

UCH-FC
MAG-B
C 271
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE POSTGRADO

**POTENCIAL EVOLUTIVO DE LA HERCOGAMIA EN UN
SISTEMA MIXTO DE REPRODUCCIÓN: UN ESTUDIO EN
MIMULUS LUTEUS (PHRYMACEAE)**

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

ROXANA ALEJANDRA CARES SUÁREZ

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

Enero, 2015
Santiago - Chile



*A todos los que creyeron en mí y me
tendieron una mano en este largo camino.*

BIOGRAFÍA



Nací el 25 de Mayo de 1989 en La Serena, IV Región. Di mis primeros pasos en el hermoso Valle del Elqui y luego de un par de años me trasladé a Santiago definitivamente. Siempre me interesó la ecología y el medio ambiente, por lo que en el año 2007 decidí entrar a estudiar Biología ambiental en la Universidad de Chile. Me titulé en el año 2012 con un

estudio centrado en la interacción planta-polinizador. Para ese entonces me encontraba trabajando en el laboratorio de Ecología Evolutiva y decidí tomar la oportunidad que me brindaban de realizar el Magíster en Ciencias Biológicas. Así que desde entonces, me encuentro trabajando con el Dr. Rodrigo Medel y la Dra. Carezza Botto en torno a *Mimulus luteus*, una especie herbácea considerada un muy buen modelo para estudiar la selección natural. También, junto con un grupo de amigos, soy co-fundadora de Huella Nativa, una corporación sin fines de lucro que busca difundir la biodiversidad chilena y ayudar a educar sobre ella, para que entre todos la valoremos y cuidemos.

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

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

ROXANA ALEJANDRA CARES SUÁREZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 24 de Diciembre de 2014.

Director de Tesis:

Dr. Rodrigo Medel

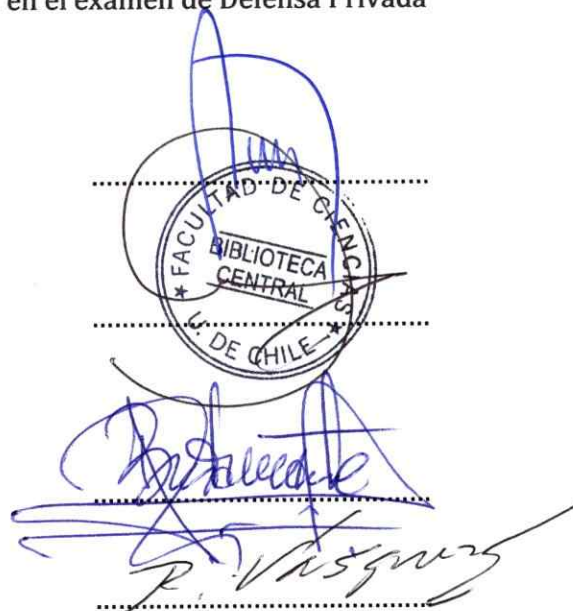
Co-Director de Tesis

Dra. Carezza Botto

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramiro Bustamante

Dr. Rodrigo Vásquez



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores Dr. Rodrigo Medel y Dra. Carezza Botto por el apoyo que me han brindado durante todos estos años en los cuales he formado parte del laboratorio de Ecología Evolutiva. Agradezco a mis revisores Dr. Ramiro Bustamante y Dr. Rodrigo Vásquez, cuyos comentarios han contribuido a enriquecer este trabajo.

Quiero agradecer a todas las personas que forma parte de este camino. A los miembros del laboratorio de Ecología Evolutiva, gracias por la buena onda y la gran disposición para ayudar en caso de cualquier duda, más allá de lo académico. Quiero agradecer a Catalina G., Gabriel E., Mildred H., Susana L. y Carlos P. por su valiosa colaboración en terreno. Y agradecer a Alina C. y Mildred H. por su importante apoyo en invernadero. A Catalina G., por toda su significativa ayuda en múltiples áreas de esta tesis. Este trabajo no hubiera sido posible sin todos ellos.

Infinitas gracias a mi papás, Pedro y Roxana. Ellos son los gestores de lo que soy hoy en día con su esfuerzo de tantos años.

Por supuesto, también deseo agradecer a los amigos que hacen que la carga se aliviane. A mis queridos LWPDF, Nicolás B. y Diana L, gracias por su constante apoyo. A los járcores nativos, por todas las conversaciones extrañas y dispersas ¡Los amamas! A mis amigas de tantos años Yesenia G., Valita C y Karin L. Quiero agradecer en especial a mi querido Ricardo quien me ha acompañado a lo largo de todo este magíster, con amor y cariño me ha ayudado a levantarme tras cada caída.

Deseo agradecer a la Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, especialmente al Centro de semillas y árboles forestales. Agradezco a los profesores Iván Grez y Carlos Magni, y a Betsabé Abarca por todo el apoyo durante nuestra estadía en el vivero de la Facultad. Agradecimientos también a la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica, por el acceso a sus invernaderos que permitieron llevar a cabo la segunda etapa de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1120155 del Dr. Rodrigo Medel y la beca CONICYT 22121190 para Magíster nacional.

ÍNDICE

Lista de figuras	viii
Lista de tablas	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
Introducción	1
Materiales y Métodos	8
Sitio de estudio e historia natural	8
Sistema de reproducción	9
Análisis de selección fenotípica	11
Análisis de parámetros genéticos	15
Resultados	17
Descripción del ensamble de polinizadores	17
Sistema de reproducción	17
Análisis de selección fenotípica	18
Estimación de parámetros genéticos	23
Discusión	25
Conclusiones	32
Referencias	34

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Flor de <i>Mimulus luteus</i> . En la imagen se indica la ubicación del estigma bilobulado y las anteras.	7
Fig. 2. Parche de exclusión de grandes herbívoros.	9
Fig. 3. Efecto del sistema de apareamiento sobre la producción de semillas.	18
Fig. 4. Distribución de frecuencias para la hercogamia en <i>Mimulus luteus</i> .	19
Fig. 5. Spline cúbico estimado para la separación antera-estigma ($\lambda = 0,5$).	22

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tasa de visita para <i>Mimulus luteus</i> por especie de polinizador.	17
Tabla 2. Valores promedio y errores estándar (EE) para cuatro rasgos de <i>Mimulus luteus</i> utilizados en los análisis de selección fenotípica.	19
Tabla 3. Coeficientes de selección fenotípica para cuatro rasgos de <i>Mimulus luteus</i> .	21
Tabla 4. Valores promedio y errores estándar (EE) para cuatro rasgos de <i>Mimulus luteus</i> utilizados en los análisis genéticos.	23
Tabla 5. Heredabilidad (en negrita en la diagonal) y correlaciones genéticas (bajo la diagonal) para cuatro rasgos florales de <i>Mimulus luteus</i> .	24

RESUMEN

Las poblaciones de plantas pueden evolucionar hacia diversas estrategias de reproducción dependiendo del contexto ecológico. Muchas especies poseen sistemas mixtos de reproducción (autogamia y alogamia simultáneamente). La mantención de estos sistemas es una interrogante para los biólogos evolutivos, ya que los puntos de estabilidad generalmente se predicen para una de las dos estrategias reproductivas. La evolución de estos sistemas podría ser consecuencia de evolución fenotípica de rasgos que limitan la autofecundación, siendo uno de ellos la hercogamia de aproximación. Este rasgo es variable dentro de las flores de una misma población y por lo tanto, permite diferentes niveles de autogamia. *Mimulus luteus* (Phrymaceae) es una especie herbácea autocompatible que en algunas poblaciones presenta autofecundación de forma parcial y no exhibe depresión por endogamia, lo cual sugiere que es un buen candidato para evolucionar un sistema mixto de reproducción. En este estudio se examinó si niveles intermedios de distancia antera-estigma son favorecidos por selección fenotípica y si tal rasgo cuenta con suficiente variación genética aditiva para responder evolutivamente a la fuerza selectiva, promoviendo así la mantención de un sistema mixto de reproducción. Se evaluaron los niveles de autogamia, la depresión por endogamia y la selección fenotípica actuando sobre la hercogamia en una población de Chile Central durante el verano del 2013. Conjuntamente, se confeccionaron familias de hermanos completos - medio hermanos en el

invernadero para determinar la heredabilidad en sentido estrecho del rasgo y las covarianzas genéticas aditivas entre rasgos florales. Los resultados muestran que la población de *M. luteus* es autocompatible y parcialmente autógena. Además, no presenta depresión por endogamia en términos de producción de semillas. Se encontró selección estabilizadora actuando sobre la hercogamia, lo cual sumado a la detección de heredabilidad significativa para el rasgo y ausencia de correlaciones genéticas, permite concluir que niveles intermedios de hercogamia son promovidos entre generaciones, lo cual contribuye a entender la mantención del sistema mixto de reproducción en la población bajo estudio.

Palabras claves: Sistema mixto de reproducción, hercogamia de aproximación, selección fenotípica, heredabilidad, potencial evolutivo.

ABSTRACT

Plant populations can evolve toward different reproductive strategies depending on the ecological context. Even though many plant species have mixed mating systems (selfing and outcrossing simultaneously), the maintenance of such systems continues to being an unsolved question as in principle one of the two reproductive strategies should be selected for. The evolution of mixed systems may result from conflicting selection forces on traits that may promote complete selfing or complete outcrossing depending on the pollination environment. In this study we examined whether intermediate levels of herkogamy are promoted in a population of *Mimulus luteus* (Phrymaceae) in central Chile. *M. luteus* is an autocompatible herbaceous species that presents partial selfing and lack of inbreeding depression which turns this species as a good candidate to evolve a mixed mating system. We examined the selection surface on anther-stigma distance and the extent to which sufficient additive genetic variation exists for this trait to respond to selection across generations. We evaluated selfing levels, inbreeding depression and phenotypic selection upon herkogamy during the summer season of 2013. Selective crossings were performed in the greenhouse to determine the narrow-sense heritability and genetic correlations among flower characters. Results show a high level of self-compatibility and an intermediate level of autogamy. No evidence of inbreeding depression was detected in terms of seed production. Regarding selection, a significant negative quadratic gradient was detected on herkogamy, indicating the

occurrence of stabilizing selection in the summer season of 2013. Likewise, as significant heritability was found for herkogamy and floral traits did not show significant genetic correlations, we conclude that important genetic potential exists for herkogamy to evolve in the population under study, hence providing an explanation for the maintenance of a mixed mating system in this system.

Keywords: Mixed mating system, approach herkogamy, phenotypic selection, heritability, evolutionary potential.

INTRODUCCIÓN

La teoría de la evolución de sistemas reproductivos en plantas predice que en principio las poblaciones debieran evolucionar hacia estados alternativos caracterizados por a) altas tasas de fecundación cruzada (alogamia) y fuerte depresión por endogamia y b) altas tasas de autofecundación (autogamia) y débil depresión por endogamia. Esta visión supone que los sistemas mixtos de reproducción serían un estado de transición entre ambas estrategias (Darwin, 1876; Fisher, 1941; Lande y Schemske, 1985; Lloyd, 1979). Sin embargo, existe un gran número de especies de plantas con sistemas mixtos de reproducción, es decir, con mecanismos relacionados con autogamia y alogamia en forma simultánea, lo cual plantea la interrogante de los mecanismos involucrados en la mantención de los estados intermedios (ver revisión Goodwillie y col., 2005). Tales mecanismos pueden asegurar la autopolinización si los polinizadores no están presentes o se encuentran en baja abundancia y al mismo tiempo pueden promover la polinización cruzada en presencia de polinizadores. En relación a esta modalidad de apareamiento, se ha demostrado teóricamente que niveles intermedios de autofecundación pueden ser evolutivamente estables (Schoen y Brown, 1991; Damgaard y col., 1992; Johnston, 1998). La mantención de sistemas mixtos de reproducción hace referencia a la hipótesis de "lo mejor de ambos mundos", la cual plantea que cuando el ambiente de polinización es variable en el tiempo y los

costos de la autogamia son bajos, tales como el costo en fitness asociado al descuento de polen y/o semillas y a la depresión por endogamia, sistemas mixtos debieran ser favorecidos (Becerra y Lloyd, 1992; Kalisz y col., 2004). Hasta el momento, varios estudios han explorado el potencial evolutivo de una estrategia mixta, todos ellos centrados en la estimación de los niveles de depresión por endogamia y en las tasas de autofecundación y fecundación cruzada en distintas especies de plantas (ver Goodwillie y col., 2005, Winn y col., 2011). Sin embargo, múltiples factores pueden jugar un rol importante e influenciar la mantención de estos sistemas, tales como la dinámica poblacional (Cheptou, 2004) y las interacciones planta-animal (Fausto y col., 2001; Moeller, 2005), entre otros. Asimismo, la evolución de estos sistemas podría ser consecuencia de la evolución de rasgos que limitan la autofecundación y que presentan estados intermedios en las poblaciones naturales. Uno de estos rasgos, es la hercogamia.

La hercogamia hace referencia a la separación espacial de las anteras y el estigma en la estructura floral. Existen varios tipos de hercogamia espacial, pero los más estudiados corresponden a tres categorías: (1) Hercogamia de aproximación: el estigma se encuentra posicionado por sobre las anteras, (2) Hercogamia inversa: el estigma se encuentra posicionado bajo las anteras y, (3) Hercogamia recíproca (también llamada distilia): hace referencia a la presencia simultánea de los dos morfos mencionados anteriormente dentro de una población (Webb y Lloyd, 1986). En especies auto-compatibles, la hercogamia ha sido interpretada como un mecanismo que reduce la autofecundación y por lo tanto, restringe los costos de la

depresión por endogamia, promoviendo el entrecruzamiento (Breese, 1959; Webb y Lloyd, 1986; Barrett y Shore, 1987; Takebayashi y col., 2006). Sin embargo, varias especies de plantas genéticamente auto-incompatibles (i.e., con rechazo al propio polen) y protegidas de la depresión por endogamia, presentan también hercogamia. Debido a lo anterior, se ha sugerido que la hercogamia podría también ser un mecanismo que reduce la interferencia entre la función sexual masculina y femenina de las plantas (Lloyd, y Webb, 1986; Webb y Lloyd, 1986; Harder y Barrett, 1995; Barrett, 2002).

Para determinar si la evolución de los sistemas mixtos de reproducción es estable dentro de una población es necesario medir la relación entre las tasas de autofecundación y el fitness de los individuos. En principio, selección estabilizadora favoreciendo autogamia intermedia podría indicar estabilidad en los sistemas mixtos, mientras que selección direccional podría sugerir que el sistema está en transición evolutiva hacia mayores tasas de autofecundación o de fecundación cruzada (Winn y col., 2011). Esto sugiere que en especies de plantas hermafroditas con esta estrategia de reproducción deberían favorecerse fenotipos que tuvieran distancias antera-estigma que permitan la autofecundación, como un medio de aseguramiento reproductivo en caso de ausencia de un vector de polen externo y a la vez, favorecerse fenotipos que promuevan la fecundación cruzada si hay vectores de polen disponibles. Lo anterior indica que se espera encontrar selección del tipo estabilizadora sobre la hercogamia. Sin embargo, la capacidad de respuesta de las plantas a algún grado de selección estabilizadora dependerá de la cantidad de

varianza genética aditiva asociada a los rasgos blancos del proceso selectivo y a las correlaciones genéticas entre éstos que puedan encontrarse restringiendo dicha evolución (Lande y Arnold, 1983; Falconer y Mackay, 1996; Blows y Hoffmann, 2005). Por lo tanto, la selección sólo puede ser traducida en una respuesta evolutiva si hay un potencial genético que lo permita. A pesar de esto, la extensión en la cual los fenotipos florales reflejan la acción de la selección natural en relación a las limitaciones genéticas es poco conocida (ver Conner, 2002; Ashman y Majetic, 2006). Existe un número limitado de estudios que combinan ambas aproximaciones, por ejemplo Campbell (1996) reporta un alto potencial del ancho de la corola a la respuesta de la selección direccional mediada por polinizador en *Ipomopsis aggregata*, pero por otro lado, encuentra restricciones genéticas para la evolución de la proporción de flores pistiladas a pesar de ser un rasgo bajo fuerte selección. Mitchell y col. (1998) reportan correlaciones genéticas negativas entre el largo del pistilo y el ancho de la corola en *Penstemon centranthifolius*. Los resultados de Caruso (2004) indican que la evolución del despliegue floral puede estar restringida genéticamente por una compensación entre el tamaño y el número de flores en *Lobelia siphilitica*. A pesar que en algunas especies de plantas las diferencias individuales entre la separación antera-estigma reflejan respuestas plásticas a la variación ambiental (Elle y Hare, 2002; Weinig, 2002), investigaciones efectuadas sobre los niveles de heredabilidad de la hercogamia han encontrado heredabilidades moderadas y rápidas respuestas del rasgo a la selección artificial

(Breese, 1959; Shore y Barrett, 1990; Holtsford y Ellstrand, 1992; Carr y Fenster, 1994; Motten y Stone, 2000; Lendvai y Lavin, 2003).

El presente trabajo fue realizado usando como modelo de estudio a la especie herbácea auto-compatible *Mimulus luteus*. Esta especie crece en zonas húmedas de Chile hasta los 3650 m s.n.m. y entre los 29°S y 45°S (von Bohlen, 1995). En Chile, florece y fructifica desde Diciembre a Febrero y las plantas producen una a cuatro flores zigomórficas y hermafroditas que están formadas por cinco pétalos amarillos lobulados. En la mayoría de los casos, las flores presentan una mancha roja en el lóbulo inferior que ha sido descrita como guía de néctar para los polinizadores (Medel y col., 2003). Tanto la corola, como la guía de néctar no reflejan el espectro UV (Botto-Mahan y col., 2004). Las flores de *M. luteus* presentan hercogamia de aproximación y además, poseen un estigma bilobulado que se cierra al contacto físico, lo cual ha sido denominado "hercogamia de movimiento" (Fetscher, 2001; Barret, 2002) (Figura 1). Esta especie no presenta depresión por endogamia en términos de producción y germinación de semillas (Carvallo y Medel, 2010). No obstante, la polinización autónoma produce una disminución en la producción de semillas en comparación con la polinización realizada por algún vector externo de polen (Medel y col., 2003; Pohl y col., 2006). Las tasas de polinización en poblaciones de *M. luteus* son bajas y variables en el tiempo (Medel y col., 2003; Pohl y col., 2006; Carvallo y Medel, 2010; Esterio y col., 2013; R. Medel 2013, 2014 datos no publicados), lo cual sugiere que *M. luteus* es un buen candidato para evolucionar un sistema mixto de reproducción.

El objetivo general de este estudio es examinar si la hercogamia de aproximación es un rasgo sujeto a selección estabilizadora y si posee potencial genético para evolucionar por medio de ésta, promoviendo así la mantención de un sistema mixto de reproducción.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- (i) Determinar los niveles de autogamia y de depresión por endogamia en la población de *M. luteus* ubicada en el Embalse El Yeso,
- (ii) Determinar si existen coeficientes de selección significativos sobre rasgos morfológicos de *M. luteus*, poniendo especial énfasis en la detección de selección sobre la hercogamia de aproximación y
- (iii) Determinar si la hercogamia de aproximación posee potencial genético para evolucionar por selección natural en *M. luteus*.



Figura 1. Flor de *Mimulus luteus*. En la imagen se indica la ubicación del estigma bilobulado y las anteras.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de estudio e historia natural

El estudio de campo se efectuó en el Embalse El Yeso, Región Metropolitana (33°37'S, 70°01'O, 2460 m s.n.m.) durante enero del 2013. El sitio se ubica en una zona altoandina, presentando nevadas invernales que cubren completamente el sector. La vegetación corresponde a asociaciones del piso andino (Teillier y col., 2011) e incluye especies como *Veronica anagallis-aquatica* (Scrophulariaceae), *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), *Cardamine sp* (Brassicaceae), entre las más abundantes. En el sector, es posible encontrar parches mono-específicos de *Mimulus luteus* L. (Phrymaceae). Los experimentos fueron realizados dentro de una parcela cercada para excluir la herbivoría por cabras, caballos y vacas. (Figura 2). Con el fin de realizar una descripción general del ensamble de polinizadores y sus tasas de visitas, se realizaron observaciones focales de una hora (57 h en total) en el periodo de mayor actividad de los polinizadores (8:00 - 12:00 h aproximadamente). Posteriormente, se estimó la tasa de visita por flor por hora para cada observación focal y entonces se calculó el promedio de éstas.



Figura 2. Parche de exclusión de grandes herbívoros.

2.2. Sistema de reproducción

Con el fin de evaluar el sistema de reproducción y los niveles de autogamia en la población, se llevaron a cabo cuatro tratamientos, cada uno sobre 50 flores independientes de diferentes plantas y recién abiertas: (1) Polinización Cruzada Manual (PCM): Flores a las cuales se les añadió una mezcla de polen de diferentes flores provenientes de al menos 10 m de la planta focal. (2) Control (C): Flores sin manipulación y expuestas a polinización natural. (3) Autopolinización Manual (AM): Flores a las cuales se les añadió su propio polen manualmente y posteriormente embolsadas para evitar contaminación con polen externo. (4) Autopolinización Espontánea (AE): Botones sin manipular que fueron embolsados para excluir a los polinizadores. Luego del período de fructificación, todas las

cápsulas fueron recolectadas y sus semillas fueron contadas por observación directa en el laboratorio. Los tratamientos fueron utilizados para estimar tres índices:

1. Índice de Auto-Incompatibilidad (ISI: Index of self-incompatibility):
Calculado como $ISI = AM/PCM$. Este índice toma valores entre 0 y 1, siendo 1 en especies auto-compatibles y menor o igual a 0,2 en especies auto-incompatibles. Especies con valores intermedios se consideran auto-compatibles incompletas (Ruiz y Arroyo, 1978).
2. Índice de Autopolinización Automática (IAS: Index of automatic self-pollination):
Calculado como $IAS = AE/AM$ y es utilizado sólo en especies auto-compatibles para determinar el grado de autogamia en la población. Este índice toma valores entre 0 y 1, siendo 1 en especies completamente autógamas y 0 en especies auto-compatibles con mecanismos que evitan el auto-cruzamiento. Especies con valores intermedios se consideran parcialmente autógamas (Ruiz y Arroyo, 1978).
3. Índice de depresión por endogamia (δ):
Calculado como $\delta = [1 - (AM/PCM)]$. Este índice toma valores entre 0 y 1, siendo mayor que 0,5 en especies que presentan alguna consecuencia debido a la endogamia (Charlesworth y Charlesworth 1979, 1987, Lande y Schemske, 1985; Jarne y Charlesworth, 1993).

↩

Adicionalmente y dado que los datos no presentaron una distribución normal, se realizó un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y una comparación múltiple *a posteriori* para evaluar las diferencias entre la producción de semillas de cada tratamiento (Sokal y Rohlf, 1995).

2.3. Selección fenotípica

Para examinar la relación funcional entre la distancia antera-estigma y la producción de semillas se marcaron de forma aleatoria 120 plantas y se utilizaron entre 1 a 3 flores recién abiertas por planta, dependiendo de la disponibilidad. En cada flor se midió la separación entre el estigma y la antera más próxima utilizando un pie de metro digital ($\pm 0,01$ mm). Adicionalmente, se midieron otros rasgos asociados con el éxito reproductivo de las plantas: el tamaño de la corola (mm^2), el tamaño de la guía de néctar (mm^2) y el número de granos de polen por antera (Medel y col., 2003; Medel y col., 2007; R. Medel, datos no publicados). Para estimar el tamaño de la corola y de la guía de néctar se tomaron fotos perpendiculares al plano de la flor. En cada fotografía se usó una regla como escala para convertir una medida lineal en pixeles y así poder obtener el área de las estructuras utilizando el programa ImageJ (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). Para determinar el número de granos de polen por antera, se colectaron dos anteras de cada flor y se almacenaron en tubos Eppendorf con etanol 70%. Posteriormente en el laboratorio, se utilizó un contador de cultivo (Beckman Z1) para determinar la cantidad de polen en cada muestra. Las muestras fueron centrifugadas a 1300 rpm

por 2 min para separar los granos de polen del líquido. Luego, el sedimento fue re-suspendido en 10 ml de NaCl 1% para su procesamiento. El contador determina el número de partículas en 0,5 ml de la dilución anterior, por lo tanto se calculó el número de granos de polen por muestra considerando este factor de dilución. Todas las muestras fueron recolectadas antes de que los polinizadores llegaran al sitio de estudio. Luego del período de fructificación se recolectaron las cápsulas de las plantas y se determinó el número de semillas por cápsula.

Para el análisis de selección se utilizó como variables predictoras, 1) la separación antera-estigma, 2) el área de la corola, 3) el área de la mancha y 4) el número de granos de polen por antera. Cada variable (promedios por planta) fue estandarizada a un promedio = 0 y varianza = 1 para expresar el cambio fenotípico en unidades de desviación estándar y hacer que los resultados fueran comparables entre variables y omitir efectos de escala. La variable respuesta fue el fitness femenino relativo, estimado mediante: $w = w_i / W_{\text{promedio poblacional}}$, en que w es el fitness relativo y w_i el fitness individual. La selección total actuando sobre cada rasgo (i.e., la selección actuando directamente sobre el rasgo más la selección actuando indirectamente sobre rasgos correlacionados) fue estimada usando el diferencial de selección direccional (S'). Esta medida fue calculada como la covarianza entre cada variable estandarizada y el fitness relativo, $S_i = \text{COV}(z_i, w)$ y su significancia fue evaluada a través de una correlación por permutaciones usando 5000 iteraciones bootstrap. Luego, se estimó la selección directa actuando sobre los rasgos a través del cálculo de gradientes lineales y no lineales de selección. El

gradiente lineal de selección fue calculado usando el modelo lineal multivariado propuesto por Lande y Arnold (1983):

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

donde w es el fitness relativo, α es el intercepto, β_i representa la pendiente de la relación parcial entre el rasgo z_i y w , y ε es un término de error. El valor de β_i indica la magnitud y dirección de la selección direccional actuando sobre cada rasgo. Los gradientes no lineales de selección describe el tipo de selección no lineal actuando sobre el rasgo (i.e., selección disruptiva o estabilizadora) y sobre la correlación entre dos rasgos. Esos gradientes (γ_{ii} y γ_{ij}) fueron estimados desde los coeficientes de segundo orden en:

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

donde γ_{ii} corresponde a la curvatura de la relación entre el rasgo i y w . Valores positivos indican concavidad hacia arriba y representan selección disruptiva. Valores negativos indican concavidad hacia abajo y representan selección estabilizadora. El término γ_{ij} representa la selección actuando sobre la correlación de los rasgos i y j . Los gradientes lineales de selección fueron estimados sólo a través del modelo lineal multivariado porque cuando un carácter se aleja de la distribución multivariada normal, z_i y z_i^2 en el modelo cuadrático pueden estar intercorrelacionados (Lande y Arnold, 1983). Los modelos de selección fueron



probados para multicolinealidad por medio de la estimación del factor de inflación de la varianza (VIFs). No existió multicolinealidad para ninguna variable en los modelos de selección (véase Hair y col., 1992). La significancia estadística de los gradientes lineales y no lineales fue obtenida directamente desde los valores de p del análisis de regresión múltiple. No se realizó ninguna corrección sobre el nivel de significancia (Bonferroni). El uso de este tipo de corrección se ha puesto en duda durante los últimos años, ya que reduce el poder estadístico incrementando el error de tipo II (Moran, 2003; Nakagawa, 2004). Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa R-project (R Development Core Team 2014).

Para visualizar la forma de la función del fitness respecto a la hercogamia y por lo tanto, localizar el máximo y mínimo del fitness dentro del rango de fenotipos, se estimó un spline cúbico univariado (Schluter, 1988). Este procedimiento corresponde a una función de ajuste de regresión no paramétrica que proporciona una predicción cuantitativa del fitness a través de un rango de valores de un rasgo cuantitativo. Esta función es útil para predecir las diferencias de fitness entre los individuos (y), a través de la estimación de la superficie de fitness, f , como función de la variable independiente z : $y = f(z) + \text{error aleatorio}$, donde y representa la sobrevivencia, el éxito reproductivo o alguna otra medida que posea para cada z una distribución normal, binomial o de Poisson. El objetivo de este procedimiento es estimar la superficie f sin realizar ningún supuesto previo acerca de su forma. La forma de la superficie de fitness puede variar dependiendo del intervalo del rasgo sobre el cual es realizada la estimación (λ), por lo tanto, en este estudio se utilizó el

intervalo del rasgo que minimizó la predicción de error del modelo. El error estándar de cada superficie de regresión predicha fue estimado utilizando 5000 iteraciones por bootstrap.

2.4. Análisis de parámetros genéticos

Con el fin de evaluar el potencial genético que poseen los caracteres bajo estudio para evolucionar por selección natural, se estimó la varianza genética aditiva y covarianza genética aditiva para cada rasgo y par de rasgos desde un diseño North Carolina tipo II. Los experimentos fueron realizados entre agosto de 2013 y junio de 2014 en condiciones controladas de invernadero (18-22°C con 16 h luz/día). Con semillas recolectadas en terreno (véase sección 2.1) se creó una población parental (P) (n = 120 plantas/ 3 réplicas por planta). Las semillas fueron germinadas en maceteros con sustrato Sunshine Mix #3 y crecidas hasta la producción de flores. A partir de esta población parental se efectuaron cruzamientos selectivos de modo de crear familias de hermanos completos/medio hermanos por medio del cruzamiento entre 20 plantas dadoras de polen (sires) con 2 plantas receptoras de polen por cada sire (dams). Las semillas de la F2 (i.e., provenientes de los cruzamientos de la F1) fueron germinadas en maceteros con Sunshine Mix #3 y dispuestas aleatoriamente sobre dos mesas (n = 40 plantas/ 3-7 réplicas por planta, total= 227 plantas). En el periodo de floración de la F2 se midieron en dos flores por planta los siguientes rasgos: separación antera-estigma, área de la corola, área de mancha y la cantidad de polen por antera (véase métodos

en la sección 2.2). Al igual que en el análisis de selección, cada variable (promedios por planta) fue estandarizada a promedio = 0 y varianza = 1.

La estimación de los componentes de la varianza y covarianza genéticas se efectuó mediante máxima verosimilitud restringida REML. A partir de la matriz G resultante se estimaron los valores de heredabilidad en sentido estrecho (h^2) y las correlaciones genéticas (r_A) para todos los rasgos y pares de rasgos florales. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa ASReML 3.0 (Gilmour y col., 2009). Los errores estándar para h^2 y r_A entregados por ASReML fueron utilizados para determinar si los parámetros genéticos proporcionados diferían significativamente de cero (Elle, 1998; Caruso, 2004). Se realizó una prueba t de Student para una muestra, donde el valor de t fue calculado como la división entre h^2 o r_A y su error estándar (Zar, 1999). Debido a que la heredabilidad es un parámetro que varía entre 0 - 1, mientras que las correlaciones genéticas varían entre -1 y 1, se utilizó un test de t de una y dos colas respectivamente. Al igual que en el punto anterior, no se realizó ninguna corrección sobre el nivel de significancia.

RESULTADOS

3.1. Descripción del ensamble de polinizadores

En el sitio de estudio fue posible encontrar seis especies de abejorros polinizando las flores de *M. luteus* (Tabla 1). La tasa de visitas total fue de 0,031 visitas · flor⁻¹ · hora⁻¹.

Tabla 1. Tasa de visita (visitas · flor⁻¹ · hora⁻¹), error estándar (EE) y número de visitas total para *M. luteus* por especie de polinizador ($n = 57$ h).

Especie de	Tasa de visita	EE	Nº visitas total
<i>Megachile saulcyi</i>	0,0130	0,004	130
<i>Bombus terrestris</i>	0,0096	0,005	205
<i>Centris chilensis</i>	0,0046	0,002	56
<i>Centris nigerrima</i>	0,0042	0,002	72
<i>Megachile semirufa</i>	0,0021	0,001	27

3.2. Sistema de reproducción

La producción de semillas fue significativamente distinta entre los tratamientos (promedio ± EE: PCM = 840, 50 ± 69,63; AM = 659,96 ± 51,93; C = 524,74 ± 73,46; AE = 174,52 ± 31,75; $H_2 = 49,48$; $n = 187$; $P < 0,0001$). El tratamiento Control (C) produjo menos semillas que los tratamientos en los cuales se añadió polen manualmente (PCM, AM). Asimismo, flores con autopolinización espontánea (AE) produjeron menos semillas que los demás tratamientos (Figura 3). Los resultados de los índices sugieren que *M. luteus* es una especie auto-compatible (ISI = 0,79) y

que la población es parcialmente autógena (IAS = 0,26). El índice de depresión por endogamia fue de $\delta = 0,21$, lo cual indica que la autogamia no reduce la producción de semillas en esta población.

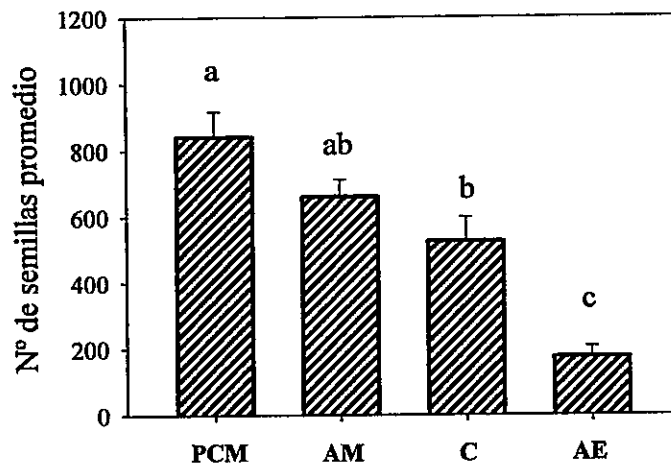


Figura 3. Efecto del sistema de apareamiento sobre la producción de semillas. PCM: Polinización cruzada manual, AM: Autopolinización manual, C: Control, AE: Autopolinización espontánea. Las barras muestran el promedio y un error estándar. Diferentes letras señalan diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis con comparación múltiple *a posteriori*.

3.3. Análisis de selección fenotípica

Del total de plantas marcadas (120 plantas; 263 flores) se logró recuperar el 85% de éstas (102 plantas; 177 cápsulas). Los resultados revelaron una alta variabilidad en el número de semillas producido por planta (rango: 0 - 2304 semillas), siendo el promedio (\pm EE) de $830,4 \pm 437,7$ semillas. Los valores promedio de la distancia antera-estigma, del área de la corola, del área de la guía de néctar y del número de granos de polen se indican en la Tabla 2. Se encontró que la mayoría de las plantas

posee distancias antera-estigma intermedias, mientras que fenotipos alternativos se encuentran menos representados en la población. A pesar de ello, existe variabilidad en el rasgo y por lo tanto, puede ser seleccionado (Figura 4).

Tabla 2. Valores promedio y errores estándar (EE) para cuatro rasgos de *Mimulus luteus* utilizados en el análisis de selección fenotípica ($n = 102$ plantas).

Variable	Promedio	EE
Separación antera-estigma (mm)	4,13	0,13
Área corola (mm ²)	536,63	10,57
Área guía néctar (mm ²)	14,19	1,78
Nº granos de polen	21614,10	350,49

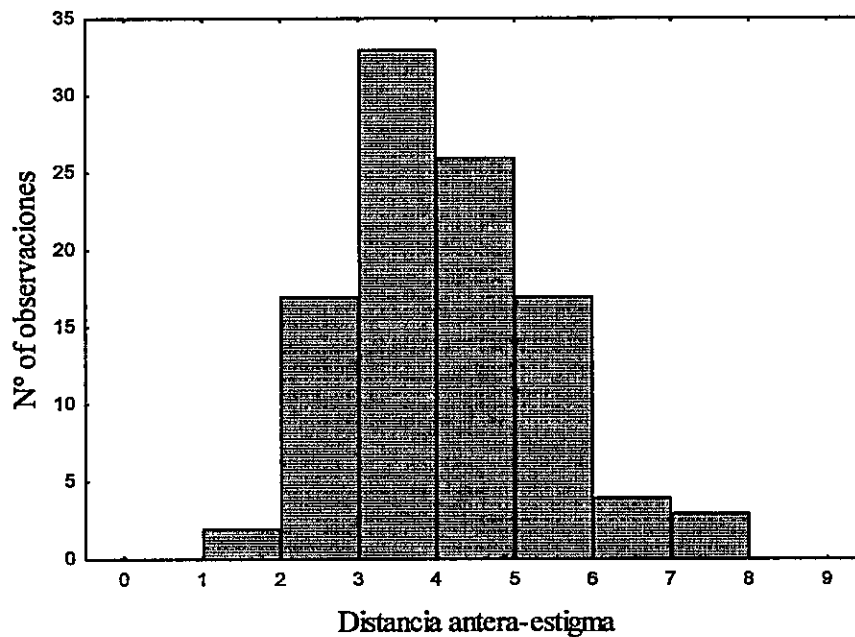


Figura 4. Distribución de frecuencias de la hercogamia para *Mimulus luteus*.

Se encontró que el diferencial de selección para el área de la corola fue positivo y estadísticamente significativo ($S_i' = 0,103$; $P = 0,028$), lo que indica que tamaños de corola más grande estarían siendo promovidos en esta población. Además, se detectó un gradiente cuadrático negativo y significativo, aunque débil, para la distancia antera-estigma ($\gamma_{ii}' = -0,081$; $P = 0,044$), lo que indica existencia de selección estabilizadora sobre este rasgo. Esto significa que plantas cuyas flores poseen una distancia antera-estigma intermedia estarían siendo promovidas en la población (Tabla 3, Figura 5).

Tabla 3. Análisis de selección fenotípica para cuatro rasgos de *Mimulus luteus*. Se indican los diferenciales de selección (S_i'), los gradientes de selección lineal (β_i') y no lineal (γ_{ii}' , γ_{ij}') estandarizados. En paréntesis se señala el error estándar ($n = 102$ plantas) * $P < 0,05$.

	S_i'	β_i'	γ_{ii}'	Área guía néctar	Área corola	Nº granos polen
				γ_{ij}'	γ_{ij}'	γ_{ij}'
Separación antera-estigma	0,013	0,023(0,054)	-0,081(0,040)*	-0,016(0,091)	0,118(0,066)	-0,012(0,079)
Área guía néctar	0,019	0,010(0,055)	0,008(0,050)	-	-0,028(0,079)	0,081(0,063)
Área corola	0,103*	0,089(0,057)	0,078(0,055)	-	-	-0,062(0,069)
Nº granos polen	0,067	0,037(0,056)	-0,008(0,048)	-	-	-

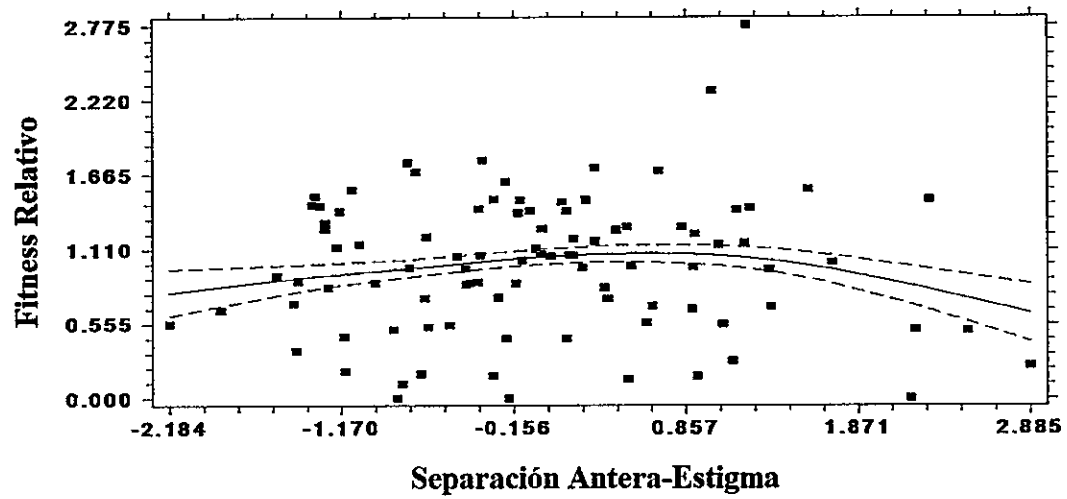


Figura 5. Spline cúbico estimado para la separación antera-estigma ($\lambda = 0,5$). Líneas segmentadas representan ± 1 EE estimado desde 5000 iteraciones por bootstrap.

No se detectaron gradientes de selección lineales y no-lineales significativos para ningún otro rasgo en estudio. Tampoco se detectó selección correlacional entre los rasgos examinados (Tabla 3).

3.4. Estimación de parámetros genéticos

Los valores promedio de la separación antera-estigma, el área de la corola, el área de la mancha y el número de granos de polen registrados en invernadero se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores promedio y errores estándar (EE) para cuatro rasgos de *Mimulus luteus* utilizados en los análisis genéticos ($n = 227$ plantas).

Variable	Promedio	EE
Separación antera-estigma (mm)	4,61	0,09
Área corola (mm ²)	163,45	10,85
Área guía néctar (mm ²)	5,22	0,35
Nº granos de polen	42436,34	730,07

Globalmente, los valores de heredabilidad fueron relativamente bajos (rango: 0,11 – 0,19), aunque en su mayoría estadísticamente diferentes de cero. La heredabilidad para la hercogamia fue altamente significativa ($h^2 = 0,13$; $t = 20,77$; $n = 227$; $P < 0,0001$). Por otra parte, la heredabilidad para el número de granos de polen por antera no fue significativa. Los valores de correlación genética entre los rasgos en estudio fueron bajos y no significativos (Tabla 5).

Tabla 5. Heredabilidad (en negrita en la diagonal) y correlaciones genéticas (bajo la diagonal) para cuatro rasgos medidos en *Mimulus luteus*. En paréntesis se señala el error estándar ($n = 227$ plantas) * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

	Separación antera-estigma	Área Corola	Área Guía Néctar	Nº granos polen
Distancia antera-estigma	0,13(0,01)***	-	-	-
Área Corola	0,33(0,41)	0,19(0,10)*	-	-
Área Guía Néctar	0,14(0,42)	0,10(0,37)	0,17(0,09)*	-
Nº granos polen	0,13(0,59)	0,41(0,58)	0,44(0,65)	0,11(0,14)

DISCUSIÓN

En este estudio se examinó el potencial evolutivo de la hercogamia de aproximación en *M. luteus* como mecanismo para promover un sistema mixto de reproducción. En primer lugar, se observó que esta especie herbácea es altamente autocompatible y posee el potencial de producir semillas por autofecundación ($ISI = 0,79$). Sin embargo, si bien las plantas se pueden reproducir por autogamia, la producción de semillas mediante esta modalidad es relativamente baja en comparación con la obtenida en presencia de un vector externo de polen ($AIS = 0,26$; Figura 3). Esto se ha reportado en trabajos previos sobre *M. luteus*, donde se señala que la especie es autocompatible, pero requiere de un vector de polen para asegurar su éxito reproductivo (Medel y col., 2003; Pohl y col., 2006). A pesar de lo anterior, en el sitio de estudio las tasas de visita son bajas (Tabla 1). La población no sufre depresión por endogamia al menos respecto a la producción de semillas ($\delta = 0,21$), lo cual concuerda con resultados previos reportados por Carvallo y Medel (2010) quienes encuentran bajos índices de depresión por endogamia en términos de producción y germinación de semillas en una población de *M. luteus* ubicada en el Parque Nacional El Morado, Región Metropolitana. Estudios realizados sobre *Mimulus guttatus* en Norteamérica no han evidenciado efectos de consanguinidad en etapas posteriores del ciclo de vida (Carr y Eubanks, 2002; Ivey y col., 2004). De acuerdo a lo señalado anteriormente y debido a la ausencia de costos importantes

de la autogamia, es posible concluir que *M. luteus* presenta un sistema mixto de reproducción, donde la producción de semillas resulta de la contribución de la autopolinización y de la polinización cruzada.

El hecho de que la producción de semillas por autofecundación espontánea sea relativamente baja, pero que a su vez genere en promedio más de cien semillas por cápsula, sugiere que la hercogamia de aproximación evita este fenómeno de forma parcial y que la autofecundación sería una forma de aseguramiento reproductivo en caso de ausencia completa de un vector externo de polen. Por otra parte, respecto a la dinámica estigmática, a pesar de que no fue evaluada en este estudio, la hercogamia de movimiento ha sido clasificada más bien como un mecanismo que reduciría la interferencia entre la función sexual masculina y femenina de la planta, más que como un mecanismo que evite la autofecundación (Webb y Lloyd, 1986; Fetscher, 2001; Barrett, 2002).

Los resultados del análisis de selección fenotípica revelaron que el diferencial de selección fue positivo y significativo para el área de la corola (Tabla 3). Lo anterior implica que se estaría promoviendo un cambio en el promedio hacia corolas más grandes por medio de selección directa o indirecta a través de rasgos correlacionados. Sin embargo, esto no se refleja en gradientes lineales (β_i') y no lineales (γ_{ij}') significativos, posiblemente debido a que la mayor parte de la contribución del rasgo al fitness ocurre a través de efectos indirectos de correlación con otros caracteres seleccionados o con alguna otra variable no incorporada en este estudio y que se encuentre bajo selección (Lande y Arnold, 1983).

La selección estabilizadora actuando sobre la hercogamia de aproximación indica que se estarían promoviendo fenotipos con distancias antera-estigma intermedias en esta población (Tabla 3, Figura 5). Un aumento del fitness en fenotipos con hercogamia intermedia ha sido reportado con anterioridad en *Narcissus longispathus* por Medrano y col. (2005). En ese estudio los autores sugieren que sus resultados serían indicadores de selección estabilizadora mediada por polinizadores. Ellos proponen que este fenómeno tiene relación con el comportamiento de forrajeo del polinizador. Dado que *N. longispathus* presenta depresión por endogamia, los autores postulan que las flores con hercogamia intermedia tienen mayores tasas de polinización cruzada ya que sus estigmas no estarían ni demasiado cerca de los estambres (donde las abejas gastan mucho tiempo recolectando polen e induciendo frecuentemente la autogamia), ni demasiado cerca del borde de la corola donde se ubica el estigma de la flor (donde las abejas se detienen para termorregular antes de partir el vuelo, induciendo también la autogamia). La morfología de *N. longispathus* es diferente de la de *M. luteus* por lo que este mecanismo no puede ser invocado para explicar nuestros resultados. *M. luteus* presenta hercogamia de movimiento, es decir, el estigma se cierra al primer contacto mecánico con el polinizador y por lo tanto, no existe la posibilidad de transferencia de polen mientras el polinizador se encuentra forrajeando dentro de la flor. El estigma se cierra rápidamente al contacto (en promedio se demora $3,19 \pm 0,25$ s; $n = 40$ plantas) y se reabre luego de $1279,42 \pm$

58,59 s ($n = 40$ plantas) al recibir polen, tiempo suficiente para que el polinizador se haya retirado de la flor (R. Medel, datos no publicados).

En consideración a lo anterior, la pregunta que sigue a continuación es ¿Por qué fenotipos con distancias antera-estigma intermedias poseen un mayor fitness que los extremos del rango de distribución de fenotipos? Por una parte, se podría esperar que en un ambiente con bajas tasas de polinización, flores con niveles de hercogamia muy pronunciados produzcan en promedio menos semillas que los demás fenotipos ya que tendrían una menor posibilidad de autofecundarse. Estudios previos han reportado una relación positiva entre la distancia antera-estigma y las tasas de polinización cruzada en otras especies florales (Breese, 1959; Karron y col., 1997; Brunet y Eckert, 1998; Motten y Stone, 2000), lo cual sugiere que a mayores valores de hercogamia, menores tasas de autocruzamiento y por lo tanto menor producción de semillas. Sin embargo, si *M. luteus* es una especie autocompatible y libre de las consecuencias negativas de la consanguinidad ¿Por qué fenotipos con distancias antera-estigma pequeñas no son favorecidos frente a fenotipos con separación intermedia? Una posible explicación se relaciona con la hercogamia de movimiento. Flores con bajas distancias antera-estigma en principio tienen una mayor probabilidad de depositar su propio polen sobre los estigmas debido a la cercanía de estas estructuras reproductivas y éstos se mantienen cerrados alrededor de 20 min desde el contacto con el polen (R. Medel, datos no publicados), por lo tanto, los fenotipos con distancias cortas tienen mayor probabilidad que los estigmas se encuentren cerrados al momento de una eventual

visita de un polinizador. Los análisis de selección se realizaron en condiciones naturales de polinización, es decir, el número de semillas producidas por cada flor se encuentra determinado por la autopolinización más la polinización cruzada. De acuerdo a esto, es probable que flores con menores niveles de hercogamia tengan mayores tasas de autocruzamiento que de polinización cruzada. De hecho, una reducción de la distancia antera-estigma ha sido directamente relacionada con altas tasas de autofecundación y una disminución de las tasas de polinización cruzada en otras especies de *Mimulus* (Dole, 1992; Karron y col., 1997). Lo anterior, sumado al hecho de que la autopolinización espontánea genera una menor cantidad de semillas en comparación a la producida por un vector de polen (Figura 3), podría explicar el menor fitness de estos fenotipos. Por lo tanto, flores con distancias antera-estigma intermedias poseerían la ventaja de permitir algún grado de autopolinización en caso de ausencia o poca abundancia de polinizadores en el ambiente, pero a la vez tienen una mayor probabilidad de que sus estigmas se encuentren abiertos en caso de la eventual visita de un polinizador.

Los resultados del análisis de parámetros genéticos arrojaron una heredabilidad relativamente baja aunque muy significativa para la hercogamia (Tabla 5), lo cual indica que este es un rasgo que posee potencial para evolucionar por selección natural. Estudios en otras especies han reportado que la separación antera-estigma posee un fuerte componente genético (e.g. Breese, 1959; Shore y Barrett, 1990; Holtsford y Ellstrand, 1992; Carr y Fenster, 1994; Campbell, 1996; Motten y Stone, 2000; Lendvai y Lavin, 2003; Herlihy y Eckert, 2007). Por lo tanto

este trabajo, en conjunto con estudios previos en otras especies, indicaría que la hercogamia de aproximación es un rasgo con la suficiente varianza genética aditiva como para evolucionar en caso de encontrarse bajo selección natural. Las bajas heredabilidades del área de la corola y del área de la guía de néctar también fueron significativas, lo cual indica que estos rasgos también poseen potencial genético para evolucionar a través de la selección natural. Por otra parte, no se encontraron correlaciones genéticas significativas entre ningún par de rasgos bajo estudio (Tabla 5), lo cual sugiere que al menos la arquitectura genética de estos rasgos florales no restringe la evolución adaptativa de la hercogamia.

Considerando que se encontró selección estabilizadora sobre la hercogamia y potencial genético de este rasgo para evolucionar, podemos decir que de mantenerse estable la selección a través del tiempo, esta población de *M. luteus* respondería disminuyendo la variación en torno al promedio de la distancia antera-estigma. Lo anterior, podría promover un sistema mixto de reproducción contribuyendo a mantener niveles intermedios de auto y alogamia. Por lo tanto, para entender la dinámica de estos sistemas reproductivos se vuelve relevante conocer la magnitud de la depresión por endogamia a lo largo del ciclo de vida de esta especie y el grado en el cual se va purgando la carga genética. Estudios teóricos sugieren que el tamaño y estructura de la población pueden influenciar ambos mecanismos (Whitlock y col., 2000; Glemin, 2003). Estudios posteriores son necesarios para evaluar la consistencia de la selección estabilizadora sobre la hercogamia a través del tiempo y la variabilidad del ensamble de polinizadores a

través de los años. Sumado a lo anterior, también se vuelve relevante conocer la contribución real de la autofecundación (selfing) y de la polinización cruzada en condiciones naturales de polinización, así como el equilibrio resultante entre estas dos formas de reproducción en la población.

CONCLUSIONES

Varios estudios han documentado que las tasas de polinización sobre *M. luteus* son bajas, lo cual conduce a proponer que la especie presenta un sistema autógamo o mixto de reproducción (autogamia y alogamia simultáneamente). En la población de *M. luteus* del embalse El Yeso, es posible encontrar varias especies de abejorros polinizando a *M. luteus*, pero consistente con estudios anteriores, las tasas de visita son más bien bajas. La población es auto-compatible, parcialmente autógama y no presenta depresión por endogamia en términos de producción de semillas. Con el propósito de evaluar si la hercogamia representa un mecanismo que promueve un sistema mixto de reproducción, se estimó el potencial evolutivo de este rasgo mediante un análisis de selección fenotípica sobre el componente femenino del fitness y se estimó el potencial genético para responder a la selección.

Los resultados revelaron selección estabilizadora actuando sobre la hercogamia de aproximación y presencia de potencial genético de este rasgo para responder a la selección. Por lo tanto, es posible esperar una mantención de valores intermedios de hercogamia conjuntamente a una disminución de la variación en torno al promedio de la distancia antera-estigma. Los niveles intermedios de hercogamia promueven la mantención un sistema mixto de reproducción en la población al permitir la autofecundación de forma parcial. El mayor fitness de fenotipos con distancias antera-estigma intermedias podría ser consecuencia de la



baja tasa de visita en el lugar (desventaja para fenotipos con distancias muy grandes) y de la dinámica estigmática (desventaja para fenotipos con distancias muy cortas), que disminuyen la probabilidad de la polinización cruzada. No se encontraron correlaciones genéticas significativas entre ningún par de rasgos bajo estudio (i.e. hercogamia, área corola, área guía néctar, cantidad de polen), lo cual sugiere que al menos la arquitectura genética de estos rasgos no restringe la evolución de la hercogamia.

REFERENCIAS

- Ashman, T.L., Majetic, C.J. 2006. Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity* 96: 343-352.
- Barrett, S.C.H. 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88:154-159.
- Barrett, S.C.H., Shore, J.S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41:340-354.
- Becerra, J.X., Lloyd, D.G. 1992. Competition dependent abscission of self-pollinated flowers of *Phormium tenax*: a second action of self-incompatibility at the whole flower level. *Evolution* 46: 90-110.
- Botto-Mahan, C., Pohl, N., Medel, R. 2004. Nectar guide fluctuating asymmetry does not relate to female fitness in *Mimulus luteus*. *Plant. Ecol.* 174: 347-352.
- Blows, M.W., Hoffmann, A.A. 2005. A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology* 86: 1371-1384.
- Breese, E.L. 1959. Selection for differing degrees of outbreeding in *Nicotiana rustica*. *Ann. Bot.* 23: 331-344.
- Brunet, J., Eckert, C.G. 1998. Effects of floral morphology and display on outcrossing in blue columbine, *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae). *Funct. Ecol.* 12: 596-606
- Campbell, D.R. 1996. Evolution of floral traits in a hermaphroditic plant: Field measurements of heritabilities and genetic correlations. *Evolution* 50: 1442-1453.
- Carr, D.E., Fenster, C.B. 1994. Levels of genetic variation and covariation for *Mimulus* (Scrophulariaceae) floral traits. *Heredity* 72: 606-618.
- Carr, D.E., Eubanks, M. 2002. Inbreeding alters resistance to insect herbivory and host plant quality in *Mimulus guttatus* (Schrophulariaceae). *Evolution* 56: 22-30.
- Caruso, C.M. 2004. The quantitative genetics of floral trait variation in *Lobelia*: potential constraints on adaptive evolution. *Evolution* 58: 732-740.
- Carvallo, G., Medel, R. 2010. Effects of herkogamy and inbreeding on the mating system of *Mimulus luteus* in the absence of pollinators. *Evol. Ecol.* 24: 509-522.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. 1979. Selection on recombination in a multilocus system. *Genetics* 91: 575-580.

- Charlesworth, D., Charlesworth, B. 1987. The effects of investment in attractive structures on allocation to male and female function in plants. *Evolution* 41: 948-968.
- Cheptou, P.O. 2004. Allee effect and selffertilization in hermaphrodites: reproductive assurance in demographically stable populations. *Evolution* 58: 2613-21.
- Conner, J.K. 2002. Genetic mechanisms of floral trait correlations in a natural population. *Nature* 420: 407-410.
- Damgaard, C., Couvet, D., Loeschcke, V. 1992. Partial selfing as an optimal mating strategy. *Heredity* 69: 289-295.
- Darwin, C.R. 1876. *The Effects of Cross and Self-fertilization in the Vegetable Kingdom*. London: Murray.
- Dole, J.A. 1992. Reproductive assurance mechanisms in three taxa of the *Mimulus guttatus* complex (Schrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 79: 650-659.
- Elle, E. 1998. The quantitative genetics of sex allocation in the andromonoecious perennial, *Solanum carolinense* (L.). *Heredity* 80: 481-488.
- Elle, E., Hare, J.D. 2002. Environmentally induced variation in floral traits affects the mating system in *Datura wrightii*. *Func. Ecol.* 16: 79-88.
- Esterio, G., Cares-Suarez, R., Gonzalez-Browne, C., Salinas, P., Carvallo, G., Medel, R. 2013. Assessing the impact of the invasive buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*) on the pollination of the native Chilean herb *Mimulus luteus*. *Arthropod Plant Interact.* 7: 467-474.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman, Harlow, U.K.
- Fausto, J.A., Eckhart, V.M., Geber, M.A. 2001. Reproductive assurance and the evolutionary ecology of self-pollination in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 88: 1794-1800.
- Fetscher, A.E. 2001. Resolution of male-female conflict in a hermaphroditic flower. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268:525-529.
- Fisher, R.A. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Ann. Eugen.* 11: 53-63.

Gilmour, A.R., Gogel, B.J., Cullis, B.R. and Thompson, R. (2009). ASREML User Guide. VSN International, Hemel Hempstead, United Kingdom. <http://www.asreml.co.uk>

Glemin, S. 2003. How are deleterious mutations purged? Drift versus nonrandom mating. *Evolution* 57: 2678-2687.

Goodwillie, C., Kalisz S., Eckert C.G. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:47-79.

Hair, J.F., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C. 1992. *Multivariate data analysis with readings*. New York.

Harder, L.D., Barrett, S.C.H. 2007. Evolutionary analysis of a key floral trait in *Aquilegia canadensis* (ranunculaceae): Genetic variation in herkogamy and its effect on the mating system. *Evolution* 61-7: 1661-1674.

Herlihy, C.R., Eckert, C.G. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature* 416: 320-323.

Holtsford, T.P., Ellstrand, N.C. 1992. Genetic and environmental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Evolution* 46: 216-225.

Ivey, C.T., Carr, D.E., Eubanks, M.D. 2004. Effects of inbreeding in *Mimulus guttatus* on tolerance to herbivory in natural environments. *Ecology* 85: 567-574.

Jarne, P., Charlesworth, D. 1993. The evolution of the selfing rate in functionally hermaphroditic plants and animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 441-466.

Johnston, M.O. 1998. Evolution of intermediate selfing rates in plants: pollination ecology versus deleterious mutations. *Genetica* 102/103: 267-278.

Kalisz, S., Vogler, D.W., Hanley, K.M. 2004. Context-dependent autonomous self fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430: 884-887.

Karron, J.D., Jackson, R.T., Thumser, N.M., Schlicht, S.L. 1997. Outcrossing rates of *Mimulus ringens* genets are correlated with anther-stigma separation. *Heredity* 79: 365-370.

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

Lande, R., Schemske, D.W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic Models. *Evolution* 39: 24-40.

Lendvai, G., Levin, D.A. 2003. Rapid response to artificial selection on flower size in *Phlox*. *Heredity* 90: 336-342.

Lloyd, D.G. 1979. Some reproductive factors affecting the evolution of selffertilization in plants. *Am. Nat.* 113: 67-79.

Lloyd, D.G., Webb, C.J. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. I. Dichogamy. *New Zeal. J. Bot.* 24: 135-162.

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

Medel, R., Valiente, A., Botto-Mahan, C., Carvallo, G., Pérez, F., Pohl, N., Navarro, L. 2007. The role of insects and hummingbirds on the geographical variation of the flower phenotype in *Mimulus luteus* (Phrymaceae). *Ecography* 30: 812-818.

Medrano, M., Herrera, C.M., Barrett, S.H.C. 2005. Herkogamy and mating patterns in the self-compatible Daffodil *Narcissus longispathus*. *Ann. Bot.* 95: 1105-1111.

Mitchell, R.J., Shaw R.G., Waser N.M. 1998. Pollinator selection, quantitative genetics, and predicted evolutionary responses of floral traits in *Penstemon centranthifolius* (Scrophulariaceae). *Int. J. Plant Sci.* 159: 331-337.

Moeller, D.A. 2005. Pollinator community structure and sources of spatial variation in plant pollinator interactions in *Clarkia xantiana* ssp. *xantiana*. *Oecologia* 142: 28-37.

Moran, M.D. 2003. Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* 100: 403-405.

Motten, A.F., Stone, J.L. 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 87: 339-347.

Nakagawa, S. 2004. A farewell to Bonferroni: the problems of low statistical power and publication bias. *Behavioral Ecology* 15: 1044-1045.

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

R Development Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ruiz-Zapata, T., Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary decidius tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230.

Schemske, D.W., Lande, R. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 41-52.

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

Schoen, D.J., Brown, A.H.D. 1991. Whole- and part-flower self-pollination in *Glycine clandestina* and *G. argyrea* and the evolution of autogamy. *Evolution* 45: 1665-1674.

Shore, J.S., Barrett, S.C.H. 1990. Quantitative genetics of floral characters of homostylous *Turnera ulmifolia* var. *an-gustifolia* Willd. (Turneraceae). *Heredity* 64: 105-112.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1995. *Biometry*. 3rd ed. Freeman, New York.

Takebayashi, N., Wolf, D.E., Delph, L.F. 2006. Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a population of *Gilia achilleifolia*. *Heredity* 96:159-165.

Teillier, S., Marticorena, A., Niemeyer, H.M. 2011. *Flora Andina de Santiago, Guía para la identificación de las especies de las cuencas del Maipo y del Mapocho*. Universidad de Chile, Chile.

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

Webb, C.J., Lloyd D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. *New Zeal. J. Bot.* 24: 163-178.

Weinig, C. 2002. Phytochrome photoreceptors mediate plasticity to light quality in flowers of the Brassicaceae. *Am. J. Bot.* 89: 230-235.

Whitlock, M.C., Ingvarsson, P.K., Hatfield, T. 2000. Local drift load and the heterosis of interconnected populations. *Heredity* 84: 452-457.

Winn, A.A, Elle, E., Kalisz, S., Cheptou, P.O., Eckert, C.G., Goodwillie, C., Johnston, M.O., Moeller, D.A., Ree, R.H., Sargent, R.D., Vallejo-Marín, M. 2011. Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution* 65: 3339-3359.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.