EL FENOTIPO FLORAL EN *Chloraea bletioides*
(ORCHIDACEAE).**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

por

MARCELA CUARTAS DOMÍNGUEZ

Enero, 2007



Directores de Tesis:

Dr. Rodrigo Medel Contreras, Dr. Ramiro Bustamante Araya

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

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

MARCELA CUARTAS DOMÍNGUEZ

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 2 de Marzo del año 2007.

Directores de Tesis:

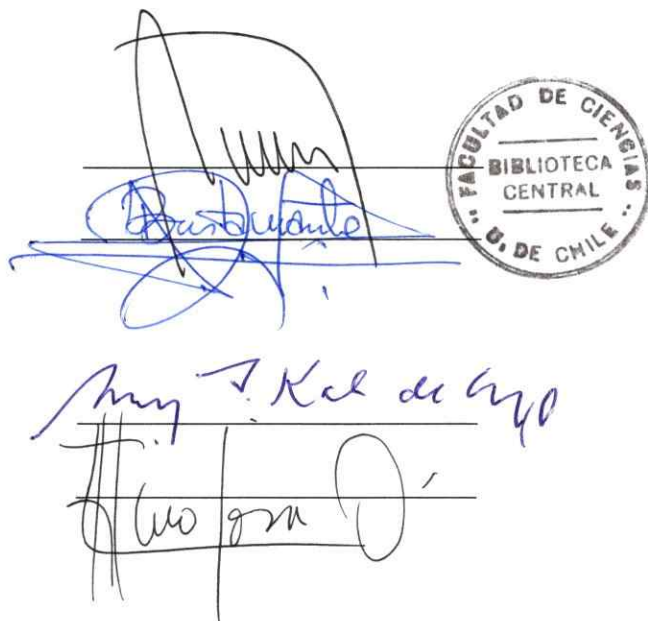
Dr. Rodrigo Medel Contreras

Dr. Ramiro Bustamante Araya

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Mary Kalin-Arroyo

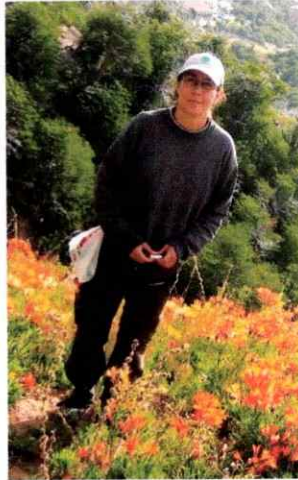
Dr. Luis Felipe Hinojosa Opazo



The image shows two handwritten signatures in blue ink. The first signature is for Ramiro Bustamante Araya, and the second is for Mary Kalin-Arroyo. To the right of the signatures is a circular stamp that reads "FACULTAD DE CIENCIAS BIBLIOTECA CENTRAL U. DE CHILE".

A mis abuelos *Laura, Dorancé, Emilia, Alfonso* y
a mis padres *Amparo y Alfonso*,
por su legado.





Nací el 28 de septiembre de 1976 en un pueblo del Departamento del Valle del Cauca llamado Caicedonia, en Colombia. Soy la primera de cinco hermanos. Mis padres ambos con estudios universitarios, me inculcaron el amor por la educación y el compromiso que se debe asumir con los sueños que se tienen en la vida. Estudié el bachillerato en la Normal María Inmaculada y a los 17 años ingresé a la Universidad del Valle con sede en Caicedonia, al programa de Ingeniería Química, teniendo en mente que mi deseo no era ser Ingeniera. A los 19 años me trasladé a la sede de Univalle en la ciudad de Cali a continuar con mis estudios. Estando allí inmediatamente pedí traslado al programa de Biología, del cual me gradué en el año 2003. Mi trabajo de grado fue sobre distribución de orquídeas epífitas en un bosque nublado en zona rural de Cali. Durante los años 2003 y 2004, trabajé como curadora de muestras botánicas en un proyecto de investigación en Ecuador financiado por la National Geographic Society, a cargo del Dr. Philip Silverstone-Sopkin en participación conjunta entre el Herbario Nacional del Ecuador (QCNE) y el Herbario de la Universidad del Valle (CUVC). Mi experiencia como Bióloga ha sido principalmente con plantas. Desde que tome la clase de Evolución Biológica en Univalle con el profesor Manuel Giraldo he sentido una gran pasión por estos temas, por esto decidí realizar estudios de postgrado en Ecología Evolutiva. Dentro de América Latina la Universidad de Chile era la mejor opción, así entré en el año 2005 al programa de Magíster en Ecología y Biología Evolutiva, con el Dr. Rodrigo Medel como asesor. Dentro de las plantas mi interés primordial son las orquídeas y espero seguir investigando la ecología evolutiva de éstas. Quiero realizar estudios de doctorado y son mis sueños llegar a ser una gran investigadora, una gran docente y una gran especialista en la familia Orchidaceae.

Correo electrónico: marcelcd28@yahoo.es

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Profesor Rodrigo Medel Contreras y a la Dra. Carezza Botto-Mahan por el apoyo, la dirección, la colaboración con la recolección de datos en el campo y por la revisión de este manuscrito. Al Profesor Ramiro Bustamante por la codirección del proyecto y por todo el apoyo brindado. Al personal del Laboratorio de Ecología Evolutiva por el soporte técnico. Al Dr. Hugo Torres C. por la colaboración con la identificación de los insectos colectados (en especial con las hormigas). A los señores Franz Baehr y Patricio Novoa por toda la colaboración e interés prestados. A Karina Bacelli por la asistencia en el campo. A Karina Bacelli y Ricardo Loebell por el apoyo, el cariño, la compañía y la paciencia en todo este proceso. A Alejandra Troncoso J. y Renzo Vargas R. por todo el apoyo, el cariño y la compañía. A mis compañeros del 'Círculo Eclécticos': Alejandra Troncoso, Catalina Sabando, Karin Maldonado, Pablo Razetto y Renzo Vargas, por las charlas pertinentes, por los consejos y sugerencias. A mi familia por la confianza y el apoyo incondicional.

Esta tesis ha sido financiada por FONDECYT 1050199 a cargo del Dr. Rodrigo Medel C. y por la Beca de Magíster del Proyecto ICM, código P05-002.



ÍNDICE

	Página
PÁGINAS PRELIMINARES	
Página de título	i
Informe de aprobación	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Lista de figuras	v
Lista de tablas	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 General	5
2.2 Específicos	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1 Historia natural de la especie y lugar de estudio	6
3.2 Trabajo de campo y análisis de la información	10
3.2.1 Análisis de selección fenotípica	13
3.2.2 Experimento manipulativo	15
3.2.3 Análisis estadísticos	17
3.2.3.1 Estadística descriptiva	17
3.2.3.2 Análisis de selección	17
3.2.3.3 Elección de los caracteres para el análisis	21
3.2.3.4 Experimento manipulativo	23
3.2.3.5 Contraste de metodologías	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Insectos y tasa de visitas	25
4.2 Estadística univariada y diferenciales de selección	27
4.3 Selección direccional, estabilizadora/disruptiva y correlacional	29
4.4 Experimento manipulativo y validación del modelo	37
5. DISCUSIÓN	39
5.1 Éxito de polinización femenino y masculino	39
5.2 Selección sobre rasgos florales	41
5.3 Interacción floral	45
6. CONCLUSIONES	48
7. LITERATURA CITADA	50
Anexo A: Fotografías de insectos visitando flores de <i>Chloraea bletioides</i> en el sitio de estudio	57
Anexo B: Resultados de regresiones logísticas entre la producción de frutos y la remoción de polinios y medidas morfométricas tomadas a flores sin modificar	58



LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Fotografías de <i>Chloraea bletioides</i> Lindl. en el sitio de estudio ...	7
FIGURA 2: Rasgos florales medidos a la especie de estudio	14
FIGURA 3: Vista frontal de una flor de <i>Chloraea bletioides</i> , mostrando las morfologías florales resultantes de los tratamientos experimentales	16
FIGURA 4: Estimación no paramétrica de la función fitness (f) para los caracteres que estuvieron experimentando selección direccional	34
FIGURA 5: Representación tridimensional de la superficie de selección bivariada que relaciona el fitness relativo femenino (wf) con el ancho de la flor en vista frontal y el tubo floral	35
FIGURA 6: Representación tridimensional de la superficie de selección bivariada que relaciona el fitness relativo femenino (wf) y el fitness relativo masculino (wm) con el lóbulo central del labelo y el tubo floral	36



LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Insectos observados en flores de <i>Chloraea bletioides</i> en la población de estudio	26
TABLA 2: Número de individuos, promedios y desviaciones estándar de los caracteres y las medidas de fitness en la población de <i>Chloraea bletioides</i>	27
TABLA 3: Número de observaciones y oportunidad para selección (I) femenina y masculina en la población de <i>Chloraea bletioides</i>	28
TABLA 4: Diferenciales de selección estandarizados (S') de seis caracteres a través de la función femenina y masculina en <i>Chloraea bletioides</i>	29
TABLA 5: Análisis de selección fenotípica para la función femenina sobre seis caracteres en <i>Chloraea bletioides</i>	32
TABLA 6: Análisis de selección fenotípica para la función masculina sobre seis caracteres en <i>Chloraea bletioides</i>	33
TABLA 7: Efecto de la manipulación factorial de los sépalos laterales y del lóbulo central del labelo sobre el éxito de polinización femenino y masculino para flores de <i>Chloraea bletioides</i>	37



RESUMEN

En este trabajo se examinó la magnitud, dirección y forma de la selección natural mediada por polinizadores sobre rasgos morfológicos de la orquídea endémica chilena *Chloraea bletioides* usando componentes masculinos y femeninos de la adecuación biológica. Los resultados revelaron selección total positiva para la altura de la planta y el número de flores pero ausencia de selección sobre los caracteres florales. Respecto a selección directa, se detectó selección direccional positiva sobre el número de flores. Asimismo, se detectó selección correlacional negativa entre el lóbulo central del labelo y el tubo floral indicando la existencia de selección sobre combinaciones opuestas de tales caracteres. La oportunidad para selección difirió entre el componente femenino y masculino de la adecuación, sugiriendo que la evolución floral en esta especie es más factible de ocurrir a través del sexo femenino. Adicionalmente a las estimaciones de selección, se evaluó experimentalmente y mediante modificación fenotípica el impacto de la polinización sobre la correlación y potencial integración de apéndices florales provenientes de diferentes verticilos. Se removieron las puntas de los sépalos laterales y el lóbulo central del labelo en un diseño factorial de 2 x 2. Los resultados revelaron ausencia de efecto sobre ambos componentes sexuales. Los resultados experimentales no significativos son consistentes con los diferenciales y gradientes de selección obtenidos para estas plantas en condiciones naturales. No obstante, la observación de selección correlacional sobre el lóbulo del labelo y el tubo floral en el estudio de selección, sugiere que experimentos manipulativos sobre estos rasgos podrían ser de interés para evaluar la integración funcional y adaptativa de estos caracteres.

ABSTRACT

In this work I quantified the magnitude, direction and form of pollinator-mediated selection acting upon morphological traits in the Chilean endemic orchid *Chloraea blettioides*. Results revealed strong selection differentials for plant height and flower number but absence of selection for flower characters. Multivariate analysis of selection revealed a strong and positive directional selection gradient for flower number and a negative correlational gradient for alternative combinations of traits. The correlation between the labellum and flower tube was under negative correlational. The opportunity for selection was higher in the female rather than male sexual function, suggesting that floral evolution in this species may occur mainly through female function. In addition to estimates of selection coefficients, I experimentally evaluated, through phenotypic modification, the impact of pollination on the correlation and potential integration of flower traits coming from different whorls. I removed the tip of the lateral sepals and the central lobe of the labellum in a 2 x 2 factorial design. Results revealed absence of fitness impact irrespective of the sexual function on which fitness was measured. Overall, the experimental results were consistent with the selection coefficients estimated from phenotypic selection analyses. Notwithstanding, the observation of significant correlational selection for labellum x flower tube suggests that experimental studies performed on these characters may be of interest to evaluate the functional and adaptive integration of flower design in orchids.

1. INTRODUCCIÓN

La selección natural puede modificar el promedio, la varianza y la covarianza de los rasgos métricos de los organismos (Lande y Arnold 1983, Phillips y Arnold 1989, Brodie et al. 1995). La mayoría de las discusiones sobre la evolución correlacionada de rasgos se han enfocado tradicionalmente sobre sus causas genéticas (pleiotropía, ligamiento) y del desarrollo (e.g., Lande 1980, Falconer 1989), pero la covarianza entre rasgos puede también ser el producto adaptativo de selección correlacional, surgiendo cuando alguna combinación particular de rasgos es favorecida a costa de otras combinaciones (Endler 1986, 1995). Se ha sugerido que la selección correlacional sobre conjuntos de caracteres puede ser la forma más común de operación de la selección natural (Schluter y Nychka 1994). No obstante, evidencias sobre este punto son limitadas en la literatura.

Darwin designó a las Orchidaceae como la familia de plantas donde la evolución floral puede ser mejor estudiada. Estas plantas con su 'interminable variación' en los artilugios florales para la reproducción sexual le proporcionaron un amplio rango de posibilidades para selección natural (Darwin 1862). Orchidaceae es la familia de plantas más rica en especies, conteniendo tal vez más de 25 000 especies (Atwood 1986). Al igual que otras angiospermas, la mayoría de las orquídeas provee una recompensa al polinizador (e.g., néctar), pero 8 000-10 000 especies actúan por engaño, es decir, no proveen recompensa a los polinizadores (Nilsson 1992). Aunque algunas orquídeas son auto-polinizadas (autogamas) y unas pocas son polinizadas por aves, la mayoría de las especies son polinizadas por insectos (Nilsson 1992). No obstante, en la mayoría de los grupos la

evolución ha conducido a rasgos florales muy elaborados (ver e.g., Darwin 1862, Dressler 1990, Nilsson 1992).

El ajuste entre las adaptaciones de las flores polinizadas por insectos y la morfología de los insectos especializados, son un ejemplo clásico de coevolución estrecha (Proctor et al. 1996). Estas asociaciones soportan la visión prevaleciente que la coevolución planta-polinizador promueve la diversidad floral, la cual puede ser explicada a través de la selección mediada por los polinizadores. En años recientes muchos estudios han medido selección por los polinizadores sobre rasgos florales cuantitativos evaluando la correlación entre el fitness y la variación natural de dichos rasgos (e.g., Galen 1989, Schemske y Horvitz 1989, Young y Stanton 1990, Campbell et al. 1991, Herrera 1993, Andersson y Widén 1993, Wilson 1995, Conner et al. 1996, Conner y Rush 1997, Maad 2000, Medel et al. 2003), o entre el fitness y variación inducida experimentalmente (e.g., Inoue 1986, Cruzan et al. 1988, Nilsson 1988, Andersson 1994, Conner y Rush 1996, Botto-Mahan y Ojeda-Camacho 2000, Herrera 2001, Malo et al. 2001, Pohl et al. 2006). La mayoría de estudios bajo condiciones naturales sugiere que el incremento de los rasgos florales incrementa el éxito reproductivo. Asimismo, la mayoría de estudios experimentales sugiere una disminución en el fitness al modificar rasgos florales.

La selección puede afectar múltiples caracteres simultáneamente y puede ocurrir como un resultado de caracteres que están enlazados genéticamente o debido a correlaciones alométricas (Endler 1986, Brodie et al. 1995). Sólo dos estudios han intentado medir selección multivariada en orquídeas (Tremblay et al. 2005) y ambos se enfocaron sobre características fenológicas, vegetativas y florales. O'Connell y Johnston

(1998) hallaron selección correlacional negativa sobre la altura de la planta con el tiempo de floración en una de dos poblaciones de la orquídea *Cypripedium acaule*, mientras Maad (2000) no halló evidencia de selección correlacional en *Platanthera bifolia*. A pesar que las herramientas analíticas para estudios de selección correlacional han estado disponibles desde la década de 1980 (Lande y Arnold 1983, Mitchell-Olds y Shaw 1987, Phillips y Arnold 1989), sólo unos pocos estudios han examinado directamente selección correlacional sobre rasgos florales (O'Connell y Johnston 1998, Caruso 2000, Gómez 2000, Maad 2000). Estas investigaciones no siempre obtienen clara evidencia de este tipo de selección sobre rasgos florales morfométricos, posiblemente porque se enfocaron sobre un rango relativamente estrecho de varianza fenotípica natural de los rasgos florales (Herrera 2001).

Herrera (2001) realizó un experimento manipulativo aumentando la variabilidad floral en *Lavandula latifolia* (Labiatae) para probar los efectos de la interacción entre rasgos sobre el éxito de polinización. La variación artificial de la corola no tuvo efectos significativos sobre el éxito de polinización femenino ni masculino y dos morfos aberrantes (carecían de la integración de la corola) tuvieron una ventaja marginalmente significativa en la fecundidad sobre los morfos naturales. Estos resultados no permitieron sostener la hipótesis que la selección correlacional mediada por los polinizadores contribuye a mantener la integración de la corola en *L. latifolia* (Herrera 2001). En este contexto, experimentos manipulativos que aumenten artificialmente la variabilidad floral y evalúen los efectos de la interacción entre rasgos sobre el éxito de polinización pueden resultar cruciales para valorar si procesos adaptativos más que restricciones genéticas (ligamiento, pleiotropía) y de desarrollo, son responsables de la

estrecha integración de las partes florales comúnmente observadas en las plantas polinizadas por animales (Herrera 2001).

En el presente trabajo se realizó un experimento manipulativo para valorar cuánto y en qué manera los sépalos laterales y el lóbulo central del labelo influyen el éxito reproductivo en la orquídea *Chloraea bletioides*. También fueron tomadas medidas de rasgos morfológicos florales y vegetativos a plantas en condiciones naturales para evaluar selección fenotípica mediada por polinizadores sobre los caracteres individuales y sobre combinaciones de caracteres. Se contrastaron los resultados obtenidos a partir de ambas aproximaciones para valorar si la selección correlacional generada por los polinizadores es relevante para la integración fenotípica de los caracteres florales modificados. La manipulación se focalizó en rasgos florales que pertenecen a verticilos diferentes: los sépalos que hacen parte del cáliz de la flor y el labelo que forma parte de la corola. Dado que en *C. bletioides* estas estructuras florales probablemente funcionan juntas en el proceso de atracción de polinizadores, se esperaría que estuvieran sujetas a selección correlacional. Por consiguiente, para probar esta hipótesis los objetivos de esta investigación fueron: (1) Documentar selección fenotípica causada por los insectos polinizadores sobre las partes florales usando los componentes femeninos y masculinos del fitness. (2) Explorar la consistencia de mediciones correlacionales de selección sobre el fenotipo floral con evidencia experimental que modifica dicho fenotipo.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

Documentar selección fenotípica sobre rasgos florales mediada por los insectos polinizadores a través de ambas funciones sexuales en *Chloraea bletioides*, y explorar el efecto de la selección sobre rasgos correlacionados en ambos sexos.

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 Evaluar el éxito de polinización femenino (fructificación) y el éxito de polinización masculino (número de polinios removidos) para cuantificar la selección sobre rasgos florales.

2.2.2 Evaluar mediante un experimento manipulativo la importancia que tiene la integración de los sépalos laterales y el lóbulo central del labelo sobre la fructificación y la remoción de polinios.

2.2.3 Contrastar metodologías correlacionales de selección con experimentos manipulativos sobre el fenotipo floral.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Historia natural de la especie y lugar de estudio

Chloraea blettioides Lindl. es una orquídea terrestre endémica de Chile (Figura 1), distribuida en las Regiones V, VI, y Metropolitana (Correa 1969, Lehnebach 2003, Novoa et al. 2006). Florece desde los primeros días de Noviembre hasta finales de Enero. Las flores individuales permanecen abiertas por aproximadamente tres semanas, y envejecen y mueren aproximadamente 5 días después de la polinización (observación personal). La inflorescencia pauciflora generalmente produce de 1 a 5 flores grandes (Figura 1A), aunque algunas veces se observan individuos con hasta 10 flores. Las flores son blancas con nervaduras y ápices verdes (Figura 1B). El sépalo dorsal es redondeado y generalmente obtuso con una mancha verde en el ápice. Los sépalos laterales son estrechos hacia el ápice dentado, el cual posee una mancha de color verde oscuro. Los pétalos tienen 5 nervios verdes y la zona internerval es verdosa. El labelo (Figura 1B, 1D) es cortamente unguiculado, trilobulado. El lóbulo central es recorrido hacia el tubo floral por lamelas enteras de color verde. El ápice de este lóbulo tiene una cresta y una mancha verde oscura. Hay una antera (Figura 1C, 1D) que contiene dos polinios (polen aglutinado en masas). La columna (androceo, estilo y estigmas fusionados) de *C. blettioides* es roja y en su base hay dos canales nectaríferos (Figura 1C, 1D).

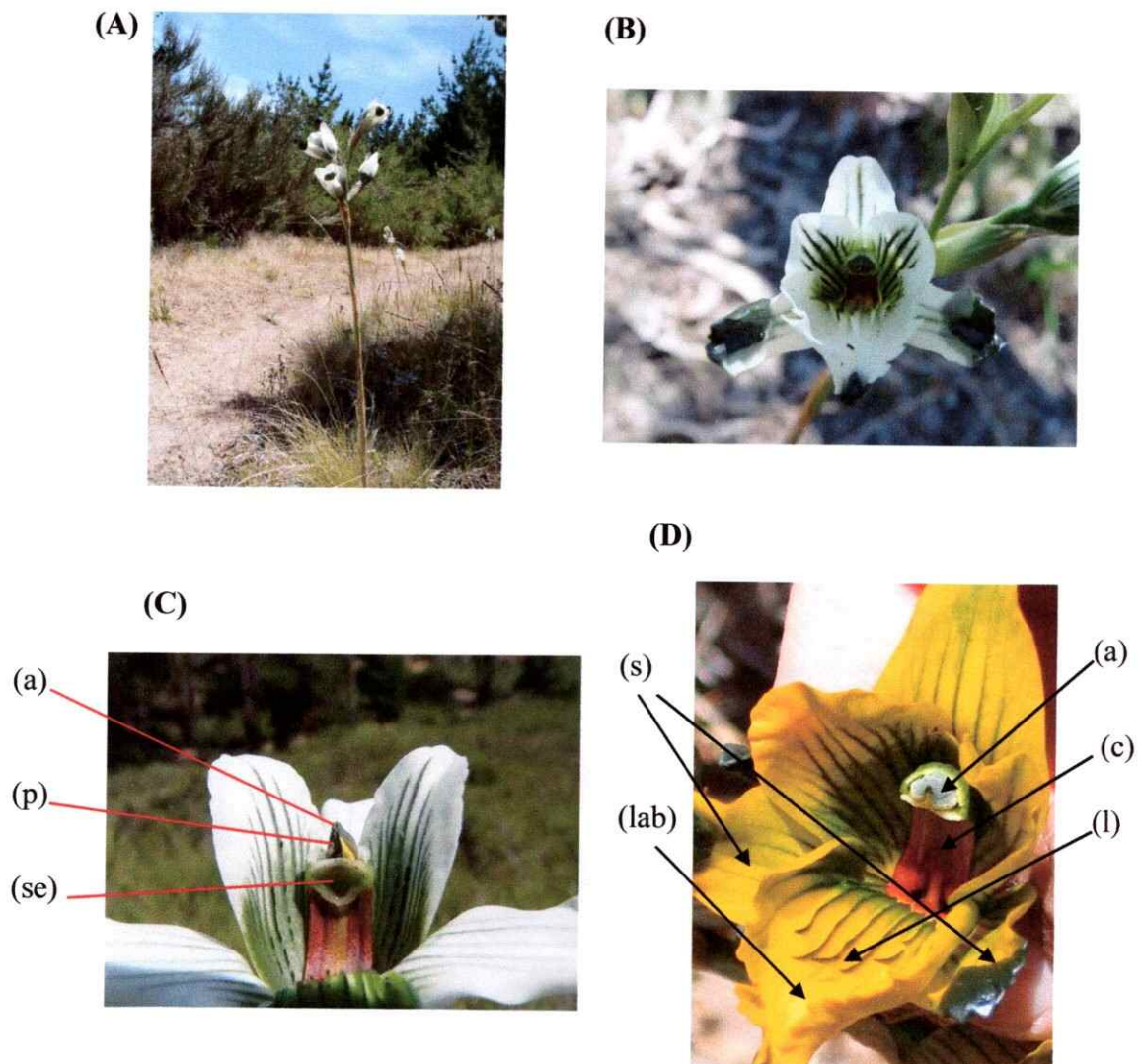


Figura 1. *Chloraea bletioides* Lindl. en el sitio de estudio: (A) Hábito de la planta, (B) flor de un individuo. (C) Detalle de la columna: se observa la antera (a) dentro de la cual hay un polinio (p) (el otro polinio fue removido); justo debajo de la antera se ve la superficie estigmática (se). (D) *Chloraea bletioides* Lindl. var. *lutea*, se observan la antera (a), la columna (c), los sépalos laterales (s), el labelo (lab) y sobre este unas estructuras laminares llamadas lamelas (l). Para más detalles ver el texto. Fotografías (A), (B) y (C) por R. Medel.

A pesar de las manchas viscosas de las flores, de las conspicuas “guías de néctar” sobre el labelo y de los canales nectaríferos, esta orquídea -como otras especies del género- no

produce néctar (Lehnebach y Riveros 1999, Novoa 2005, obs. pers.). Así pues, es posible que esta especie sea polinizada por engaño.

Algunos insectos visitantes que se han observado en poblaciones de esta especie son: el escarabajo *Arctodium* sp. (Coleoptera), la abeja *Centris nigerrima* (Hymenoptera), el abejorro *Bombus terrestris* (Hymenoptera), hormigas de los géneros *Camponotus* y *Solenopsis* (Hymenoptera), entre otros (Novoa 2005, Humaña et al. comunicación personal). En la población de estudio se observó a estas especies visitando flores, pero sólo se detectó a *Centris nigerrima* efectivamente polinizando o con polinios adheridos a su cuerpo. En otras poblaciones se ha observado individuos de *Arctodium* sp. con polinios adheridos a sus élitros (Novoa 2005). Aunque en el sitio de estudio se observó varias veces a estos coleópteros dentro de las flores, nunca se vio alguno portando polinios. En el Anexo A se muestran algunos insectos visitando flores de *C. bletioides* en el lugar de estudio. El mecanismo de polinización para el caso de las abejas es como sigue: estas llegan a una flor y aterrizan en el labelo, caminan hacia el tubo floral. Una vez que quieren salir, a menudo giran en 180° y recorren de nuevo el labelo hacia la salida. Al hacer esto la abeja generalmente roza los polinios que se adhieren a través del viscidio (con una cubierta pegajosa) a su cabeza o a su tórax. De esta manera es removido el polen de cada flor. Cuando una abeja que porta polinios adheridos ingresa a una flor, generalmente estos se pegan a la superficie estigmática (justo debajo de la antera, Figura 1C) cuando la rozan. De esta manera el polen es recibido por una flor.

En un estudio de polinización para la especie endémica chilena *Chloraea lamellata* se documentó que ni autogamia directa ni agamospermia (apomixis)

estuvieron involucradas en la producción de semillas (Lehnebach y Riveros 2003). Otro estudio de polinización para cinco taxa del género *Chloraea*, incluida *C. bletioides*, mostró que estas especies son auto-compatibles, pero los resultados documentaron que el porcentaje de auto-polinización automática (autogamia) en condiciones naturales para todas ellas fue nulo (Humana et al. datos sin publicar). Todos estos resultados indican que los polinizadores parecen ser esenciales para la reproducción en este género de orquídeas.

Chloraea bletioides, una especie que no presenta autogamia y requiere de polinizadores para su reproducción, es una planta adecuada para realizar estudios de selección mediada por polinizadores. Además, en esta especie (como en la mayoría de las orquídeas) ambos componentes sexuales pueden ser estimados de una manera relativamente fácil: el fitness femenino puede ser evaluado como frutos producidos, y el fitness masculino como remoción de polinios, ya que son transportados como paquetes totales por los polinizadores (Nilsson 1992). Se ha demostrado que la remoción de polinios está correlacionada con la donación/paternidad en otra especie de orquídea (Nilsson et al. 1992) y en otras plantas con polinios (Broyles y Wyatt 1990a, b). Se decidió no evaluar la fecundidad (número de semillas producidas) que es otro componente importante del fitness femenino, porque en orquídeas llevar a cabo este proceso es complicado ya que en un solo fruto puede llegar a haber cientos de miles de semillas (Proctor et al. 1996, Lehnebach y Riveros 2003, Tremblay et al. 2005), lo cual hace del conteo una tarea dispendiosa.

Este estudio fue llevado a cabo en un sector de los Pinares de Algarrobo, Municipio de Algarrobo, V Región. Las coordenadas son 33° 24' 6,8" S, 71° 38' 58,6" W. El sitio se encuentra a una altura de 101 m.s.n.m., y tiene un área aproximada de 8 000 m². Varias especies de orquídeas endémicas consideradas como escasas o raras crecen en este sitio, entre ellas *Chloraea cristata*, *C. heteroglossa*, *C. multiflora*, *Gavilea longibracteata* (obs. pers.). Los individuos de *C. bletioides* se encuentran generalmente creciendo bajo árboles de pino (*Pinus radiata*) junto a plantas de *Chusquea cumingii* (Poaceae) y *Eryngium paniculatum* (Apiaceae). Los alrededores del sitio donde se encuentra la población de estudio han sido bastante intervenidos en las últimas décadas, principalmente por reemplazo del bosque nativo por sembradíos de pino y por proyectos inmobiliarios (Baehr, com. pers.). En el área de estudio se encontraron alrededor de 200 individuos de *C. bletioides* en flor.

3.2 Trabajo de campo y análisis de la información

El trabajo de campo se llevó a cabo desde el mes de Diciembre del año 2005 hasta Marzo del 2006. Se marcaron 140 plantas de *C. bletioides*. A cada planta se le midió la altura total con una cinta métrica, se le contó el número de flores y al final de la floración se registró el número de frutos producidos y el número de polinios removidos. De los 140 individuos se escogieron aquellos que tuvieron botones florales cerrados al momento de marcar para la toma de medidas morfométricas y para el experimento manipulativo. En cada individuo se eligieron dos botones al azar: A uno de los botones se le tomaron medidas de rasgos florales cuando estuvo completamente abierto y el otro

botón se dejó para el experimento manipulativo, modificándose según el tratamiento asignado una vez que estuviera abierto (ver más adelante).

Para evaluar la importancia de los rasgos florales sobre el éxito reproductivo, en 72 plantas se tomaron diversas medidas florales cuantitativas sin modificar la flor (una flor por planta) con el fin de explorar el efecto que ejerce la selección sobre ciertas combinaciones de rasgos. Además, para evaluar la importancia de la integración floral sobre el éxito reproductivo, se realizó un experimento manipulativo en un diseño factorial de 2 x 2 a 124 flores (una flor por planta), modificando los sépalos laterales y/o el lóbulo central del labelo, con el objetivo de evaluar el éxito de polinización de estas flores bajo cada tratamiento.

Dado que *C. bletioides* tiene manchas florales muy vistosas en las puntas de los sépalos laterales y en la punta del lóbulo central del labelo, lugares en donde fueron realizados los cortes a las flores experimentales, se realizó regresión logística sobre los datos para detectar posibles relaciones de dichas manchas florales con la remoción de polinios y/o la fructificación de las flores, con el fin de descartar la posibilidad de que la atracción de los polinizadores se afectara por la carencia de las manchas florales y no por la modificación de la integración floral en esta especie. Los resultados que se muestran en el Anexo B permiten concluir que no hay relación significativa entre el tamaño de las manchas florales y la remoción de polinios o la producción de frutos en *C. bletioides*, lo cual permite evaluar experimentalmente el efecto de los sépalos laterales y el labelo sobre el éxito reproductivo.

Tanto para el experimento como para las medidas de selección se separaron los análisis por sexos considerando el desarrollo de frutos (0 ó 1) como indicador del éxito

de polinización femenino (fitness femenino) y el número de polinios removidos (0, 1 ó 2) como indicador del éxito de polinización masculino (fitness masculino). Para el análisis de selección se contó el número total de polinios removidos y de frutos producidos por planta ($n = 72$). Se consideraron las medidas morfométricas tomadas a cada flor por individuo como un promedio de los valores de estos rasgos para el individuo, ya que las flores dentro de cada planta prácticamente no exhiben variación. A diferencia del análisis de selección, en el experimento manipulativo se registró la remoción de polinios y fructificación sólo a las flores experimentales.

Para cada planta estudiada, el fitness absoluto femenino (W_f) fue estimado por el número total de frutos producidos y el fitness absoluto masculino (W_m) por el número total de polinios removidos. El fitness relativo femenino (w_f) fue calculado como W_f/\bar{W}_f , donde \bar{W}_f es el fitness absoluto femenino promedio de los individuos estudiados. El fitness relativo masculino (w_m) fue similarmente calculado como W_m/\bar{W}_m , donde \bar{W}_m es el fitness absoluto masculino promedio.

En la población de estudio ($n = 200$) la actividad de los insectos visitantes fue observada durante 30 días entre los meses de diciembre del 2005 y enero del 2006. Períodos de observación de media hora fueron efectuados durante el día desde las 09:00 a las 21:00 horas, intercalando al azar las zonas de observación a lo largo del sitio de estudio. Los insectos fueron colectados y posteriormente identificados. La tasa de visitas fue calculada como el número de visitas por flor⁻¹ por hora⁻¹.

3.2.1 *Análisis de selección fenotípica*

Utilizando un vernier digital (precisión 0,01 mm) se midieron los siguientes rasgos morfológicos a las flores marcadas ($n = 72$) (Figura 2):

- a) Ancho de flor de frente (medida de la longitud de punta a punta entre los dos sépalos laterales).
- b) Alto de flor (longitud entre la punta del labelo y la punta del sépalo superior).
- c) Ancho y largo de un sépalo lateral.
- d) Ancho y largo del lóbulo central del labelo.
- e) Largo del tubo floral.
- f) Longitud total de la flor.
- g) Ancho y largo de las manchas de los sépalos laterales.
- h) Ancho y largo de la mancha del lóbulo central del labelo.

Además de estos rasgos florales, para cada planta:

- i) Se contó el número total de flores.
- j) Se midió el largo total (distancia lineal desde el suelo hasta el tope de la flor más alta).

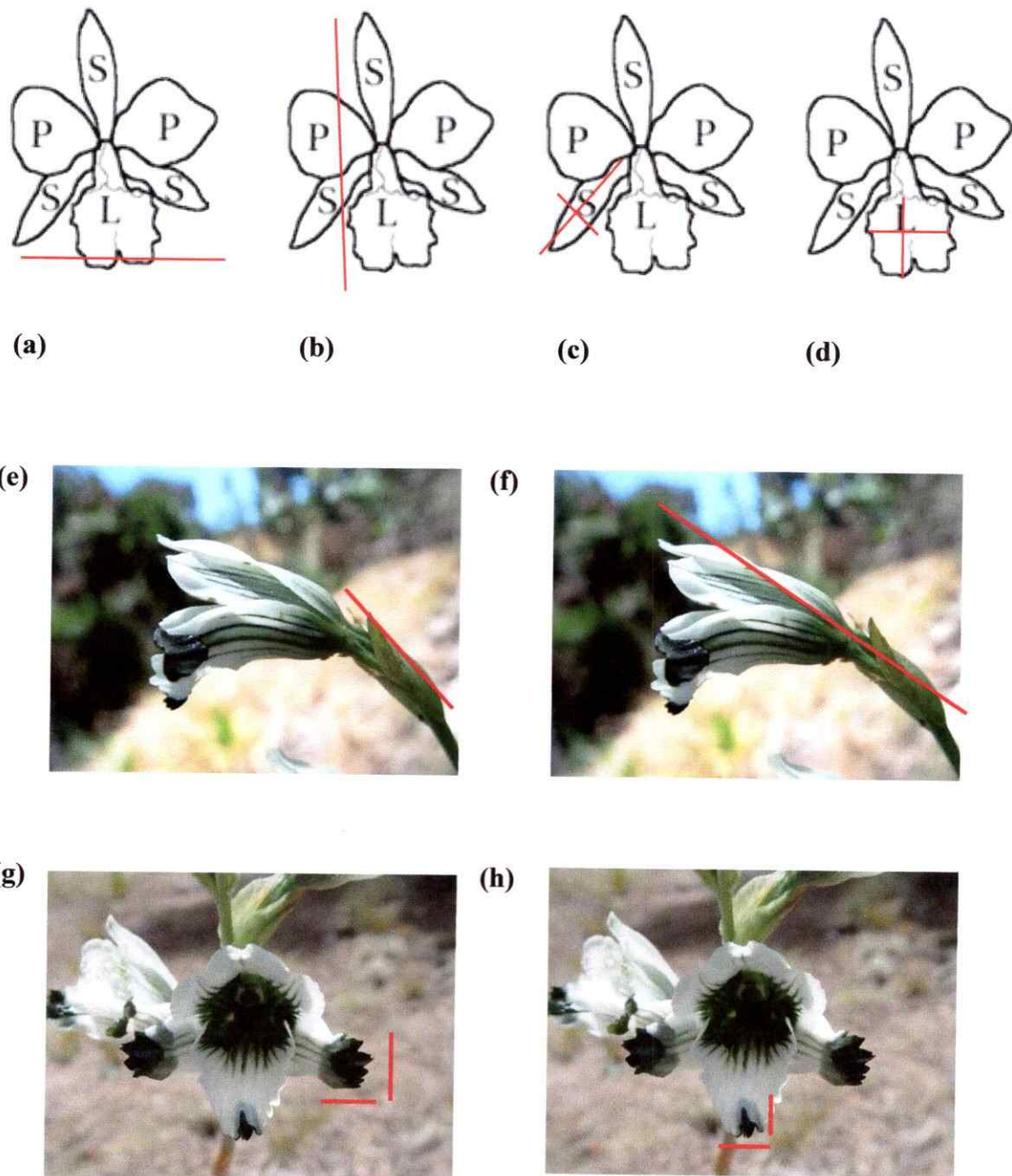


Figura 2. Rasgos florales medidos ($n = 72$). (a) Ancho de flor, (b) alto de flor, (c) ancho y largo de un sépalo lateral, (d) ancho y largo del lóbulo central del labelo, (e) largo del tubo floral, (f) longitud total de la flor, (g) ancho y largo de las manchas de los sépalos laterales, y de la mancha del lóbulo central del labelo (h). Fotografías por R. Medel.

Respecto al éxito reproductivo, se registró para cada individuo el número de frutos con semillas y de polinios removidos al final de la temporada de floración (Marzo-Abril del 2006). Luego que muchos frutos abrieron y las semillas se dispersaron, las inflorescencias marchitas de las plantas medidas fueron colectadas en bolsas de papel y llevadas al laboratorio para confirmar la remoción de polinios.

3.2.2 *Experimento manipulativo*

Las manipulaciones experimentales de las flores ($n = 124$) fueron llevadas a cabo de acuerdo a un diseño factorial completo de dos vías, con las puntas de los sépalos laterales y el lóbulo central del labelo como los dos factores involucrados. Dos niveles fueron usados para cada factor, a saber Control (sin manipulación) y Tratamiento (manipulación). Para los sépalos laterales la manipulación consistió en cortar las puntas de estos justo por encima de sus manchas verde oscuras (aproximadamente el 30% del sépalo en su extremo distal), mientras la manipulación del labelo involucró el corte del lóbulo central de este a la altura de las lamelas (aproximadamente el 33% del labelo) (ver Figura 3). Las cuatro morfologías florales resultantes de la combinación de estos dos factores con dos niveles se observan en la Figura 3. Los cortes fueron realizados con tijeras de disección finas, y se hicieron cuando las flores empezaron a abrir, antes de que estuvieran totalmente abiertas y los polinizadores tuvieran acceso al interior de estas.

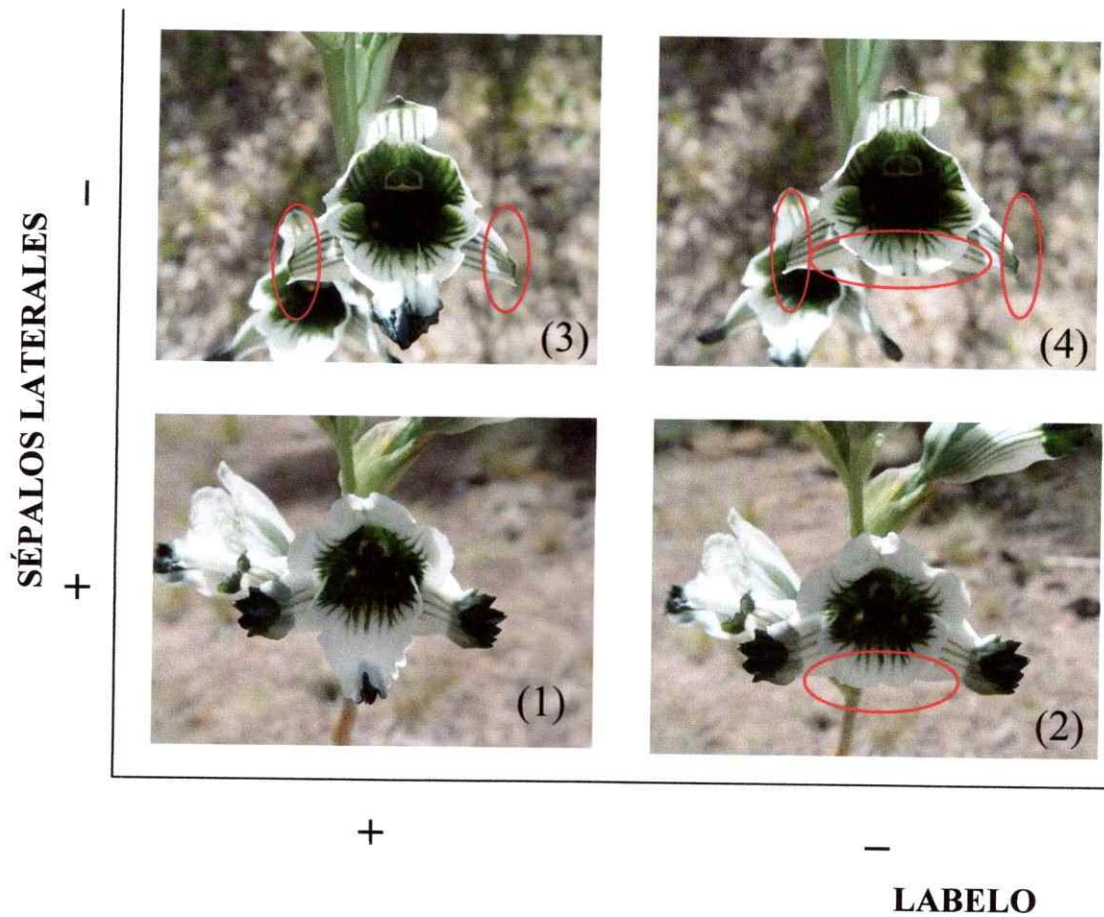


Figura 3. Vista frontal de una flor de *Chloraea bletioides*, mostrando las cuatro morfologías florales resultantes de la combinación factorial de los tratamientos experimentales con dos niveles de los sépalos laterales y del lóbulo central del labelo (control (+) y tratamiento (-)). Para más detalles ver el texto. Fotografías por R. Medel.

Se asignaron las plantas al azar ($n = 124$, una flor por planta) a uno de los cuatro tratamientos que consistieron en cortar (-) o no (+) las siguientes partes (Figura 3):

- (1): + lóbulo labelo, + puntas sépalos (control) ($n = 39$).
- (2): - lóbulo labelo, + puntas sépalos ($n = 26$).
- (3): + lóbulo labelo, - puntas sépalos ($n = 29$).
- (4): - lóbulo central del labelo, - puntas sépalos ($n = 30$).

Aunque el diseño fue completamente balanceado al inicio del experimento, algunas flores debieron ser descartadas porque se pudrieron o fueron comidas por larvas. Una vez montado el experimento, se evaluó periódicamente, cada 24 horas, la presencia/ausencia de polinios en cada tratamiento y al término de la época de floración se evaluó la fructificación de cada flor experimental. Al final de la floración todas las flores tratadas fueron colectadas y llevadas al laboratorio para confirmar la carencia o no de polinios.

3.2.3 *Análisis estadísticos*

3.2.3.1 *Estadística descriptiva.*—Los valores promedio y las desviaciones estándar de los caracteres y de las medidas de fitness fueron calculados. La oportunidad para selección (potencial total para que la selección actúe en una población) (Brodie et al. 1995), fue estimada como la varianza en el fitness relativo (w) femenino y masculino, respectivamente. Una prueba de rangos cuadrados no paramétrica para varianzas (Conover 1999) fue usada para detectar diferencias entre funciones sexuales.

3.2.3.2 *Análisis de selección.*—La medida más simple de selección sobre un rasgo particular es el diferencial de selección (S), el cual mide el cambio total resultante de la selección (Brodie et al. 1995). Este coeficiente fue calculado como la covarianza de cada carácter y el fitness:

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

donde z_i es el carácter i , y w es el fitness relativo (fitness absoluto dividido por el fitness absoluto promedio). Este coeficiente es un estimado de la selección total actuando sobre un rasgo focal, incluyendo tanto selección directa como indirecta (causada a través de correlación genética entre caracteres). Los valores S_i fueron calculados y su significancia estadística fue probada por la correlación producto momento de Pearson del fitness relativo femenino y masculino, respectivamente, con los caracteres (Sokal y Rohlf 1995). Para describir la fuerza directa de la selección actuando sobre el carácter fenotípico i , excluyendo selección indirecta, se aplicó el modelo multivariado de Lande y Arnold (1983):

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

donde w es el fitness relativo, α es una constante (el intercepto), β_i representa la pendiente promedio de la superficie de selección en el plano del carácter z_i , y ε es un término de error. En esta ecuación, el gradiente lineal de selección, β , provee información de la dirección y magnitud del cambio esperado después de la selección actual. Los gradientes de selección no lineal, γ (Eq. 3), describen la naturaleza de la selección sobre desviaciones cuadráticas del promedio para caracteres individuales y combinaciones pareadas de caracteres. Los gradientes no lineales fueron estimados de los coeficientes de segundo orden del siguiente modelo:

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

donde, γ_{ii} representa la curvatura de la relación entre el carácter i y el fitness relativo. Cuando $\gamma_{ii} < 0$, esto implica concavidad hacia abajo y selección estabilizadora actuando sobre el carácter. Cuando $\gamma_{ii} > 0$, esto refleja concavidad hacia arriba y selección disruptiva. El gradiente de selección correlacional, γ_{ij} , refleja la medida en que la selección actúa sobre la correlación de los rasgos i y j . Los gradientes de selección direccional (β) fueron estimados solos a partir de la ecuación (2), pues si los caracteres son multivariados y distribuidos no-normalmente, z_i y z_i^2 en la ecuación (3) están intercorrelacionados (Lande y Arnold 1983), y los cálculos de los coeficientes de primer orden dependerían de si los términos de segundo orden son incluidos. La significancia de β y γ en las ecuaciones 2 y 3 respectivamente, fue determinada directamente de los coeficientes de regresión después que los efectos de todos los otros parámetros fueron removidos. Todos los caracteres fueron estandarizados a promedio cero y varianza unitaria (transformación z) antes del análisis, restando el promedio del rasgo desde cada valor y dividiendo por la desviación estándar. Los diferenciales estandarizados son escritos como S' y los gradientes lineales y cuadráticos estandarizados son escritos como β' y γ' , respectivamente.

La estadística descriptiva y los análisis de regresión múltiple fueron hechos con el paquete estadístico STATISTICA 6.0 para Windows (StatSoft 2001).

Una técnica secuencial Bonferroni (Rice 1989) fue usada para evaluar la significancia a un valor global de $\alpha = 0,05$ de los diferenciales de selección y de los gradientes de

selección. Esto se hizo para minimizar el error tipo I en las tablas de coeficientes de selección y como un complemento a los valores P originales que (junto con los diferenciales y gradientes) visualizaron patrones de selección. Los valores P de los diferenciales de selección fueron tratados separadamente para cada función sexual. Correcciones separadas de los valores P originales fueron hechas para cada función sexual, para los gradientes direccionales (β_i), y para los gradientes cuadráticos (γ_{ii} , γ_{ij}) de selección.

La forma de la superficie de fitness para los caracteres que estuvieron experimentando selección direccional, fue estimada usando la versión univariada del spline cúbico de validación cruzada sugerida por Schluter (1988). Este programa estima una función fitness (u otra superficie de selección) usando el spline cúbico. El método asume que se está tratando de estimar una función fitness verdadera, f , que depende de un rasgo variable único X como:

$$Y = f(X) + \varepsilon \text{ (término de error).}$$

Y es una medida del fitness individual, tal como sobrevivencia, éxito reproductivo, u otra medida de desempeño. $f(X)$ es el fitness promedio de todos los individuos teniendo el valor del rasgo X . El objetivo es estimar la superficie f sin hacer ningún supuesto a priori acerca de su forma, excepto que es suave. Tres diferentes distribuciones de error son ajustadas: normal, binomial (e.g., medidas binarias como sobrevivencia), y Poisson (e.g., número de parejas). El objetivo básico cuando se corre el programa es estimar el spline que mejor se ajuste investigando en un rango de valores del parámetro de suavidad

lambda (λ) (el programa usa una escala logarítmica para lambda). El mejor ajuste es dado por el valor de lambda que minimice la función de validación cruzada generalizada, la cual es una medida del error de predicción.

Asimismo, gráficas tridimensionales para visualizar selección sobre dos caracteres simultáneamente (gradientes cuadráticos correlacionales significativos), fueron obtenidas utilizando gráficas de superficie en STATISTICA 6.0 (StatSoft 2001).

3.2.3.3 Elección de los caracteres para el análisis.—Cuando se usa regresión múltiple en análisis de selección, es importante no elegir muchos caracteres y evitar caracteres que estén fuertemente intercorrelacionados (Lande y Arnold 1983, Endler 1986, O'Connell y Johnston 1998, Maad 2000). La complejidad de un modelo cuadrático total (Eq. 3) incrementa dramáticamente cuando el número de caracteres incrementa en el modelo. Por ejemplo, un modelo incluyendo tres caracteres estima nueve parámetros, mientras un modelo de cinco caracteres estima 20 parámetros, etcétera. La inclusión de variables altamente intercorrelacionadas frecuentemente conduce a resultados dudosos (Zar 1999); puesto que en tales casos los errores estándar de los coeficientes de regresión parcial pueden ser grandes, otorgando imprecisión en las estimaciones poblacionales. Con variables altamente correlacionadas el F total para el modelo de regresión puede ser significativo aún cuando las pruebas de t para las variables individuales no lo sean (Zar 1999). Un efecto negativo adicional de la intercorrelación es que esta puede conducir a incrementar el error redondeado en el cómputo de los estadísticos de regresión (Zar 1999). Un conjunto de datos altamente intercorrelacionado

produciría una matriz casi singular, la cual resultaría en estimaciones inestables de los coeficientes de regresión (Endler 1986, Mitchell-Olds y Shaw 1987). Algunos autores han sugerido que es preferible usar ejes de componentes principales como variables en un análisis de regresión dado que tales ejes siempre están no correlacionados (Endler 1986, Galen 1989). Sin embargo, como lo plantearon Lande y Arnold (1983), un análisis basado en componentes principales obscurece la relación entre los caracteres individuales y el fitness, porque en el rasgo compuesto (componente principal) los caracteres seleccionados están asociados con factores que en sí no son seleccionados (Endler 1986). Así, el uso de componentes principales ocultaría el efecto de la selección cuando los caracteres que experimentan selección covarían con caracteres que no covarían con el fitness (Mitchell-Olds y Shaw 1987).

En la población de estudio todos los caracteres medidos presentaron grados variables de correlación ($0,24 < r < 0,89$). Para realizar los análisis de selección se usaron los siguientes caracteres morfológicos: (1) la altura de la flor, (2) el ancho de la flor, (3) la longitud del tubo floral, (4) el lóbulo del labelo, (5) la altura total de la planta y (6) el número de flores por planta. El ancho y alto de la flor fueron elegidos con el fin de observar si en condiciones naturales los individuos con flores de distinto tamaño muestran diferencias en el éxito reproductivo. Además, se eligieron estos dos rasgos para realizar comparaciones entre condiciones naturales y experimentales, ya que el ancho y alto de la flor se modificaron al aplicar los tratamientos manipulativos (Figura 3). El tubo floral es un rasgo relevante en orquídeas que se relaciona con la producción de frutos y la remoción de polinios (Nilsson 1988). El lóbulo del labelo se incluyó en el análisis porque es un carácter que sirve como plataforma de aterrizaje a los

polinizadores (Dressler 1982). Se ha encontrado en algunos estudios que la altura arriba del suelo de la inflorescencia y la longitud de esta son caracteres que pueden experimentar selección (O'Connell y Johnston 1998, Maad 2000, Aragón y Ackerman 2004). Dado que la altura total de los individuos abarca las dos distancias anteriores, se podría esperar que este carácter experimentara selección. También se ha detectado en la mayoría de los casos que el número de flores en orquídeas está positivamente relacionado al fitness, así que se podría esperar selección para el incremento en la producción de flores en ausencia de cualquier otro limitante (Tremblay et al. 2005). Los otros caracteres medidos no fueron considerados para el análisis de selección porque estuvieron fuertemente correlacionados con algunos caracteres elegidos, o porque no mostraron relación con el éxito de polinización (Anexo B).

3.2.3.4 *Experimento manipulativo.*—Para el experimento manipulativo se aplicó ANOVA factorial de dos vías de efectos fijos. El factor de diseño fue la modificación de las piezas florales, con cuatro tratamientos, tres de diferente grado de modificación y uno control. Por cada tratamiento se realizaron 30 réplicas, considerando como réplica a la flor bajo tratamiento en un individuo. No se aplicó más de un tratamiento por individuo. Para el análisis de los experimentos también se usaron Modelos Lineales Generalizados. Dado que los valores del fitness femenino (0, 1) presentan una distribución binomial y los valores del fitness masculino (0, 1 y 2) presentan una distribución Poisson, se usó función enlace logit y función enlace logaritmo,

respectivamente (McCullagh y Nelder 1989). Todos estos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico S-PLUS 7.0 para Windows (Insightful 2005).

3.2.3.5 *Contraste de metodologías.*—Una vez obtenidos los gradientes de selección es necesario valorar la validez del modelo, idealmente mediante una aproximación experimental para evitar las debilidades inherentes en una aproximación de correlación (Mitchell-Olds y Shaw 1987). Por ejemplo, los análisis de regresión pueden sugerir que cuando el carácter z_i se incremente por una desviación estándar entonces el fitness cambiaría por $\hat{\beta}_i$ desviaciones estándar, asumiendo que todos los otros caracteres son constantes. Con un diseño experimental adecuado puede ser posible variar la magnitud del carácter z_i , asegurando que los caracteres restantes son mantenidos constantes. De esta manera es posible observar la influencia directa del cambio del carácter sobre el fitness individual (Mitchell-Olds y Shaw 1987). El objetivo de esta aproximación es eliminar multicolinealidad (intercorrelación), la fuente de numerosos problemas de la inferencia (Mitchell-Olds y Shaw 1987, Zar 1999).

4. RESULTADOS

4.1 *Insectos y tasa de visitas*

La tasa de visitas a las flores de *Chloraea bletioides* durante el período de observación fue de $3,9 \times 10^{-6}$ visitas/ flores/ hora, $n = 15$, en 360 horas de observación. Estos resultados concuerdan con otros reportes registrados para especies de orquídeas chilenas (Clayton y Aizen 1996, Lehnebach y Riveros 2003) y de otras zonas templadas y tropicales donde se documenta una baja tasa de visitas de polinizadores en orquídeas (Tremblay et al. 2005). Las especies visitantes pertenecen a los órdenes Coleoptera (1 spp.) e Hymenoptera (5 spp.). Dos especies más del orden Homoptera fueron observadas en flores de *C. bletioides* (Tabla 1).

Arctodium sp. (Glaphyridae) y *Centris nigerrima* (Anthophoridae) fueron las dos especies que más se observaron visitando flores de *C. bletioides* ($9,6 \times 10^{-6}$ visitas/ flores/ hora ($n = 5$) y $7,7 \times 10^{-6}$ visitas/ flores/ hora ($n = 3$), respectivamente, en 360 horas de observación). A pesar que la primera tuvo una mayor tasa de visitas, no se vió a ningún individuo de los cinco observados removiendo o portando polinios. En cambio de los tres individuos observados de *C. nigerrima*, dos se observaron removiendo polinios y el otro se vió con polinios adheridos a su dorso. Esta abeja fue la única que se observó en un proceso de polinización efectivo (Anexo A).

Tabla 1. Insectos observados en flores de *Chloraea bletioides* en la población de estudio. El número entre paréntesis representa la cantidad de individuos observados de cada especie.

Especies de insectos	Tasa de visita (visita \times flor ⁻¹ \times h ⁻¹)	Porcentaje de visitas (%)	Carga de polinios
Abejas			
<i>Centris nigerrima</i>	$7,7 \times 10^{-6}$ (3)	20,0	Si
sp. 1	$7,7 \times 10^{-6}$ (1)	6,67	No
Abejorro			
<i>Bombus terrestris</i>	$7,7 \times 10^{-6}$ (1)	6,67	No
Escarabajo			
<i>Arctodium</i> sp.	$9,6 \times 10^{-6}$ (5)	33,33	No
Hormigas			
<i>Camponotus morosus</i>	$1,5 \times 10^{-6}$ (2)	13,33	No
<i>Solenopsis</i> sp.	$1,5 \times 10^{-6}$ (2)	13,33	No
Homoptera			
sp.1 (chinche)	$7,7 \times 10^{-6}$ (1)	6,67	No
sp.2 (Aphididae)*	—	—	No

*No se registra la tasa de visita para esta especie pues los individuos observados habitan estas plantas (obs. pers.). Se observaron muchos de estos individuos sobre tres plantas de *C. bletioides* (Anexo A).

Respecto al experimento de remoción del lóbulo del labelo y de las puntas de sépalos, sólo dos especies de insectos fueron observadas visitando flores modificadas: Una abeja (*C. nigerrima*) se detectó dentro de una flor con puntas de sépalos removidos (Anexo A) y una hormiga (*Solenopsis* sp.) recorrió una flor sin lóbulo del labelo y sin puntas de sépalos.

4.2 Estadística univariada y diferenciales de selección

La Tabla 2 muestra la estadística descriptiva de las medidas de los caracteres y del fitness para la población de *C. bletioides* durante la floración del año 2005.

Tabla 2. Número de individuos (*n*), promedio (\bar{X}) y desviación estándar (*s*) de los caracteres y las medidas de fitness en la población de *Chloraea bletioides* durante la floración del año 2005.

Variabes	<i>n</i>	\bar{X}	<i>s</i>
Altura de la flor (mm)	72	32,50	6,98
Ancho de la flor (mm)	72	36,76	7,00
Largo del tubo floral (mm)	72	25,40	3,88
Largo total de la flor (mm)	72	59,45	5,77
Área del sépalo lateral (mm ²)	72	453,45	97,74
Área del lóbulo del labelo (mm ²)	72	138,85	39,56
Mancha del sépalo derecho (mm ²)	72	94,53	36,42
Mancha del sépalo izquierdo (mm ²)	72	91,10	38,36
Mancha del lóbulo del labelo (mm ²)	72	50,20	34,38
Altura de la planta (cm)	140	62,66	14,19
Número de flores por planta	140	5,15	1,82
Número de frutos producidos por planta	140	1,33	1,73
Número de polinios removidos por planta	72	2,79	2,79

Las plantas en promedio midieron $62,66 \pm 11,99$ cm de altura (media \pm 1EE) y produjeron $5,15 \pm 0,15$ (media \pm 1EE) flores (Tabla 2). Los 140 individuos medidos tuvieron un total de 721 flores de las cuales sólo 186 (25,8%) produjeron fruto, con $1,33 \pm 0,14$ (media \pm 1EE) frutos por planta (Tabla 2). Las 72 plantas a las cuales se les

evaluó la remoción de polinios produjeron un total de 359 flores y exportaron 201 polinios (27,99%). En promedio fueron removidos $2,79 \pm 0,33$ (1EE) polinios por planta (Tabla 2).

La Tabla 3 muestra la oportunidad de selección para ambas funciones sexuales. Los resultados indican una mayor oportunidad de selección sobre el componente femenino que sobre el componente masculino del fitness.

Tabla 3. Número de observaciones (*n*) (individuos) y oportunidad para selección (I) femenina y masculina en la población de *Chloraea bletioides* para el año 2005. T_1 se refiere a la prueba de rangos cuadrados para diferencias entre funciones sexuales (ver Materiales y Métodos).

Tipos de fitness	<i>n</i>	I
Femenino	72	2,23
Masculino	72	1,001
		$T_1 = 4,15^{***}$

*** $P < 0,001$.

Los diferenciales de selección para cambios a través de la función femenina y masculina, respectivamente, son reportados en la Tabla 4. Estos resultados revelan selección total sobre el número de flores y la altura de la planta, pero ausencia de selección sobre caracteres de la corola. Este resultado sugiere que los polinizadores responden más efectivamente a las variables medidas de la planta que a los caracteres florales.

Tabla 4. Diferenciales de selección estandarizados (S') de seis caracteres a través de la función femenina y masculina en *Chloraea bletioides* durante la floración del 2005. Diferenciales de selección en negrita son significativos después del ajuste Bonferroni.

Caracteres	<i>n</i>	Función femenina	Función masculina
Altura de la flor	72	0,10	0,19
Ancho de la flor	72	0,09	0,13
Tubo floral	72	0,01	0,11
Lóbulo del labelo	72	0,20	0,22
Altura de la planta	72	0,30**	0,28*
Número de flores	72	0,55***	0,54***

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.3 Selección direccional, estabilizadora/disruptiva y correlacional

Los gradientes de selección direccional, de curvatura y correlacionales para las funciones femenina y masculina son reportados en las Tablas 5 y 6, respectivamente. Para ambas funciones sexuales y al igual que en los diferenciales de selección total, el número de flores tuvo gradientes de selección direccional positivos altamente significativos (Tablas 5, 6), indicando que los polinizadores ocasionaron ventajas en ambas funciones sexuales a las plantas con un mayor número de flores. Estos gradientes retuvieron significancia después del ajuste Bonferroni. Los gradientes de selección direccional para altura de flor, ancho de flor, tubo floral, lóbulo del labelo y altura de la planta, en ambas funciones sexuales, fueron en general bajos y no significativos (Tablas 5, 6). Además, ningún carácter en ambos sexos estuvo bajo selección cuadrática (γ_{ii}'),

indicando que la selección estabilizadora o disruptiva no fueron importantes en la población durante el año de estudio (Tablas 5, 6). Todo lo anterior indica que además del número de flores, ningún otro carácter ejerció efectos directos sobre el fitness femenino o sobre el masculino.

Las superficies de selección univariadas para el número de flores usando fitness femenino y masculino se muestran en la Figura 4. En la Figura 4a se observa que la producción de frutos aumenta a medida que aumentan las desviaciones estándar en el número de flores; este incremento es relativamente suave entre -1,0 y 1,0 DS y se vuelve más abrupto a partir de 1,0. La Figura 4b muestra un fuerte incremento en la función fitness masculina al aumentar las desviaciones estándar en el número de flores desde -1,0 hasta 1,0 DS. A partir de este último valor y hasta 2,0 DS la función disminuye ligeramente. Esto indica, al igual que para la función femenina, un fuerte patrón de selección direccional para el incremento del número de flores; pero a diferencia de ésta, el número de flores para el incremento en la función masculina llegaría hasta un óptimo a partir del cual dicha función disminuiría.

En cuanto a los gradientes de selección correlacional, en la función femenina se observó una tendencia para una covarianza positiva entre el ancho de la flor con el largo del tubo floral, en que plantas con valores intermedios de los rasgos fueron favorecidos por los polinizadores, decreciendo el valor del fitness hacia los extremos de los rasgos (Figura 5). También, la covarianza entre el lóbulo del labelo y el largo del tubo floral estuvo bajo selección por polinizadores. Flores con labelo grande y tubo floral corto, y flores con labelo pequeño y tubo largo fueron combinaciones ventajosas a través de la función femenina (Figura 6a). Aunque para el componente femenino, ninguno de los

gradientes de selección correlacional fue significativo después del ajuste Bonferroni (Tabla 5), el nivel de rechazo de la hipótesis nula en la prueba Bonferroni para el gradiente entre el lóbulo del labelo y el tubo floral fue $P = 0,0033$ y el nivel de significancia observado para dicho gradiente fue $P = 0,0041$. Así, la covarianza negativa entre el lóbulo del labelo y el tubo floral probablemente estuvo bajo selección por polinizadores. Para la función masculina, y al igual que en la función femenina, se observó un gradiente de selección correlacional negativo y significativo entre el lóbulo del labelo y el tubo floral ($P = 0,0007$), el cual a diferencia del caso anterior, retuvo su significancia luego del ajuste Bonferroni (Tabla 6). Este resultado indica que combinaciones de lóbulo del labelo grande y tubo floral corto así como labelo pequeño y tubo largo tuvieron ventajas a través de la remoción de polinios (Figura 6b).

Globalmente, la covarianza entre ambos caracteres fue un blanco consistente de selección en ambas funciones sexuales.

La superficie de selección que relaciona el fitness relativo con el lóbulo del labelo y el tubo floral fue similar entre las funciones sexuales. En ambos casos se favorecieron combinaciones opuestas de los caracteres (Figura 6a, b).

Tabla 5. Análisis de selección fenotípica para la función femenina sobre seis caracteres en *Chloraea bletoides* durante el año 2005. Se muestran los gradientes de selección direccional (β_i'), los cóncavos/convexos (γ_{ii}'), y los correlacionales (γ_{ij}') \pm los errores estándar (EE). Todos los parámetros están estandarizados a unidad de varianza. Los gradientes de selección en negrita son significativos aún después del ajuste Bonferroni.

Carácter <i>i</i>	Carácter <i>j</i>						
	$\beta_i' \pm EE$	$\gamma_{ii}' \pm EE$	(anf) $\gamma_{ij}' \pm EE$	(tubf) $\gamma_{ij}' \pm EE$	(lab) $\gamma_{ij}' \pm EE$	(altp) $\gamma_{ij}' \pm EE$	(flo) $\gamma_{ij}' \pm EE$
Altura flor (alf)	0,013 \pm 0,132	-0,060 \pm 0,271	0,191 \pm 0,310	0,089 \pm 0,201	0,033 \pm 0,218	-0,296 \pm 0,222	-0,293 \pm 0,207
Ancho flor (anf)	0,037 \pm 0,136	-0,352 \pm 0,189	—	0,476 \pm 0,235*	-0,238 \pm 0,215	0,148 \pm 0,230	0,430 \pm 0,222
Tubo floral (tubf)	-0,122 \pm 0,113	0,111 \pm 0,188	—	—	-0,482 \pm 0,160**	-0,217 \pm 0,241	0,294 \pm 0,192
Lóbulo labelo (lab)	0,174 \pm 0,113	0,012 \pm 0,180	—	—	—	-0,190 \pm 0,181	0,356 \pm 0,192
Altura planta (altp)	0,068 \pm 0,120	0,106 \pm 0,239	—	—	—	—	-0,305 \pm 0,250
Número flores (flo)	0,515 \pm 0,114***	0,345 \pm 0,183	—	—	—	—	—

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Tabla 6. Análisis de selección fenotípica para la función masculina sobre seis caracteres en *Chloraea bleitoides* durante el año 2005. Se muestran los gradientes de selección direccional (β_i), los cóncavos/convexos (γ_{ii}), los cóncavos/convexos (γ_{ij}), y los correlacionales (γ_{ij}) \pm los errores estándar (EE). Todos los parámetros están estandarizados a unidad de varianza. Los gradientes de selección en negrita son significativos aún después del ajuste Bonferroni.

Carácter <i>i</i>	Carácter <i>j</i>						
	$\beta_i \pm EE$	$\gamma_{ii} \pm EE$	(anf) $\gamma_{ij} \pm EE$	(tubf) $\gamma_{ij} \pm EE$	(lab) $\gamma_{ij} \pm EE$	(altp) $\gamma_{ij} \pm EE$	(flo) $\gamma_{ij} \pm EE$
Altura flor (alf)	0,109 \pm 0,133	-0,078 \pm 0,276	0,349 \pm 0,315	0,003 \pm 0,204	-0,301 \pm 0,222	-0,193 \pm 0,226	-0,044 \pm 0,211
Ancho flor (anf)	0,012 \pm 0,136	-0,138 \pm 0,192	—	-0,229 \pm 0,239	0,316 \pm 0,219	0,319 \pm 0,234	-0,007 \pm 0,226
Tubo floral (tubf)	-0,012 \pm 0,113	0,341 \pm 0,191	—	—	-0,588 \pm 0,163***	0,056 \pm 0,246	0,149 \pm 0,196
Lóbulo labelo (lab)	0,146 \pm 0,114	0,322 \pm 0,183	—	—	—	-0,288 \pm 0,185	0,285 \pm 0,195
Altura planta (altp)	0,002 \pm 0,120	0,292 \pm 0,243	—	—	—	—	-0,471 \pm 0,255
Número flores (flo)	0,524 \pm 0,115***	0,020 \pm 0,186	—	—	—	—	—

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

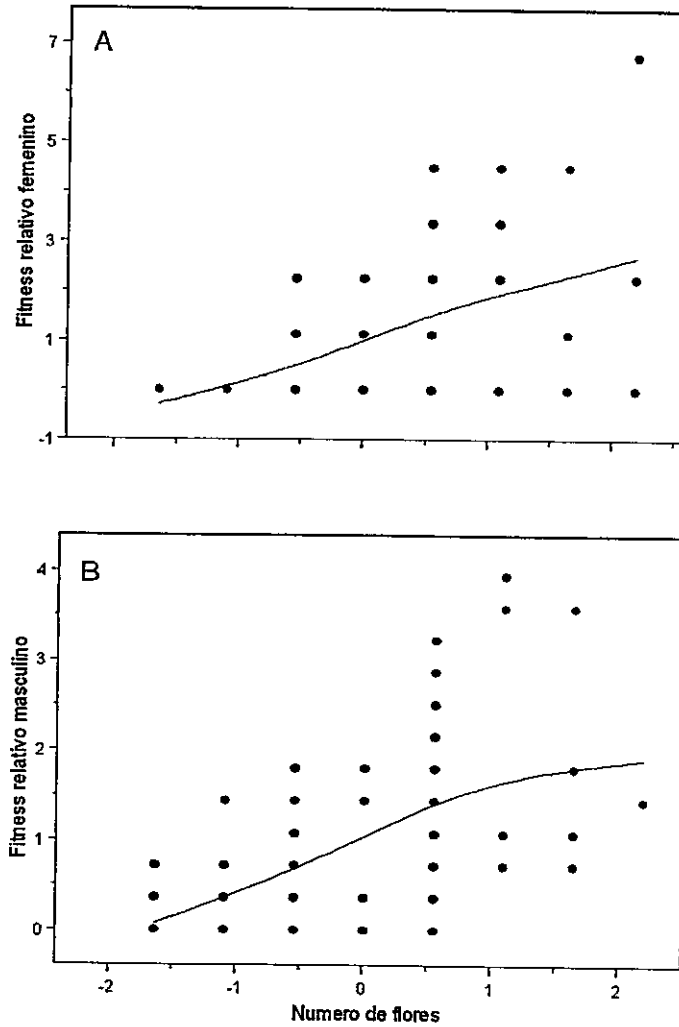


Figura 4. Estimación no paramétrica de la función fitness f . (A) Spline cúbico estimado ($\lambda = 10$) para el número de frutos producidos en *Chloraea bletoides* en relación con el número de flores. (B) Spline cúbico estimado ($\lambda = -10$) para el número de polinios removidos en relación con el número de flores. El número de flores está expresado en unidades de desviación estándar (ver Schluter 1988).

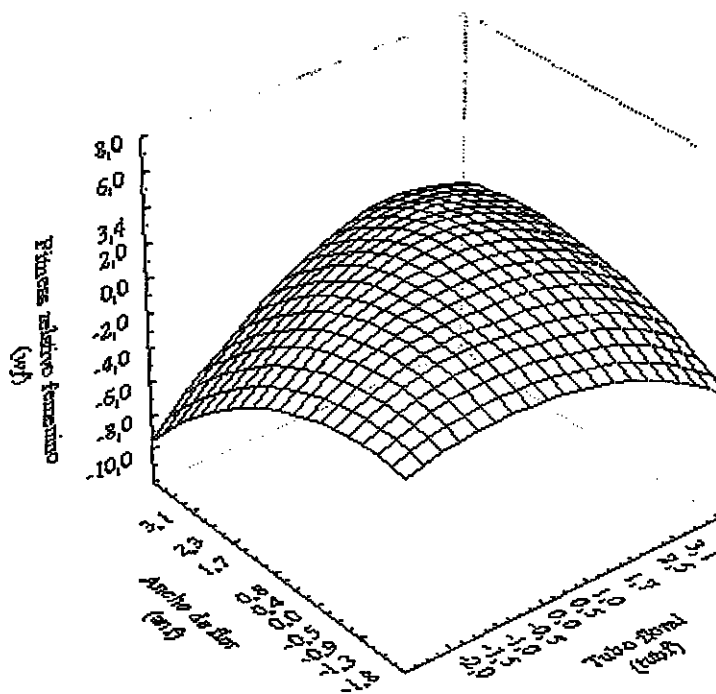
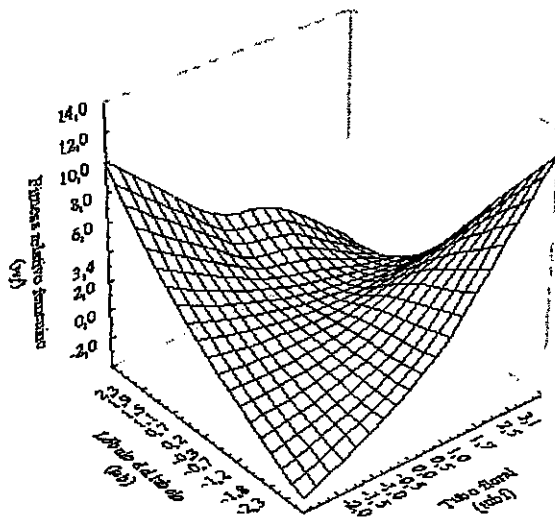
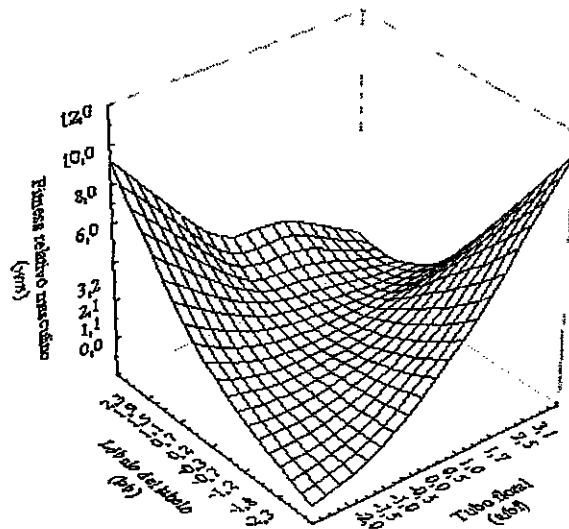


Figura 5. Representación tridimensional de la superficie de selección bivariada que relaciona el fitness relativo femenino (wf) con el ancho de la flor en vista frontal (anf) y el tubo floral ($tubf$). Cada rasgo se muestra en una escala estandarizada (promedio igual a cero y varianza unitaria). La superficie está dibujada de acuerdo a todos los gradientes de selección estandarizados [$wf = 1,45 + (0,037\ anf) - (0,122\ tubf) - (0,352\ anf^2) + (0,111\ tubf^2) + (0,476\ anf \times tubf)$].



(a)



(b)

Figura 6. Representación tridimensional de la superficie de selección bivariada que relaciona el fitness relativo femenino (wf) (a) y el fitness relativo masculino (wm) (b) con el lóbulo central del labelo (lab) y el tubo floral ($tubf$). Cada rasgo se muestra en una escala estandarizada (promedio igual a cero y varianza unitaria). La superficie está dibujada de acuerdo a todos los gradientes de selección estandarizados [(a) $wf = 1,45 + (0,174 lab) - (0,122 tubf) + (0,012 lab^2) + (0,111 tubf^2) - (0,482 lab \times tubf)$; (b) $wm = 1,03 + (0,146 lab) - (0,012 tubf) + (0,322 lab^2) + (0,341 tubf^2) - (0,588 lab \times tubf)$].

4.4 Experimento manipulativo y validación del modelo

No hubo evidencia que las manipulaciones experimentales sobre las flores tuvieran algún efecto sobre el éxito de polinización femenino o masculino (Tabla 7). Ni el número de frutos producido ni el número de polinios removidos fueron significativamente afectados por la excisión de las puntas de los sépalos laterales o por la excisión del lóbulo central del labelo. Asimismo, los efectos de interacción entre los sépalos laterales y el lóbulo del labelo sobre la producción de frutos y la remoción de polinios no fueron estadísticamente significativos (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la manipulación factorial de los sépalos laterales y del lóbulo central del labelo sobre el éxito de polinización femenino y masculino para flores de *Chloraea bletioides*. Modelos lineales generalizados fueron ajustados usando diferentes distribuciones de error y funciones de enlace para los diferentes parámetros (ver Materiales y Métodos).

Variable respuesta	Efectos en el modelo	Prueba de significancia		
		g.l.	<i>t</i>	<i>P</i>
Frutos producidos	Lóbulo labelo (LL)	1	-0.606	0.653
	Sépalos laterales (SL)	1	0.287	0.822
	LL x SL	1	0.028	0.983
Polinios removidos	Lóbulo labelo (LL)	1	-0.422	0.746
	Sépalos laterales (SL)	1	0.678	0.621
	LL x SL	1	0.695	0.613

Estos resultados son consistentes con la ausencia de selección para los caracteres florales individuales (alto y ancho de flor y lóbulo del labelo) y para las combinaciones alto y ancho de flor y ancho de flor y lóbulo del labelo en el análisis de selección fenotípica.

5. DISCUSIÓN

5.1 Éxito de polinización femenino y masculino

El resultado del porcentaje de frutos producidos para la población de *Chloraea bletioides* (25,8%) se encuentra dentro de los rangos reportados para orquídeas sin néctar de zonas templadas a escala mundial (19,5 - 41,4%). Dicho porcentaje concuerda más con los registros para Europa (27,7%) que con los de zonas templadas del hemisferio sur (41,4%) (Neiland y Wilcock 1998). La baja producción de frutos en poblaciones naturales puede ser debida a la limitación de recursos (como agua o nutrientes) (Stephenson 1981), o a la limitación impuesta por los polinizadores (Bierzychudek 1981). Varios autores han encontrado que la producción de frutos en especies de orquídeas está limitada principalmente por el polinizador (p.e. Schemske 1980, Zimmerman y Aide 1989, Proctor y Harder 1994, Clayton y Aizen 1996, Lehnebach y Riveros 2003, ver Tremblay et al. 2005 para una revisión). En la población de estudio la baja producción de frutos puede ser debida principalmente a la limitación impuesta por los polinizadores. Se ha demostrado que la producción de frutos a través de polinización manual excede la producción de frutos natural en *C. bletioides* (Humaña et al. datos sin publicar). *Chloraea bletioides* produjo el 100% de los frutos tras polinización cruzada a mano, este porcentaje comparado con los obtenidos bajo condiciones naturales: 32,1% para la población estudiada por Humaña y co-investigadores (datos sin publicar) y 25,8% en la población de este estudio en Algarrobo, probablemente es reflejo de limitación de polinizadores. El bajo número de insectos y eventos de polinización efectivos observados en el sitio de estudio también apunta hacia una limitación de

polinizadores como la causa más probable de la baja producción de frutos en la población (Tabla 1 y 2).

El porcentaje de polinios removidos (27,99%) es aproximado al porcentaje de frutos producidos (25,8%), lo cual indica que no hubo diferencias globales en el éxito de polinización femenino y masculino, a pesar que la oportunidad de selección difirió significativamente entre los sexos (Tabla 3). Posiblemente cada vez que un insecto visita una flor de esta orquídea y uno o los dos polinios se adhieren a su cuerpo es muy probable que estos sean transportados hasta otra flor y haya polinización efectiva.

La oportunidad de selección para ambos componentes sexuales difirió significativamente (Tabla 3). Para la función femenina la oportunidad de selección fue el doble que para la función masculina. Así, el potencial total para que la selección actuara sobre el recibo de polen tendió a ser mayor que para la dispersión del polen. No obstante, los valores de los diferenciales de selección (S') significativos fueron equivalentes en ambos sexos (Tabla 4). Asimismo, los gradientes de selección significativos (direccional para el número de flores y correlacionales para el labelo y el tubo floral) tuvieron una magnitud y signo similar en ambas funciones sexuales (Tablas 5 y 6). Esta similitud en el rol de las funciones sexuales concuerda con los datos obtenidos para otras especies de orquídeas (O'Connell y Johnston 1998, Maad 2000) donde no se encontraron diferencias en patrones de selección entre los componentes sexuales usando análisis de regresión lineal. Sin embargo, en el estudio de O'Connell y Johnston (1998) los valores de la varianza del fitness relativo y de los coeficientes de selección para el componente femenino fueron mayores a los del componente masculino en las dos poblaciones estudiadas de la orquídea engañosa *Cypripedium acaule*.

Además, Maad (2000) encontró algunas diferencias entre funciones sexuales a través de los resultados de los ANCOVAS realizados sobre los datos entremezclados de sus tres años de muestreo: hubo más caracteres con efectos significativos después del ajuste Bonferroni sobre la función femenina que sobre la masculina en *Platanthera bifolia*. Aunque frecuentemente se sugiere que la selección sobre caracteres florales debiera actuar principalmente a través de la función masculina (e.g., Queller 1983, Bell 1985; ver Murcia 1990, Wilson et al. 1994), en este estudio no se detectaron diferencias entre ambas funciones sexuales. Todos estos resultados sugieren que en la familia Orchidaceae la selección sobre caracteres florales actúa indistintamente sobre ambas funciones sexuales (Nilsson 1992, Tremblay et al. 2005).

A pesar que los gradientes de selección significativos para el fitness masculino fueron equivalentes al femenino, estos resultados deben ser interpretados con reserva pues el éxito masculino medido como número de polinios removidos sigue siendo una medida indirecta de dicho éxito. A futuro sería ideal realizar estudios sobre la donación/paternidad en *Chloraea blettioides* para afirmar con mayor certeza que los polinios removidos son exitosamente transferidos a otra flor.

5.2 Selección sobre rasgos florales

Gradientes lineales.— Los resultados obtenidos para la población de *Chloraea blettioides* muestran que el número de flores experimentó selección directa positiva, tanto en el componente femenino como masculino del fitness. Estos resultados concuerdan con la literatura. En orquídeas se ha encontrado que a menudo la producción de flores está positivamente relacionada al fitness (e.g., Schemske 1980, Firmage y Cole 1988,

Zimmerman y Aide 1989, Calvo 1990, Fritz y Nilsson 1996, Maad 2000). Aunque es lógico pensar que a mayor tamaño del despliegue (número de flores) el éxito reproductivo aumentará, este no es el caso para otras especies tales como *Psychilis krugii* (Ackerman 1989), *Cypripedium fasciculatum* (Lipow et al. 2002) o el tamaño de la inflorescencia en *Epidendrum exasperatum* (Calvo 1990) donde no se encontró un mejoramiento del éxito reproductivo con el aumento del despliegue. El despliegue floral, ya sea medido por el color (vistosidad) de la flor o por el tamaño de la flor o de la inflorescencia, puede diferencialmente afectar el éxito reproductivo femenino y masculino (Stanton et al. 1986, Campbell 1989a, b, Tremblay et al. 2005). Esto puede ser cierto en especies donde el polen no limita la reproducción (Stanton et al. 1986, Campbell 1989a). Pero en taxa con flores hermafroditas limitadas por polen, es esperable que el despliegue floral influya en el éxito reproductivo femenino y masculino de igual manera (Stanton y Preston 1988, Tremblay et al. 2005). En *C. bletioides* el número de flores fue un blanco de selección direccional positiva a través de ambas funciones sexuales y la magnitud de la selección fue similar en ambos componentes. Estos resultados son similares a los reportados para otras orquídeas de zonas templadas, por ejemplo Firmage y Cole (1988) sugirieron que el tamaño de la inflorescencia de *Platanthera blephariglottis* influenció el éxito reproductivo femenino y masculino en una manera paralela en inflorescencias pequeñas (1- 4 flores). Snow y Whigham (1989), plantearon que las tendencias en los cálculos del éxito reproductivo femenino y masculino a través del rango de inflorescencias fueron mayormente paralelas, indicando efectos no diferenciales de este aspecto del despliegue. Ellos también citaron datos sin publicar de *Tipularia discolor* soportando la misma conclusión. En las orquídeas

tropicales *Aspasia principissa* (Zimmerman y Aide 1989), *Psychilis krugii* (Ackerman 1989) y *Comparettia falcata* (Rodríguez-Robles et al. 1992) el éxito reproductivo relativo femenino y masculino no varió con el tamaño de la inflorescencia. En *Brassavola nodosa* (Schemske 1980), otra orquídea tropical, el éxito reproductivo femenino y masculino aumentó desproporcionalmente con respecto al tamaño de la inflorescencia y las tendencias para ambos componentes sexuales fueron paralelas. Los resultados obtenidos para *Chloraea bletioides* en este estudio contribuyen no sólo a reafirmar la relación entre el tamaño de la inflorescencia (número de flores por inflorescencia) y éxito reproductivo femenino y masculino en orquídeas, tanto de zonas templadas como tropicales (Tremblay et al. 2005), si no que además demuestra que esta relación se traduce en selección natural comparable a través de ambas funciones sexuales.

Un posible limitante que podría estar influyendo en los resultados de los coeficientes de selección sobre los caracteres florales individuales sería la variación espacial en la densidad poblacional. Así por ejemplo, los individuos que se encuentren en sectores con un mayor número de vecinos, tendrían quizás mayor oportunidad de ser visitados por polinizadores que aquellos ubicados en sectores donde la densidad de individuos sea menor. Otro limitante de este estudio es que los resultados se circunscriben a una sola localidad y a solo una temporada reproductiva. Es bien conocido que la abundancia de los polinizadores puede variar en el tiempo y el espacio, influenciando el éxito reproductivo de las plantas (e.g., Johnston 1991). El éxito reproductivo femenino y masculino con respecto al despliegue floral también puede variar espacial y temporalmente. Schemske (1980) no encontró diferencias en ambos

componentes sexuales con respecto al aumento del tamaño del despliegue en *Brassavola nodosa*. Sin embargo, Murren y Ellison (1996) hallaron que los despliegues más grandes de la misma especie pero en otra localidad tuvieron éxito reproductivo masculino desproporcionalmente mayor que el femenino. Resultados similares fueron observados para *Psychilis krugii* (Ackerman 1989). Otros estudios han reportado que el éxito de polinización puede depender del hábitat (Johnson y Bond 1992) o del microhábitat (O'Connell y Johnston 1998). Cabe notar que este estudio se realizó en una población que crece bajo árboles de *Pinus radiata* y en una región que ha sido bastante intervenida durante las últimas décadas (Novoa et al. 2006), lo cual posiblemente condiciona la actividad y diversidad de polinizadores, influenciando así la producción de frutos en la población (Tremblay et al 2005). Por consiguiente, sería ideal a futuro realizar estudios en varias poblaciones para comparar los diferentes efectos producidos por la densidad poblacional, el tipo de hábitat, y además realizar trabajos continuados en varias épocas de floración. Esto es importante para conocer la variación espacial y temporal sobre el éxito reproductivo femenino y masculino en *C. blettioides*.

Gradientes correlacionales.— En la población de estudio el lóbulo del labelo y el tubo floral estuvieron correlacionados ($r = 0,36$, $P = 0,002$). También fue detectada selección correlacional negativa sobre el lóbulo del labelo y el tubo floral para ambos sexos. Esto último indicó que combinaciones de lóbulo del labelo grande y tubo floral corto, así como labelo pequeño y tubo largo tuvieron ventajas a través de ambas funciones sexuales. Dado que selección direccional o estabilizadora no actuó sobre ninguno de los dos rasgos por separado, la superficie de selección bivariada para este par de rasgos

puede ser dibujada como una silla con esquinas en combinaciones opuestas del lóbulo del labelo y del tubo floral mostrando los valores más altos de fitness (Brodie 1992) (Figura 6).

Aunque la selección correlacional sobre caracteres reproductivos en plantas es probablemente de común ocurrencia (Maad 2000), hasta el momento el presente trabajo es uno de los pocos en realizar estudios de selección multivariada en orquídeas (Tremblay et al. 2005). Los resultados de selección correlacional sobre el lóbulo del labelo y el tubo floral en este estudio son un ejemplo de cómo la selección natural, es probablemente responsable de muchas (quizás la mayoría) de las adaptaciones florales de las orquídeas (Tremblay et al. 2005). Más estudios que contrasten condiciones naturales y experimentales son necesarios para un mayor entendimiento de los blancos de selección y evolución floral. No obstante, se debe tener en mente que un análisis completo de los factores que influyen la evolución de rasgos florales debe incluir datos sobre la suerte del polen removido, la paternidad de los frutos, la heredabilidad de los caracteres involucrados y el éxito reproductivo de la progenie.

5.3 Interacción floral

El diseño experimental usado en este estudio estuvo basado en el supuesto que los sépalos laterales y el lóbulo del labelo juegan diferentes papeles en la polinización de las flores en *Chloraea blettioides*. Mientras los sépalos actuarían realizando la forma de la flor, el lóbulo del labelo serviría principalmente como plataforma de aterrizaje para los insectos polinizadores, afectando así probablemente su eficiencia de forrajeo. Las flores de la familia Orchidaceae exhiben alta complejidad y gran especialización con sus

polinizadores, en su mayoría insectos (Dressler 1990, Proctor et al. 1996). El labelo que es un pétalo altamente modificado, distintivo de la familia, es un apéndice que juega un papel crítico para la polinización, atrayendo visualmente al polinizador y sirviendo como plataforma de aterrizaje (Dressler 1982). En *C. bletioides* es muy posible que las estructuras laminares sobre la superficie adaxial del labelo sean atractores visuales ('guías de néctar'), mientras el lóbulo central del labelo sirva como punto de apoyo a los insectos en el momento de aterrizar sobre la flor (Figura 1). Es probable que los sépalos laterales contribuyan en la atracción de los polinizadores realzando la forma de la mitad inferior de la flor (cuando está completamente girada, resupinada), aumentando de esta manera la atraktividad sobre el labelo. Por estas razones se decidió modificar ambos apéndices para probar cómo y en qué manera afectarían el éxito reproductivo femenino y masculino de *C. bletioides*.

Otros estudios han efectuado manipulaciones experimentales sobre rasgos florales en orquídeas. Por ejemplo, en especies de *Platanthera* (Inoue 1986, Nilsson 1988) se ha modificado la longitud del espolón para evaluar su importancia sobre el éxito reproductivo femenino y masculino. Los resultados indican que al reducir la profundidad de la flor hay una reducción del fitness para ambos componentes sexuales (Inoue 1986, Nilsson 1988). De igual manera, Malo et al. (2001) modificaron apéndices florales pertenecientes a verticilos diferentes para probar el efecto de la florivoría sobre el éxito de polinización en la orquídea *Myrmecophila tibicinis*, no encontrando efectos significativos del daño floral sobre dicho éxito. Pocos experimentos manipulativos han sido realizados hasta ahora, para probar el efecto combinado de apéndices florales

pertenecientes a verticilos diferentes que se cree son de gran importancia para el éxito reproductivo en especies de orquídeas (Tremblay et al. 2005).

Los resultados obtenidos para el número de flores en el análisis de selección indican que más que seleccionar flores focales dentro de una inflorescencia, los polinizadores estarían siendo atraídos por el conjunto de flores total, e individuos con un número de flores mayor presentarían mayor vistosidad que estaría favoreciendo el éxito reproductivo femenino y masculino. Así, a futuro sería ideal realizar manipulaciones experimentales donde se modifique el individuo tratado como un todo y no solamente una flor focal. Con respecto a esto último, hay que tener en mente que un factor limitante para realizar una modificación total sobre individuos es el tamaño de la población, ya que para este tipo de estudios es ideal un tamaño relativamente grande ($n > 100$) y generalmente el tamaño poblacional de especies de orquídeas es relativamente pequeño (e.g., Novoa 2005, Tremblay et al. 2005, Novoa et al. 2006).

Los resultados experimentales de este estudio no revelan una interacción significativa entre el labelo y los sépalos laterales. Este resultado fue consistente con la ausencia de selección directa actuando sobre los caracteres por separado (ancho de la flor y lóbulo del labelo) y con la ausencia de selección correlacional entre el alto y ancho de la flor y/o entre el ancho de la flor y el lóbulo del labelo. No obstante, la observación de selección correlacional sobre el labelo y el tubo floral, sugiere que puede ser de interés efectuar experimentos manipulativos sobre ambos caracteres para evaluar experimentalmente el valor funcional de tal interacción.

6. CONCLUSIONES

- Los resultados bajo condiciones naturales indican que ni el alto y ancho de la flor ni el lóbulo central del labelo, ni la combinación en pares de estos tres rasgos, condicionan la producción de frutos y/o la remoción de polinios en *Chloraea bletioides*. Las manipulaciones experimentales sobre el lóbulo central del labelo y los sépalos laterales no resultaron significativas, mostrando que la selección ejercida por los polinizadores no es responsable de la alta correlación fenotípica entre tales ($r = 0,52, P < 0,0001$) apéndices florales.
- La selección correlacional negativa actuando sobre el lóbulo del labelo y el largo del tubo floral, permite concluir que procesos adaptativos más que causas genéticas y del desarrollo son responsables de la correlación alométrica ($r = 0,36, P < 0,002$) que muestran este par de caracteres.
- Más investigación donde se evalúe el efecto del lóbulo del labelo y del tubo floral sobre el éxito reproductivo bajo condiciones naturales y experimentales, sería ideal para valorar la validez de los resultados obtenidos y para afirmar con mayor certeza que la correlación entre este par de caracteres es debida a procesos adaptativos en esta especie de orquídea.

- Estos resultados también contribuyen a reafirmar que en especies de orquídeas el labelo y el tubo floral juegan un papel muy importante en la polinización, y crean nuevas expectativas sobre las posibilidades de efectuar estudios donde se evalúen los efectos combinados de este par de caracteres florales o de otros que estén relacionados con ellos, para indagar cuánto y en qué manera la selección natural a dado cuenta de la complejidad observada en las flores de la familia Orchidaceae, importante para engrosar el conocimiento de la evolución de las plantas con flores.

7. LITERATURA CITADA

- ACKERMAN, J. D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* 14: 101-109.
- ANDERSSON, S. 1994. Floral stability, pollination efficiency, and experimental manipulation of the corolla phenotype in *Nemophila menziesii* (Hydrophyllaceae). *American Journal of Botany* 81: 1397-1402.
- ANDERSSON, S., & B. WIDÉN. 1993. Pollinator-mediated selection on floral traits in a synthetic population of *Senecio integrifolius* (Asteraceae). *Oikos* 66: 72-79.
- ARAGÓN, S. & J. D. ACKERMAN. 2004. Does flower color variation matter in deception pollinated *Psychilis monensis* (Orchidaceae)? *Oecologia* 138: 405-413.
- ATWOOD, J. T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- BELL, G. 1985. On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London: Series B*, 224: 223-265.
- BIERZYCHUDEK, P. 1981. Pollinator limitation of plant reproductive effort. *American Naturalist* 117: 838-840.
- BOTTO-MAHAN, C., & M. OJEDA-CAMACHO. 2000. The importance of floral damage for pollinator visitation in *Alstroemeria ligtu* L. *Revista Chilena de Entomología* 26: 73-76.
- BRODIE, E. D. 1992. Correlational selection for color pattern and antipredator behavior in the garter snake *Thamnophis ordinoides*. *Evolution* 46: 1284-1298.
- BRODIE, E. D., A. J. MOORE, & F. J. JANZEN. 1995. Visualizing and quantifying natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 313-318.
- BROYLES, S. B., & R. WYATT. 1990a. Paternity analysis in a natural population of *Asclepias exaltata*: multiple paternity, functional gender, and the "pollen donation hypothesis". *Evolution* 44: 1454-1468.
- BROYLES, S. B., & R. WYATT. 1990b. Plant parenthood in milkweeds: a direct test of the pollen donation hypothesis. *Plant Species Biology* 5: 131-142.
- CALVO, R. N. 1990. Inflorescence size and fruit distribution among individuals of three orchid species. *American Journal of Botany* 77: 1378-1381.

- CAMPBELL, D. R. 1989a. Inflorescence size: test of the male function hypothesis. *American Journal of Botany* 76: 730-738.
- CAMPBELL, D. R. 1989b. Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* 43: 318-334.
- CAMPBELL, D. R., N. M. WASER, M. V. PRICE, E. A. LYNCH, & R. J. MITCHELL. 1991. Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 45: 1458-1467.
- CARUSO, C. M. 2000. Competition for pollination influences selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 54: 1546-1557.
- CLAYTON, S., & M. AIZEN. 1996. Effects of pollinia removal and insertion on flower longevity in *Chloraea alpina* (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology* 10: 653-660.
- CONNER, J. K., & S. RUSH. 1996. Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 105: 509-516.
- CONNER, J. K., & S. RUSH. 1997. Measurements of selection on floral traits in black mustard, *Brassica nigra*. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 327-335.
- CONNER, J. K., S. RUSH, & P. JENNETTEN. 1996. Measurements of natural selection on floral traits in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). I. Selection through lifetime female fitness. *Evolution* 50: 1127-1136.
- CONOVER, W. J. 1999. Practical nonparametric statistics. Third edition. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.
- CORREA, M. 1969. *Chloraea*, género sudamericano de Orchidaceae. *Darwiniana* 15: 374-500.
- CRUZAN, M. B., P. R. NEAL, & M. F. WILLSON. 1988. Floral display in *Phyla incisa*: consequences for male and female reproductive success. *Evolution* 42: 505-515.
- DARWIN, C. 1862. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects. John Murray, London, UK.
- DRESSLER, R. L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-394.
- DRESSLER, R. L. (ed.). 1990. The orchids, natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

- ENDLER, J. A. 1986. Natural selection in the wild. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- ENDLER, J. A. 1995. Multiple-trait coevolution and environmental gradients in guppies. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 22-29.
- FALCONER, D. S. 1989. Introduction to quantitative genetics. Third edition. Longman, Harlow, UK.
- FIRMAGE, D. H., & F. R. COLE. 1988. Reproductive success and inflorescence size of *Calopogon tuberosus* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 75: 1371-1377.
- FRITZ, A.-L., & L. A. NILSSON. 1996. Reproductive success and gender variation in deceit-pollinated orchids. Pp. 319-338 *en* D. G. Lloyd and S. C. H. Barrett, eds. *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- GALEN, C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 43: 882-890.
- GÓMEZ, J. M. 2000. Phenotypic selection and response to selection in *Lobularia maritima*: importance of direct and correlational components of natural selection. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 689-699.
- HERRERA, C. M. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63: 251-275.
- HERRERA, C. M. 2001. Deconstructing a floral phenotype: do pollinators select for corolla integration in *Lavandula latifolia*? *Journal of Evolutionary Biology* 14: 574-584.
- INOUE, K. 1986. Experimental studies on male and female reproductive success: effects of variation in spur length and pollinator activity on *Platanthera mandarinorum* ssp. *hachijoensis* (Orchidaceae). *Plant Species Biology* 1: 207-215.
- Insightful, Corp. 2005. S-PLUS 7.0 for Windows Professional Developer.
- JOHNSON, S. D., & W. J. BOND. 1992. Habitat dependent pollination success in a Cape orchid. *Oecologia* 91: 455-456.
- JOHNSTON, M. O. 1991. Natural selection on floral traits in two species of *Lobelia* with different pollinators. *Evolution* 45: 1468-1479.

- LANDE, R. 1980. The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations. *Genetics* 94: 203-215.
- LANDE, R., & S. J. ARNOLD. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210-1226.
- LEHNEBACH, C. A. 2003. Preliminary checklist of the orchids of Chile. *Botanical Journal of the Linnean Society* 143: 449-451.
- LEHNEBACH, C. A., & M. RIVEROS. 1999. Presencia de osmóforos en especies de los géneros *Chloraea* Lindl. y *Gavilea* Poepp. (Orchidaceae). *Biological Research* 32: R-221.
- LEHNEBACH, C. A., & M. RIVEROS. 2003. Pollination biology of the Chilean endemic orchid *Chloraea lamellata*. *Biodiversity and Conservation* 12: 1741-1751.
- LIPOW, S. R., P. BERNHARDT, & N. VANCE. 2002. Comparative rates of pollination and fruit set in widely separated populations of a rare orchid (*Cypripedium fasciculatum*). *International Journal of Plant Science* 163: 775-782.
- MAAD, J. 2000. Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution* 54: 112-123.
- MALO, J. E., J. LEIRANA-ALCOCER, & V. PARRA-TABLA. 2001. Population fragmentation, florivory, and the effects of flower morphology alterations on the pollination success of *Myrmecophila tibicinis* (Orchidaceae). *Biotropica* 33: 529-534.
- MCCULLAGH, P., & J. A. NELDER. 1989. Generalized linear models. Second edition. Chapman & Hall, New York, USA.
- MEDEL, R., C. BOTTO-MAHAN, & M. KALIN-ARROYO. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology* 84: 1721-1732.
- MITCHELL-OLDS, T., & R. G. SHAW. 1987. Regression analysis of natural selection: statistical inference and biological interpretation. *Evolution* 41: 1149-1161.
- MURCIA, C. 1990. Effect of floral morphology and temperature on pollen receipt and removal in *Ipomoea trichocarpa*. *Ecology* 71: 1098-1109.
- MURREN, C. J., & A. M. ELLISON. 1996. Effects of habitat, plant size, and floral display on male and female reproductive success of the Neotropical orchid *Brassavola nodosa*. *Biotropica* 28: 30-41.

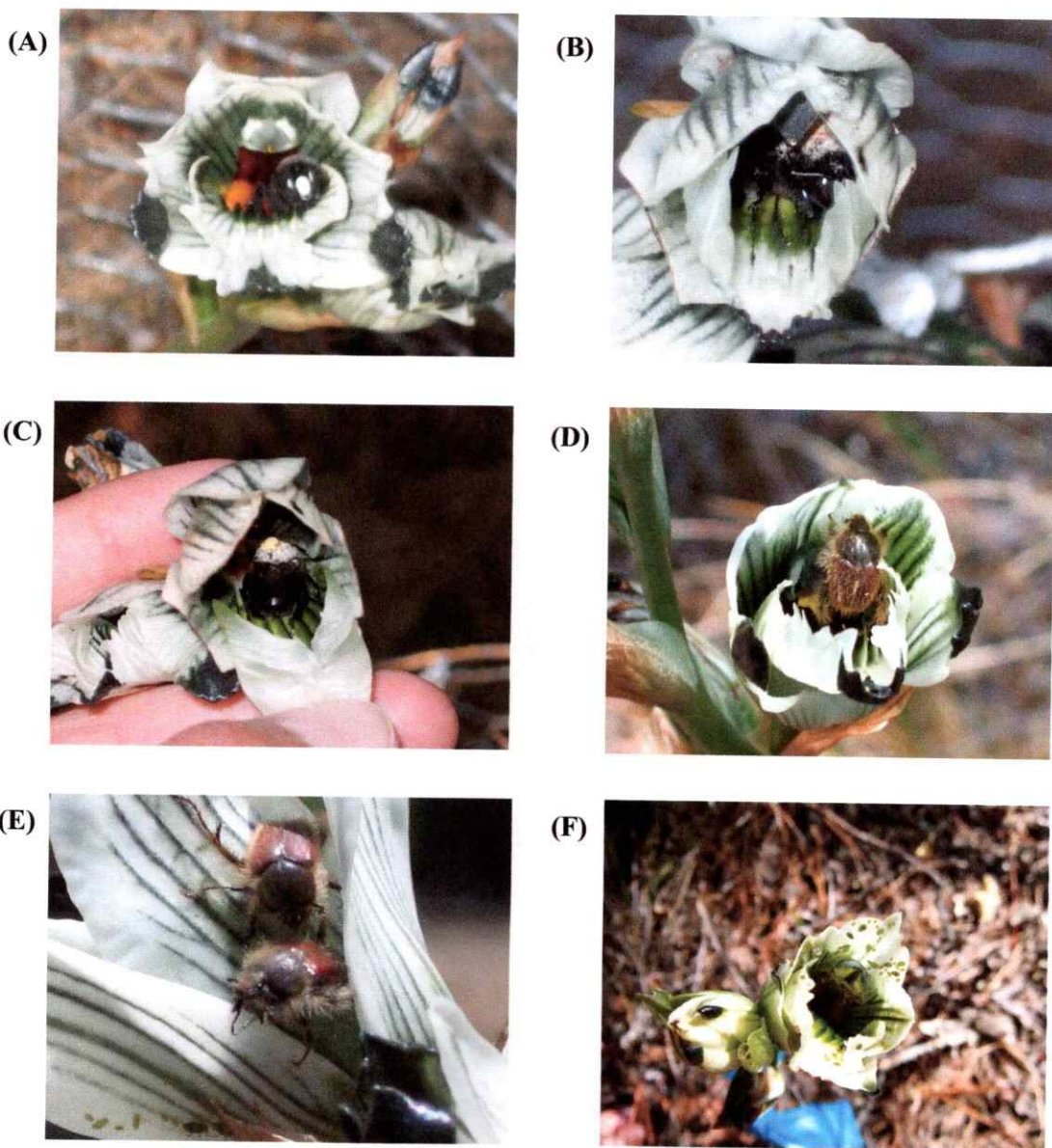
- NEILAND, M. R. M., & C. C. WILCOCK. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.
- NILSSON, L. A. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334: 147-149.
- NILSSON, L. A. 1992. Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 255-259.
- NILSSON, L. A., E. RABAKONANDRIANINA, & B. PETTERSSON. 1992. Exact tracking of pollen transfer and mating in plants. *Nature* 360: 666-668.
- NOVOA, P. 2005. Algunos alcances a la interacción entre insectos y orquídeas. *Revista Chagual*, vol. 3(3): 32-37.
- NOVOA, P., J. ESPEJO, & M. CISTERNAS. 2006. Orquídeas de Chile. www.chlorischile.cl/weborchis/indice_orquideas.htm.
- O'CONNELL, L. M., & M. O. JOHNSTON. 1998. Male and female pollination success in a deceptive orchid: a selection study. *Ecology* 79: 1246-1260.
- PHILLIPS, P. C., & S. J. ARNOLD. 1989. Visualizing multivariate selection. *Evolution* 43: 1209-1222.
- POHL, N., G. CARVALLO, C. BOTTO-MAHAN, & R. MEDEL. 2006. Nonadditive effects of flower damage and hummingbird pollination on the fecundity of *Mimulus luteus*. *Oecologia* 149: 648-655.
- PROCTOR, H. C., & L. D. HARDER. 1994. Pollen load, capsule weight, and seed production in three orchid species. *Canadian Journal of Botany* 72: 249-255.
- PROCTOR, M., P. YEO, & A. LACK. 1996. *The natural history of pollination*. Timber Press, Portland, USA.
- QUELLER, D. C. 1983. Sexual selection in a hermaphroditic plant. *Nature* 305: 706-707.
- RICE, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- RODRÍGUEZ-ROBLES, J. A., E. J. MELÉNDEZ, & J. D. ACKERMAN. 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequencies in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 79: 1009-1017.

- SCHEMSKE, D. W. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* 34: 489-493.
- SCHEMSKE, D. W., & C. C. HORVITZ. 1989. Temporal variation in selection on a floral character. *Evolution* 43: 461-465.
- SCHLUTER, D. 1988. Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42: 849-861.
- SCHLUTER, D., & D. NYCHKA. 1994. Exploring fitness surfaces. *American Naturalist* 143: 597-616.
- SNOW, A. A., & D. F. WHIGHAM. 1989. Cost of flower and fruit production in *Tipularia discolor*. *Ecology* 70: 1286-1293.
- SOKAL, R. R., & F. J. ROHLF. 1995. *Biometry*. Third edition. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- STANTON, M. L., & R. E. PRESTON. 1988. A qualitative model for evaluating the effects of flower attractiveness on male and female fitness in plants. *American Journal of Botany* 75: 540-544.
- STANTON, M. L., A. A. SNOW, & S. N. HANDEL. 1986. Floral evolution: attractiveness to pollinators increases male fitness. *Science* 232: 1625-1627.
- StatSoft, Inc. 2001. STATISTICA version 6. www.statsoft.com.
- STEPHENSON, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 253-279.
- TREMBLAY, R. L., J. D. ACKERMAN, J. K. ZIMMERMAN, & R. N. CALVO. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.
- WILSON, P. 1995. Selection for pollination success and the mechanical fit of *Impatiens* flowers around bumblebee bodies. *Biological Journal of the Linnean Society* 55: 355-383.
- WILSON, P., J. D. THOMSON, M. L. STANTON, & L. P. RIGNEY. 1994. Beyond floral Batemanian: gender biases in selection for pollination success. *American Naturalist* 143: 283-296.
- YOUNG, H. J., & M. L. STANTON. 1990. Influences of floral variation on pollen removal and seed production in wild radish. *Ecology* 71: 536-547.

ZIMMERMAN, J. K., & T. M. AIDE. 1989. Patterns of fruit production in a Neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* 76: 67-73.

ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey, USA.

ANEXO A: Insectos visitando flores de *Chloraea bletioides* en el lugar de estudio. (A) Una abeja macho *Centris nigerrima* dentro de una flor sin modificar. (B) y (C) otro individuo macho dentro de una flor sin puntas de sépalos laterales, con polinios adheridos a su dorso. (D) y (E) escarabajos del género *Arctodium*. (F) Muchos áfidos (Aphididae) se observaron en algunas plantas.



ANEXO B: Resultados de regresiones logísticas entre la producción de frutos y la remoción de polinios y medidas morfométricas tomadas a flores sin modificar. Para la producción de frutos los resultados de la regresión logística fueron $\chi^2 = 1,81$, $df = 5$ y $P = 0,88$; y para la remoción de polinios los resultados fueron $\chi^2 = 2,68$, $df = 5$ y $P = 0,75$. El tamaño de la flor es un componente principal del ancho y alto de la flor, largo del tubo floral, largo total de flor, tamaño de un sépalo lateral y del lóbulo del labelo. Las otras cuatro variables respuesta son: tamaño de la mancha del sépalo derecho (MSD), tamaño de la mancha del sépalo izquierdo (MSI), tamaño de la mancha del labelo (MLAB) y altura de la planta (ALT); todas estas variables están transformadas (T) a logaritmo.

FRUTOS	Estimación (EE)	χ^2	P
Tamaño de flor (CP1)	0,81 (1,14)	0,50	0,48
TMSD	4,16 (5,13)	0,66	0,42
TMSI	-4,53 (4,82)	0,89	0,35
TMLAB	0,10 (0,90)	0,01	0,91
TALT	-2,70 (3,82)	0,50	0,48

POLINIOS	Estimación (EE)	χ^2	P
Tamaño de flor (CP1)	0,47 (0,42)	1,25	0,26
TMSD	0,04 (1,71)	0,00	0,98
TMSI	-1,32 (1,84)	0,52	0,47
TMLAB	-0,22 (0,40)	0,30	0,58
TALT	0,22 (1,63)	0,02	0,89