

UCH-FC
DOC-EBE
N° 298
C.1



Papel de rasgos reproductivos y vegetativos
en el éxito de la polinización y tasa de
fecundación cruzada en *Alstroemeria pallida*
Graham en Los Andes de Chile Central

Tesis

Entregada A La
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Ecología Y Biología
Evolutiva

Facultad de Ciencias

Por

Paulette Ivonne Naulin Gysling

Octubre, 2012

Directora de Tesis
Doctora: Mary Kalin Arroyo

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

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

Paulette Ivonne Naulin Gysling

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 03 de Febrero de 2012.

Directora de Tesis:

Dra. Mary Kalin Arroyo

Mary Kalin Arroyo

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramiro Bustamante

Ramiro Bustamante

Dr. Rodrigo Medel

Rodrigo Medel

Dr. Javier Figueroa

Javier Figueroa





"¿Quieres decir que las especies son atractores en un espacio de parámetros morfogenéticos?"

Lewin a Goodwin

Biografía

Desde temprana edad me sentí interesada por el mundo vegetal, probablemente por el cariño que mostraron mis abuelas y abuelos hacia la naturaleza. Junto a mi familia realizábamos frecuentes salidas a terreno y camping, las cuales consolidaron mi interés, primero por la naturaleza y luego por las plantas. Con el tiempo decidí que este interés y vocación debía formalizarse ingresando a la universidad.



A lo largo de mis estudios superiores tuve varios maestros, recuerdo muy especialmente a Adelina Manriquez que me mostró el mundo de la microhistología y la docencia universitaria, posteriormente Rodolfo Gajardo, quien me ilustró sobre flora y vegetación, mientras trabajé durante tres años en el Herbario EIF. En la actualidad soy Ingeniero Forestal de la Universidad de Chile, donde he desarrollado actividades académicas en el área Botánica, en especial en la morfoanatomía vegetal desde 1996, en un principio como ayudante de Botánica, posteriormente como académica. Además, he sido coordinadora del Laboratorio de Biología de Plantas de la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza por 7 años.

Actualmente, tengo una hija de 14 años, que me ha secundado en todas las actividades, especialmente en las de campo. Soy académica del Departamento de Silvicultura y Conservación de la Naturaleza en la Universidad de Chile, participando en las asignaturas de Botánica General, práctica estival de Dendrología y Ecología Forestal, Componentes bióticos y abióticos del ecosistema, y Crecimiento y desarrollo de árboles.

Mi interés en el programa de Doctorado en Ciencias, Mención Ecología y Biología Evolutiva (EBE), tiene su base en la necesidad de desarrollar mi formación académica, en especial en el ámbito de la biología de plantas vasculares, con énfasis en aspectos evolutivos de sus caracteres y en cómo éstos han establecido relaciones con diversas condiciones ambientales. El programa EBE es fuerte en investigación, lo que a mi parecer ha aportado a mejorar mi capacidad de desarrollar y comunicar la investigación científica.



Agradecimientos

Agradezco a todos los que de algún modo hicieron posible esta investigación:

A Natalia y Abraham por ser el sustento para emprender la tarea de realizar un Doctorado y por tener la paciencia de acompañarme en este desafío.

Muy especialmente al "Team A" tanto a sus miembros núcleo: Cristina Latorre, Juan Araya, Abraham Albornoz y Natalia Paredes, como a sus miembros satélite: Viviana Gysling, Pamela Naulin, Don Juan, Cristian Rodríguez, entre otros; por su invaluable ayuda y asistencia en terreno, laboratorio y manejo de datos. En muchas jornadas de montaña durante casi tres años logramos obtener los datos necesarios para realizar lo que se expone en este documento. Además, agradezco al comité editor, Ramón González, Abraham Albornoz, Rosita Scherson, Sergio Estay, Janina Gysling y Gabriel Salinas, por sus comentarios, sugerencias y consejos.

A Spencer Barrett por recibirme en su laboratorio en la Universidad de Toronto, Canadá donde se realizó el análisis de aloenzimas. Además su buena disposición para discutir, y por sus sugerencias y recomendaciones. También a Bill por su asistencia en el laboratorio.

A CONICYT por la beca de Doctorado, la beca pasantía al extranjero por gestión propia y la beca de asistencia a eventos en el extranjero. También agradezco al IEB por haber financiado mi primer semestre del Doctorado.

A mi tutora Mary Kalin, por mostrarme el mundo de la ciencia. A las compañeras del laboratorio: Paulina Chacón, Carolina Henríquez, Paola Jara y Daniela Domínguez por sus consejos y asesoría dentro de la Facultad y el laboratorio, sin los cuales no habría sobrevivido al programa. A Don Juan y Romina por su aporte humano al laboratorio. A mis compañeros de cursos que enriquecieron mi mundo con diversos comentarios y conocimiento encontrando en ellos siempre una buena disposición para la discusión de temas doctos y mundanos.

Me siento sinceramente muy agradecida por la ayuda y compañía que todos me dieron, si la cual habría sido imposible realizar esta tesis. A todos ellos muchas gracias.



TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 IMPORTANCIA DE LA FECUNDACIÓN CRUZADA EN LAS PLANTAS.....	1
1.2 ECOSISTEMAS ALPINOS Y SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN.....	3
1.3 DISPONIBILIDAD DEL SERVICIO DE POLINIZACIÓN EN EL GRADIENTE ALTITUDINAL ..	7
1.4 MECANISMOS QUE PROMUEVEN LA FECUNDACIÓN CRUZADA EN PLANTAS HERMAFRODITAS	9
1.5 RASGOS QUE PROMUEVEN LA FECUNDACIÓN CRUZADA EN GRADIENTES AMBIENTALES	11
1.6 RASGOS QUE PROMUEVEN LA FECUNDACIÓN CRUZADA	12
1.6.1 <i>Tamaño de las plantas y altura a la que se encuentran las inflorescencias</i>	12
1.6.2 <i>Morfología y longevidad floral.....</i>	13
1.6.3 <i>Asignación diferencial en estructuras reproductivas.....</i>	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. HIPÓTESIS.....	23
5. ESPECIE Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SITIO DE ESTUDIO	24
6. VARIACIÓN DE RASGOS VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS EN <i>Alstroemeria pallida</i> Graham EN EL GRADIENTE ALTITUDINAL.....	28
6.1 SITIOS DE MUESTREO.....	28
6.2 MÉTODO	29
6.2.1 <i>Muestreo de rasgos vegetativos y reproductivos.....</i>	29
6.2.2 <i>Análisis de las variables morfométricas y ecológicas a nivel de ramet</i>	33
6.2.3 <i>Asignación en estructuras reproductivas.....</i>	35
6.3 RESULTADOS.....	36
6.3.1 <i>Patrones de distribución de las variables morfométricas</i>	36
6.3.2 <i>Patrones de distribución de las variables ecológicas.....</i>	41



6.3.3	<i>Relaciones de las variables morfométricas y ecológicas a nivel de ramet..</i>	44
6.3.4	<i>Distribución de biomasa en el gradiente altitudinal.....</i>	49
6.3.5	<i>Asignación de biomasa en el gradiente altitudinal.....</i>	53
6.4	DISCUSIÓN.....	54
6.4.1	<i>Rasgos morfométricos y variables ecológicas.....</i>	54
6.4.2	<i>Distribución y asignación de biomasa.....</i>	58
7.	ROL DEL TAMAÑO DEL RAMET Y DEL DESPLIEGUE FLORAL EN LA TASA DE VISITA DE <i>Alstroemeria pallida</i> EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL.....	60
7.1	SITIOS DE MUESTREO.....	60
7.2	MÉTODO.....	61
7.2.1	<i>Puntos de observación.....</i>	61
7.2.2	<i>Medición de rasgos morfométricos.....</i>	62
7.2.3	<i>Receptividad del estigma.....</i>	63
7.2.4	<i>Visitas de polinizadores.....</i>	64
7.2.5	<i>Análisis estadístico.....</i>	65
7.3	RESULTADOS.....	69
7.3.1	<i>Verificación del supuesto de variación en el servicio de polinización entre dos pisos altitudinales en <i>Alstroemeria pallida</i>.....</i>	69
7.3.2	<i>Tasas de visita de polinizadores, variables morfológicas y ecológicas asociadas.....</i>	72
7.3.3	<i>Relaciones entre la tasa de visita de polinizadores y los rasgos de ramets mediante SEM.....</i>	78
7.4	DISCUSIÓN.....	82
8.	ROL DEL TAMAÑO DEL RAMET Y EL TAMAÑO DEL DESPLIEGUE FLORAL EN LAS TASAS DE FECUNDACIÓN CRUZADA POR RAMET EN <i>Alstroemeria pallida</i>.....	85
8.1	SITIOS DE MUESTREO.....	85
8.2	MÉTODO.....	86
8.2.1	<i>Sistemas de apareamiento mixto y colecta de muestras.....</i>	86
8.2.2	<i>Análisis morfométrico y muestreo de semillas.....</i>	87
8.2.3	<i>Alloenzimas.....</i>	88

8.2.4	<i>Interrelación de las variables morfométricas y la tasa individual de fecundación cruzada</i>	90
8.3	RESULTADOS	91
8.3.1	<i>Patrones de la tasa de fecundación cruzada en el gradiente altitudinal</i>	91
8.3.2	<i>Rasgos reproductivos y vegetativos del ramet</i>	92
8.3.3	<i>Relaciones a nivel de individuo de la tasa de fecundación cruzada y los rasgos morfométricos</i>	97
8.4	DISCUSIÓN	101
9.	CONCLUSIONES GENERALES	104
10.	BIBLIOGRAFÍA	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Triángulo de preguntas.....	20
Figura 2: Distribución de <i>Alstroemeria pallida</i> Gram..	24
Figura 3: Cambio morfológico de <i>Alstroemeria pallida</i>	26
Figura 4: Mapa general de la distribución de los sitios de muestreo.....	27
Figura 5: Métodos utilizados para medir las variables morfométricas..	32
Figura 6: Altura del ramet promedio (cm).....	37
Figura 7: Tamaño del despliegue floral promedio (número de flores).....	38
Figura 8: Área flor promedio de cada ramet (cm ²).....	39
Figura 9: Área total promedio de la umbella (cm ²).....	40
Figura 10: Niveles de composición promedio de la umbella.....	41
Figura 11: Altura promedio de la vegetación acompañante en 1 m ²	42
Figura 12: Densidad promedio de ramet/m ²	42
Figura 13: Cobertura promedio de la vegetación acompañante en 1 m ²	43
Figura 14: Diagrama de ecuaciones estructurales de morfometría.....	48
Figura 15: Peso seco promedio de hojas (g).....	50
Figura 16: Peso seco promedio de tallo (g).....	50
Figura 17: Peso seco promedio de estructuras reproductivas (g).	51
Figura 18: Biomasa relativa por ramet en tres poblaciones.....	54
Figura 19: Puntos de observación de polinizadores.....	61
Figura 20: Fenología de la protandria en <i>Alstroemeria pallida</i>	63
Figura 21: Díptero con actividad en las anteras de <i>A. pallida</i>	64
Figura 22: Curvas de acumulación de especies, método de rarefacción.....	70
Figura 23: Relación entre la tasa de visita por flor y el tamaño del ramet (m).....	74
Figura 24: Relación entre la tasa de visita por flor y el número de flores por ramet.	75
Figura 25: Diagrama de ecuaciones estructurales de tasa de visita de polinizadores..	81
Figura 26: Tasa de fecundación cruzada (tm).....	92
Figura 27: Diagrama de ecuaciones estructurales de tasa de fecundación cruzada..	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sitios de muestreo para la variación de los rasgos vegetativos y reproductivos de <i>A. pallida</i>	28
Tabla 2: MANOVA variables morfométricas y ecológicas	44
Tabla 3: Matriz de correlaciones entre las variables morfométricas.....	46
Tabla 4: Efectos directos e indirectos de las variables morfométricas en SEM.....	49
Tabla 5: Distribución de la biomasa por estructura vegetal de <i>Alstroemeria pallida</i>	52
Tabla 6: Sitios de muestreo de la tasa de visita de polinizadores de <i>A. pallida</i>	60
Tabla 7: Relaciones entre la tasa de visita de polinizadores, la altura del ramet y el número de flores.....	67
Tabla 8: ANOVA tasa de visita de polinizadores y variables asociadas en <i>A. pallida</i> ...	73
Tabla 9: Matriz de correlaciones entre tasa de visita de polinizadores y las variables morfométricas de los ramets.....	77
Tabla 10: Modelos ajustados entre la tasa de visita de polinizadores, la altura del ramet y el número de flores	79
Tabla 11: Efectos directos e indirectos de la altitud sobre las variables: tamaño del ramet, número de flores y tasa de visita de polinizadores.....	81
Tabla 12: Sitios de muestreo de la tasa de fecundación cruzada de <i>A. pallida</i>	85
Tabla 13: Tasa de fecundación cruzada multialélica (tm) y rasgos del ramet.	95
Tabla 14: ANOVA anidado de la tasa de fecundación cruzada multialélica (tm) y los rasgos morfométricos de <i>A. pallida</i>	96
Tabla 15: Matriz de correlaciones entre la tasa de fecundación cruzada (tm) y las variables morfométricas de los ramets	98
Tabla 16: Efectos directos e indirectos de la altitud sobre la tasa de fecundación cruzada y las variables morfométricas.....	100

RESUMEN

Los ambientes de alta montaña o alpinos se caracterizan por presentar condiciones climáticas estresantes para la sobrevivencia y reproducción de las plantas, como bajas temperaturas, fuertes vientos, escasez de nutrientes y corta duración de la estación de crecimiento. Además, se ha reportado disminución en la disponibilidad de polinizadores y cambio en el ensamble de éstos con la altitud.

Las plantas de montaña se han adaptado a las variables ambientales extremas, por ejemplo, reduciendo el tamaño de sus estructuras vegetativas con el aumento de la altitud. En sitios donde las condiciones ecológicas y ambientales son extremas, con estación de crecimiento reducida y disminución del servicio de polinización comunitario con la altitud, se ha propuesto la hipótesis de aseguramiento reproductivo vía autogamia, donde la formación de semillas sería por autofecundación, lo cual implicaría una disminución en las tasas de fecundación cruzada en las poblaciones de mayor altitud.

Sin embargo, en alta montaña existen numerosas taxa con flores vistosas, incluso con sistemas reproductivos con alto grado de incompatibilidad, lo que llevaría a preguntar ¿Cuáles son los mecanismos desarrollados por las plantas

que les permitirían compensar la disminución en el servicio de polinización en las zonas alpinas?

Este estudio utilizó la especie *Alstroemeria pallida* como modelo para determinar si existen diferencias en los rasgos reproductivos y/o vegetativos en el gradiente altitudinal, además de verificar si estas diferencias contribuyen al aumento en la probabilidad de polinización, y por ende a diferencias en la tasas de fecundación cruzada. Los estudios morfométricos y fenológicos fueron realizados en seis poblaciones entre Guardia Vieja (32°53'53,2"S y 70°15'28,5"W) y El Embalse del Yeso (33°42'1"S y 70°7'5,1"W), Cordillera de Los Andes de Chile Central. Los estudios de tasa de visita fueron realizados en un gradiente ambiental y los de tasa de fecundación cruzada en cuatro poblaciones dentro de la distribución de la especie.

Se observó variaciones significativas en variables morfométricas como altura de ramet, atractividad de la flor y la inflorescencia y niveles de composición de la umbella tanto en el gradiente altitudinal como en las poblaciones. Sin embargo, estos dos niveles en conjunto explican menos del 50% de la variabilidad morfológica en *A. pallida*.

La receptividad del estigma aumentó con la altitud, sin embargo, no es suficiente para equiparar la probabilidad de polinización entre los pisos bajo y sobre el límite arbóreo. El tamaño del despliegue floral no presentó un patrón de

variación significativo ni entre los pisos ni entre poblaciones. No obstante, al analizarlo a nivel del ramet, si se observó una relación positiva con el área de la umbella. El tamaño del despliegue floral se relacionó positivamente con la tasa de fecundación cruzada, pero a nivel de ramet no se comprobó asociación con la tasa de visita de polinizadores.

La variación en el tamaño del ramet se relacionó fuertemente con la altura de la cobertura que lo rodea, lo cual podría indicar un efecto de sitio más que un efecto compensatorio para la disminución en el servicio de polinización.

En general se observa que ramet más grandes producen más flores y frutos, los cuales presentan una alta tasa de fecundación cruzada y, por lo tanto, mayor éxito reproductivo, a pesar de la disminución del servicio de polinización con la altitud. En relación a la hipótesis de aumento de la probabilidad de la polinización (APP), si bien se encontró que el servicio de polinización disminuye en el gradiente altitudinal, este es suficiente para la formación de frutos por fecundación cruzada y que la variación en los rasgos morfológicos en el gradiente altitudinal estaría determinada por otras variables ambientales.

SUMMARY

Mountain or alpine environments are characterized by stressful climatic conditions for plant survival and reproduction, such as low temperatures, strong winds, nutrient shortage and short growing season. In addition, a decrease in the availability of pollinators and changes in their assembly has been reported with increased altitude.

Mountain plants have adapted to extreme environmental variables, for example by reducing the size of their vegetative structures with increased altitude. In areas of extreme ecological and environmental conditions, with a reduced growing season and decreased pollinator service, "the autogamous reproductive insurance hypothesis" (ARIH) via autogamy has been proposed, in which seed set would be via self fertilization and would imply a decrease in the rates of cross fertilization in populations at higher altitudes.

However, in high mountains there are numerous taxa with showy flowers, even with highly self-incompatible reproductive systems, which would lead us to think, which are the mechanisms developed by plants that allow them to compensate for the decrease in the pollination service in alpine zones?

This study used the species *Alstroemeria pallida* as a model to determine whether there are differences in reproductive and/or vegetative traits on an

altitudinal gradient, in addition to verifying if these differences contribute to the increase in the probability of pollination, and therefore in differences in the rates of cross-fertilization. Morphometric and phenological studies were performed in six populations between Guardia Vieja (32°53'53,2"S and 70°15'28,5"W) and El Embalse del Yeso (33°42'1"S and 70°7'5,1"W), Cordillera de los Andes, Central Chile. Studies of visitation rates were performed in an environmental gradient and the studies of cross-fertilization were carried out in four populations within the species distribution.

Significant variations were observed in morphometric variables such as the altitude of ramets, flower and inflorescence attractiveness and levels of composition of the umbella, both at the altitudinal gradient as well as in populations. However, both these levels together explain less than 50% of the morphological variability in *A. pallida*.

Receptivity of the stigma increased with altitude, however this is not enough to equal the probability of pollination between the lower and the above-tree-level stories. Size of the floral display did not show a significant variation pattern, neither between altitudes or among populations. However, when analyzed at the level of ramet, a positive relationship was observed between size of the floral display and umbel area. The size of the floral display was positively related with the rate of crossed fertilization, but at the level of ramet, an association with the rate of pollinator visit was not observed.

Variation in ramet size was strongly related to the height of the cover vegetation that surrounds it, which could indicate a site effect more than a compensatory effect for the decrease in pollinator service.

In general, it was observed that larger ramets produce more flowers and fruits, which show a high cross fertilization rate and therefore higher reproductive success, despite the decrease in pollination service with altitude. With respect to the "increased pollination probability hypothesis" (IPPH), even though it was seen that pollination service decreases with the altitudinal gradient, this is still enough for the formation of fruits by cross fertilization, therefore variation in morphological traits in an altitudinal gradient would be determined by other environmental variables.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Importancia de la fecundación cruzada en las plantas

Las plantas son organismos sésiles, por tanto, dependen de la dispersión de los gametos masculinos (polen) para la fecundación. La mayoría de las angiospermas presentan flores hermafroditas, las cuales requieren de algún vector para el transporte del polen (Barrett y Harder, 1996; Proctor *et al.*, 1996; Barrett, 1998), los que pueden ser tanto abióticos (viento, agua) como bióticos (insectos, animales), siendo estos últimos sujetos de amplios estudios evolutivos de la interacción planta-polinizador desde la época de Darwin (Harder y Johnson, 2009).

Por otra parte, las plantas poseen una amplia gama de sistemas de reproducción desde la autogamia, apareamiento dentro de la misma flor o entre flores de un mismo organismo, a la xenogamia, apareamiento entre individuos diferentes (Barrett, 1998; Proctor *et al.*, 1996).

La evolución de la autofecundación ha sido estudiada por sus efectos en la adecuación biológica, como depresión por consanguinidad (Charlesworth y Charlesworth, 1997) o la heterosis o uniformismo de la descendencia, que podría tener costos evolutivos frente a condiciones ambientales fluctuantes. Sin

embargo, la autogamia podría ser importante en sistemas con fluctuaciones anuales de las poblaciones de polinizadores (Varey *et al.*, 1973).

La ventaja de la autopolinización sería entonces la producción de semillas sin la intervención de agentes externos a la planta (Proctor *et al.*, 1996). Totland y Schulte-Herbrüggen (2003) proponen que el aseguramiento reproductivo vía autogamia podría verificarse en ambientes con tasas de visita variables. La condición impredecible de los polinizadores podría seleccionar una combinación de sistemas mixtos de autopolinización y polinización cruzada (Brown y Allard, 1970; Barrett y Harder, 1996).

El aseguramiento reproductivo, a través de autofecundación aumenta la producción de semillas, pero disminuye su viabilidad y puede provocar depresión por endogamia (Herlihy y Eckert, 2002). Considerando la producción de semillas como un componente de la adecuación biológica, en *Ranunculus acris* se observa una baja en el número de semillas lo cual podría ser explicado por una baja intensidad de polinización y condiciones climáticas severas (Totland, 1994).

Por su parte, la fecundación cruzada es ventajosa ya que la combinación de genes aumenta la variabilidad de la población, lo cual podría permitir la adaptación a ambientes nuevos y/o cambiantes. Además, previene la

propagación de genes deletéreos dentro de las poblaciones (Proctor *et al.*, 1996).

Barrett y Harder (1996) proponen que los diferentes rasgos de las plantas afectan el comportamiento de los polinizadores, dado que la dispersión del polen por distintos agentes generaría oportunidades para la evolución de diferentes adaptaciones florales. Se espera que una flor más "atractiva" aumente su frecuencia de visitas, recibiendo y exportando mayor cantidad de polen (Klinkhamer *et al.*, 1989; Medel *et al.*, 2003). La situación ideal para la xenogamia sería que infinitos polinizadores visitaran solo una flor. Sin embargo, en situaciones intermedias, hay un dilema pues al incrementar el atractivo aumenta el polen removido, pero se reduce la eficiencia de la exportación de éste (Klinkhamer y De Jong, 1993; Klinkhamer *et al.*, 1994).

1.2 Ecosistemas alpinos y sistemas de reproducción

Los ambientes de alta montaña o alpinos se caracterizan por presentar condiciones climáticas estresantes para la sobrevivencia y reproducción de las plantas (Billings y Mooney, 1968; Billings, 1974; Bliss, 1971, 1985; Körner, 2003). Las bajas temperaturas del aire y del suelo, los fuertes vientos, la corta duración de la estación de crecimiento y la escasez de nutrientes son las principales características de estos hábitats (Bliss, 1985; Körner, 2003).

A comienzos de la década de los 70, algunos autores postularon que producto de la rigurosidad climática existente en los ambientes alpinos, la reproducción vegetativa y la producción de semillas por apomixis, es decir producción de un embrión sin fecundación previa (Font Quer, 1993), serían más importantes que la reproducción sexual (Bliss, 1971; Billings, 1974). Sin embargo, numerosos estudios han documentado la presencia de grandes cantidades de semillas viables en el suelo, los denominados bancos de semillas, en muchas zonas alpinas (e.g., ver revisión de McGraw y Vavrek, 1989 y Cavieres, 1999), mostrando la importancia de la reproducción sexual en estos ambientes.

Por otra parte, se ha documentado disminución en la disponibilidad de polinizadores a mayores altitudes, lo que haría aún más desfavorables las condiciones respecto a las plantas que habitan en sectores más bajos (Körner, 2003). La disminución se observa tanto en número como en la diversidad de los ensambles a medida que incrementa la altitud (Arroyo *et al.*, 1982, 1985; Arroyo y Squeo, 1990; Totland, 1994; Bergman *et al.* 1996; Totland, 1997), afectando el promedio comunitario de la tasa de visita, el cual puede disminuir en alrededor de 50% entre la zona subalpina superior y la zona alpina (Arroyo *et al.*, 1985; Arroyo y Squeo, 1990).

Dadas estas condiciones ecológicas y ambientales extremas, se ha propuesto la hipótesis de aseguramiento reproductivo vía propágulos vegetativos y/o

autogamia (Hagerup, 1951; Mosquin, 1966), donde la formación de semillas en ambientes con estas características, sería por autofecundación, a pesar de que ésta conllevaría problemas en el desempeño del reclutamiento, tales como la depresión por endogamia (Eckert y Barrett, 1994, Herlihy y Eckert, 2002) y posteriores cuellos de botella y/o la susceptibilidad al ataque de patógenos (Silvertown y Charlesworth, 2001). En este escenario, se esperaría que la diversidad genética disminuyera con la altitud.

Sin embargo, Arroyo y Squeo (1990) estudiando los sistemas reproductivos en diferentes elevaciones en la Patagonia mostraron, para la parte alta del piso andino, que un gran número de especies son genéticamente incompatibles o tienen algún tipo de dimorfismo sexual, a pesar de tratarse de uno de los hábitats más restrictivos para la actividad de polinizadores. Además, muchas especies de la flora alto andina presentan flores vistosas, despliegues florales más grandes, asignan relativamente más biomasa a estructuras reproductivas en zonas de mayor altitud, o mantienen las flores viables por períodos más largos que sus pares en zonas más bajas (e.g. Arroyo *et al.*, 1982; Arroyo *et al.*, 2007; Körner, 2003; Fabbro y Körner, 2004). Esto llevaría a pensar que estas plantas adaptadas a la interacción con polinizadores presentan algún mecanismo que favorezca la reproducción sexual (Marco y Arroyo, 1998) y les permita sobrevivir en esos ambientes a pesar de la disminución de los polinizadores (Arroyo *et al.*, 1985), sin un detrimento de su variabilidad genética,

hipótesis conocida como Aumento de la Probabilidad de Polinización (APP) (Arroyo *et al.*, 2006). Los rasgos que varíen en el gradiente altitudinal podrían compensar la disminución en el servicio de polinización.

En relación a la hipótesis APP, existen tres posibles escenarios para el piso alpino:

- i) El servicio de polinización a pesar de disminuir en el gradiente altitudinal es suficiente para la formación de frutos por fecundación cruzada.
- ii) Existen rasgos morfológicos que varían en el gradiente altitudinal y estos son suficientes para compensar el déficit en el servicio de polinización.
- iii) Existen rasgos morfológicos que varían en el gradiente altitudinal y estos son insuficientes para compensar el déficit en el servicio de polinización.

Por otra parte, se ha discutido recientemente la importancia de la limitación de polen en la producción de semillas y en la evolución de rasgos florales (García-Camacho y Totland, 2009; Harder y Aizen, 2010). Los diferentes factores que influyen en la limitación de polen como la disponibilidad de éste, baja sobrevivencia del tubo polínico y limitaciones en la tasa de visita, entre otros, pueden contribuir a la variación del éxito reproductivo femenino (Harder y Aizen, 2010). Por ejemplo, en ambientes con restricción de vectores podría encontrarse mayor endogamia debido a la limitación del transporte de polen

(Moeller y Geber, 2005). Sin embargo, no se ha encontrado una relación significativa entre la intensidad de la endogamia y la polinización cruzada o por la evolución de la autogamia bajo limitación de polen (Harder y Aizen, 2010). Por otro lado, en ambientes montañosos, se ha realizado experimentos de suplementación de polen en plantas alpinas, cuyos resultados no siempre muestran altos niveles de limitación de polen, incluso, no se observa diferencias significativas entre las especies de zonas alpinas y de tierras bajas. Más aun, tanto en las especies alpinas autoincompatibles como en las autocompatibles, se encuentra niveles similares de limitación de polen (García-Camacho y Totland, 2009). Dada la heterogeneidad de casos, Harder y Aizen (2010), sugieren que las causas de la limitación de polen son múltiples, tanto en ambientes naturales como alterados, por tanto, las soluciones posibles son diversas y dependen del contexto, lo que puede contribuir a la extensa variedad de características reproductivas en angiospermas.

1.3 Disponibilidad del servicio de polinización en el gradiente altitudinal

Körner (2007) propone el gradiente altitudinal como un experimento natural, el cual sería un buen modelo para probar diferentes respuestas de los organismos que habitan en gradientes ambientales permitiendo explorar adaptaciones evolutivas en distribuciones espacialmente acotadas.

Debido a que los ambientes alpinos presentan temperaturas bajas tanto a nivel del suelo como del aire (Körner, 2003), con una estación de crecimiento acotada (Bliss, 1971), la abundancia, diversidad y actividad de los polinizadores sobre el límite arbóreo se verían afectadas (Arroyo *et al.*, 1982; Arroyo *et al.*, 1985; Arroyo y Squeo, 1990; Totland, 1994; Totland 1997; Bingham y Orthner, 1998).

Bingham y Orthner (1998), en poblaciones de *Campanula rotundifolia* que habitan tanto en zonas alpinas como en el pie de monte de Las Montañas Rocallosas, han mostrado que el servicio de polinización es realizado por una comunidad más diversa en zonas bajas que en zonas altas de la montaña. Además, la tasa de visita *per se* es significativamente mayor en zonas de baja altitud respecto de las zonas alpinas.

Si bien la abundancia y diversidad de muchas especies de polinizadores decrece con la altitud, esto no se cumple en todos los taxa. Por ejemplo, la abundancia de dípteros se mantiene en el gradiente altitudinal (Kearns, 1992) y se postula que podrían compensar su menor eficiencia en la polinización con mayores tasas de visita (Kearns, 1992).

1.4 Mecanismos que promueven la fecundación cruzada en plantas hermafroditas

Muchas plantas que son capaces de autofertilizarse, presentan rasgos que favorecen la atracción de polinizadores, los cuales dispersan polen sobre los estigmas (Proctor *et al.*, 1996). Dada la importancia de la fecundación cruzada se podría pensar que siempre sería preferible la xenogamia en vez de la autogamia, sin embargo, esto no es así, ya que incluso en plantas autoincompatibles existe un porcentaje de autopolinización (Proctor *et al.*, 1996).

Uno de los mecanismos que evitan la autopolinización es la dicogamia, separación temporal de la fase sexual masculina y femenina (Barrett y Harder, 1996; Barrett, 1998). La protoginia es la maduración de los carpelos y la receptividad del estigma antes de la maduración de los estambres. La protandria es la maduración de las estructuras masculinas antes de las femeninas, produciéndose una distancia temporal entre los dos sexos de la flor. La protandria es común entre las plantas polinizadas por insectos y es una característica considerada evolutivamente derivada (Proctor *et al.*, 1996).

Sin embargo, ni la dicogamia ni la separación espacial de los sexos dentro de una flor individual son garantía de que el polen de otra flor de la misma planta fecunde su óvulo (Proctor *et al.*, 1996). Este cruzamiento entre flores dentro de

un mismo individuo (geitonogamia) no es genéticamente diferente de la polinización de una flor por su propio polen (autogamia) (Barrett, 1998). La frecuencia de la geitonogamia depende de la atractividad del despliegue floral, el comportamiento del polinizador y el nivel de carga de polen (Proctor *et al.*, 1996) y podría significar un costo no adaptativo asociado con grandes despliegues florales (Barrett, 2002).

Además de los diversos sistemas de apareamiento, existen diferentes aspectos morfológicos y fenológicos, relacionados con el diseño y el despliegue floral que influyen en la cantidad y calidad del polen transportado durante el proceso de polinización (Barrett, 1998), lo cual podría favorecer la fecundación cruzada. Por ende, diversos factores ecológicos, como la variación interanual de los polinizadores, podrían afectar la presión de selección de rasgos florales, los cuales serían favorecidos en años de mayor disponibilidad de polinizadores teniendo también mayores tasas de fecundación cruzada. Sin embargo, en años de restricción de polinizadores los rasgos de morfología y despliegue floral no serían importantes aumentando la proporción de la autogamia en las poblaciones (Eckert *et al.*, 2009).

Por otra parte, la dinámica espacio-temporal de los polinizadores y la competencia intraespecífica por ellos, podría explicar la variación en la tasa de fecundación cruzada (Kameyama y Kudo, 2009). En poblaciones de plantas

autocompatibles la competencia por polinizadores aumenta la autofecundación y disminuye la cantidad y la calidad de las semillas (Bell *et al.*, 2005).

1.5 Rasgos que promueven la fecundación cruzada en gradientes ambientales

Condiciones desfavorables de temperatura y clima, en ambientes extremos, podrían predecir sistemas reproductivos autocompatibles, altos niveles de endogamia y flores pequeñas o poco vistosas (Hagerup, 1951; Mosquin, 1966). Por ejemplo, *Cerastium arvense* presenta en zonas bajas y desérticas plantas de menor tamaño y flores pequeñas. En cambio en zonas altas asociadas a bosques de *Nothofagus pumilio* los individuos son más altos y presentan flores más grandes. En jardín común encontraron que estas diferencias están genéticamente fijadas (Quiroga *et al.*, 2002). Tate y Simpson (2004) encontraron en *Tarasa*, que presenta poliploidías asociadas a ambientes de gran altura en Los Andes, una respuesta del sistema reproductivo desde la exenogamia hacia la autogamia, incluyendo cambios en el fenotipo reproductivo a nivel de flores y polen.

En *Ranunculus acris*, los factores ambientales interactúan con la disponibilidad de polen para determinar el éxito reproductivo de las plantas, lo cual interrumpe la disponibilidad de los polinizadores a través de la selección de rasgos florales

que se relacionan positivamente con el grado de limitación del polen. Esta relación varía en el gradiente altitudinal, donde la limitación de polen más fuerte y la existencia de la discriminación de los polinizadores en cuanto al tamaño de la flor es mayor en el piso altitudinal bajo que en el alto (Totland, 2001).

1.6 Rasgos que promueven la fecundación cruzada

1.6.1 Tamaño de las plantas y altura a la que se encuentra la inflorescencia

Diversos estudios han reportado diferencias en el tamaño de los organismos en gradientes ambientales. Por ejemplo, Olsson y Agren (2002) encontraron que el tamaño de *Lythrum salicaria*, una hierba perenne, se reduce al aumentar la latitud. Esto se ha relacionado con la evolución de esta planta a la variación de la duración de la estación de crecimiento, la cual varía en el gradiente latitudinal.

Rochow (1970) describió una reducción en el tamaño de las plantas al aumentar la altitud, y Jolls (1980) observó una disminución de la altura del pedicelo de la inflorescencia de *Sedum lanceolatum* con la altitud. Bauert (1996) encontró diferencias en el tamaño de las plantas de poblaciones alpinas a distintas altitudes incluso al cultivarlas en conjunto.

En la Cordillera de Los Andes, Cavieres (2000) mostró que en la planta perenne *Phacelia secunda*, la altura del pedicelo de la inflorescencia, y por tanto, la altura a la que se encuentran las flores disminuye en el gradiente altitudinal. Este cambio podría deberse a fenotipos óptimos para la polinización, manteniendo la fertilización cruzada, es decir, la reducción en la talla de la altura de las flores las expondría a una zona de mejor temperatura para el vuelo de los polinizadores (Abrol y Kapil, 1986), por lo tanto, una mejor tasa potencial de visitas (Cavieres, 1998; Cavieres, 2000).

1.6.2 Morfología y longevidad floral

La atractividad de las flores para los polinizadores ha sido relacionada positivamente con el tamaño de la flor y la inflorescencia (Bell, 1985, Conner y Rush, 1996; Medel *et al.*, 2003; Nattero *et al.*, 2010). Los polinizadores elegirían grandes despliegues florales porque serían una señal de mayor recompensa (Barrett, 1998, Medel *et al.*, 2003). Además, dado el pobre poder de resolución de los ojos compuestos, las flores polinizadas por insectos que son más grandes, son más visibles para los polinizadores (Chittka y Raine, 2006).

Se ha documentado que mayor número de flores y mayor tamaño del despliegue floral aumentarían las visitas de polinizadores en plantas alpinas presentes en Chile Central (Cavieres, 1998; Cavieres, 2000). El número y tamaño de las flores abiertas determinaría la atractividad individual, de cada

ramet, hacia los polinizadores. Suárez *et al.* (2009) encuentran una relación positiva entre el tamaño (área), el número de flores abiertas y el número de visita que se observa en *Alstroemeria exerens*, denotando que los polinizadores preferirían flores con grandes despliegues florales y corolas más grandes (cm²). Sin embargo, Thompson (2001) describe que la tasa de visita asociada a distintos rasgos florales varía entre los diferentes taxa de visitantes, señalando que las abejas preferirían mayores despliegues florales mientras que los lepidópteros preferirían flores de mayor tamaño.

La selección fenotípica en el tamaño de las flores en las plantas polinizadas por animales sólo puede ocurrir cuando el desempeño está limitado por las visitas de los polinizadores y cuando hay una relación entre el tamaño de la flor y la atracción de los polinizadores (Totland, 2001). Olsson y Agren (2002) en un estudio latitudinal encontraron mayor variación del tamaño de la flor entre poblaciones a una misma latitud, que al comparar entre latitudes, sin mostrar un patrón latitudinal de este rasgo reproductivo.

La tasa de fecundación cruzada es significativamente afectada por el tamaño del despliegue floral (Brunet y Sweet, 2006). La producción de semillas en *Viola cazoriensis*, y por tanto una parte de la adecuación biológica, depende significativamente de la morfología floral, tamaño del despliegue y el tamaño de la flor (Herrera, 1993). En el género *Euphrasia* se observó una variación en la

morfología floral asociada a diferentes tasas de endogamia, donde la endogamia está negativamente correlacionada con el tamaño de la flor (French *et al.*, 2005). Hegland y Totland (2005) concluyen que rasgos continuos como el tamaño de la flor y/o la densidad serían más importantes para la frecuencia en la tasa de visita que los síndromes de polinización *per se*.

La variación en el tamaño del despliegue floral como también la presencia de polinizadores específicos, pueden afectar la tasa de fecundación cruzada (t_m), existiendo una relación positiva entre estas variables, sin embargo, en poblaciones de *Aquilegia coerulea*, t_m fluctúa entre 0,41 y 0,93 mostrando una variación tanto geográfica como interanual (Brunet y Sweet, 2006).

Por otro lado, la longevidad floral varía en ambientes fluctuantes, por ejemplo, en días más fríos la longevidad floral aumenta. Al extenderse la longevidad, las flores incrementarían la probabilidad de polinización cruzada dado el mayor tiempo de exposición a los polinizadores (Primack, 1985). Mientras la disponibilidad de polinizadores decrece con la altitud, la longevidad floral aumenta en algunas especies (Arroyo *et al.*, 1981) como también la proporción de especies xenógamas, que requieren polinización cruzada (Arroyo y Squeo, 1990). Entonces, a igual tamaño del despliegue y/o la flor, la longevidad floral podría compensar la disminución del servicio de polinización en el gradiente altitudinal (Biningham y Orthner, 1998). Por otra parte, el desarrollo y la

longevidad de las flores en *Alstroemeria*, están asociados a bajas concentraciones, endógenas o exógenas, de etileno (Wagstaff *et al.*, 2005). A su vez, la producción de etileno está relacionada a la exposición a estrés hídrico y a altas temperaturas (Taiz y Zeiger, 2006).

Sin embargo, no siempre la variación de estos rasgos está asociada a un gradiente ambiental. Worley *et al.* (2000) describe a nivel intraespecífico, que el tamaño del despliegue (número de flores) y el tamaño de las flores (área en cm^2) dependen de la disponibilidad de recursos para la planta sin encontrar un compromiso entre estos rasgos, es decir, existe una correlación positiva de estos donde plantas con mayor número de flores también presentaría flores más grandes. Jolls (1980) menciona que en distintas poblaciones de *Sedum lanceolatum*, el número de flores por inflorescencia disminuye con el incremento altitudinal. En *Chaetanthera euphrasioides*, que habita los altos Andes, la variación interanual del tamaño del capítulo en la población puede ser más grande que entre poblaciones, existiendo plasticidad en el rasgo y un fuerte componente ambiental (Arroyo *et al.*, 2006).

1.6.3 Asignación diferencial en estructuras reproductivas

Fabbro y Körner (2004) en Los Alpes, en un estudio a nivel comunitario, evidenciaron una relación inversa entre la mayor asignación de biomasa de estructuras reproductivas y la disminución en la asignación en estructuras

vegetativas al aumentar la altitud. Ellos proponen que esto podría ser una respuesta a la disminución de polinizadores a mayor altitud.

Existe un compromiso entre el tamaño de la planta y su asignación reproductiva. Sin embargo, en un gradiente de nutrientes el efecto se atenúa con el aumento de la disponibilidad de éstos (Sugiyama y Bazzaz, 1998).

A pesar de existir varios estudios a nivel poblacional de la polinización en ambientes de alta montaña, no hay suficiente información acerca de las tasas de fecundación cruzada o autofecundación a nivel de los individuos, y por ende los mecanismos involucrados en la asignación de estructuras reproductivas son aún poco claros (Waser y Ollerton, 2006). Por otro lado, Herrera (1993) muestra que la selección del fenotipo floral podría ser menos importante evolutivamente que otros factores ecológicos que afectarían la adecuación biológica en las plantas, aclarando que la relevancia potencial de la selección de los rasgos reproductivos en plantas requiere de una evaluación cuantitativa en un escenario natural.

Con respecto a esto último se ha documentado los efectos de las diversas condiciones ambientales que afectan a la adecuación biológica en gradientes altitudinales de zonas mediterráneas. Cabrera (2002) menciona que en altitudes bajas, el estrés hídrico sería determinante para las plantas a diferencia de las

zonas intermedias, en el límite arbóreo o sobre él, donde la temperatura sería el factor ambiental preponderante, pudiendo interactuar con la disponibilidad de agua. Es así como plantas sometidas a sequía, temperaturas extremas y exceso de radiación favorecerían procesos de fotoinhibición, lo cual alteraría la capacidad fotosintética de las especies alpinas y por tanto su crecimiento y acumulación de biomasa. Sin embargo, en *Geum montanum*, se ha observado varios mecanismos de protección del daño solar evitando el fotoestrés asociado a la temporada de crecimiento en zonas de montaña en condiciones de bajas temperaturas y sequía (Manuel *et al.*, 1999). Todo esto denota la importancia de la adaptación de las formas de vida a condiciones alpinas (Manuel *et al.*, 1999) y/o a las características del micrositio (Germino y Smith, 2000), las cuales modelan su desempeño en estos ambientes (Körner, 2003).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dados los antecedentes anteriormente expuestos cabe preguntarse ¿Cuáles son los rasgos morfológicos que les permitirían a las plantas mantener su nivel de fecundación cruzada en las zonas alpinas con restricción en las visitas de polinizadores? A su vez, interesa investigar si los individuos que poseen rasgos que actúen como compensatorios, reciben más visitas promedio, y por último, las plantas que presenten rasgos compensatorios y por lo tanto, reciban más visitas de polinizadores ¿Tendrán una tasa de fecundación cruzada mayor?

Estas tres preguntas configuran un triángulo de interrogantes (Figura 1) que nos permiten ahondar sobre los mecanismos que estarían detrás del fenómeno de compensación de la disminución en la oferta de servicio de polinización en un gradiente altitudinal.

Alstroemeria pallida Graham (*Alstroemeriaceae*), la especie focal del estudio, es una planta geófito, presenta vistosas flores de color rosado pálido (Figura 3), es protándrica y parcialmente autocompatible, $ISI=0,413$ (Arroyo y Uslar, 1993). *Alstroemeria pallida* habita en zonas restringidas de Los Andes de Chile Central, se destaca la amplitud de su distribución altitudinal, entre los 1.500 a 2.800 msnm (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003), lo cual permite evaluar las respuestas a nivel de individuo en busca de los mecanismos que podrían operar

detrás de respuestas fenotípicas asociadas con la atracción de visitantes y/o el éxito reproductivo (Rougie, 2005).

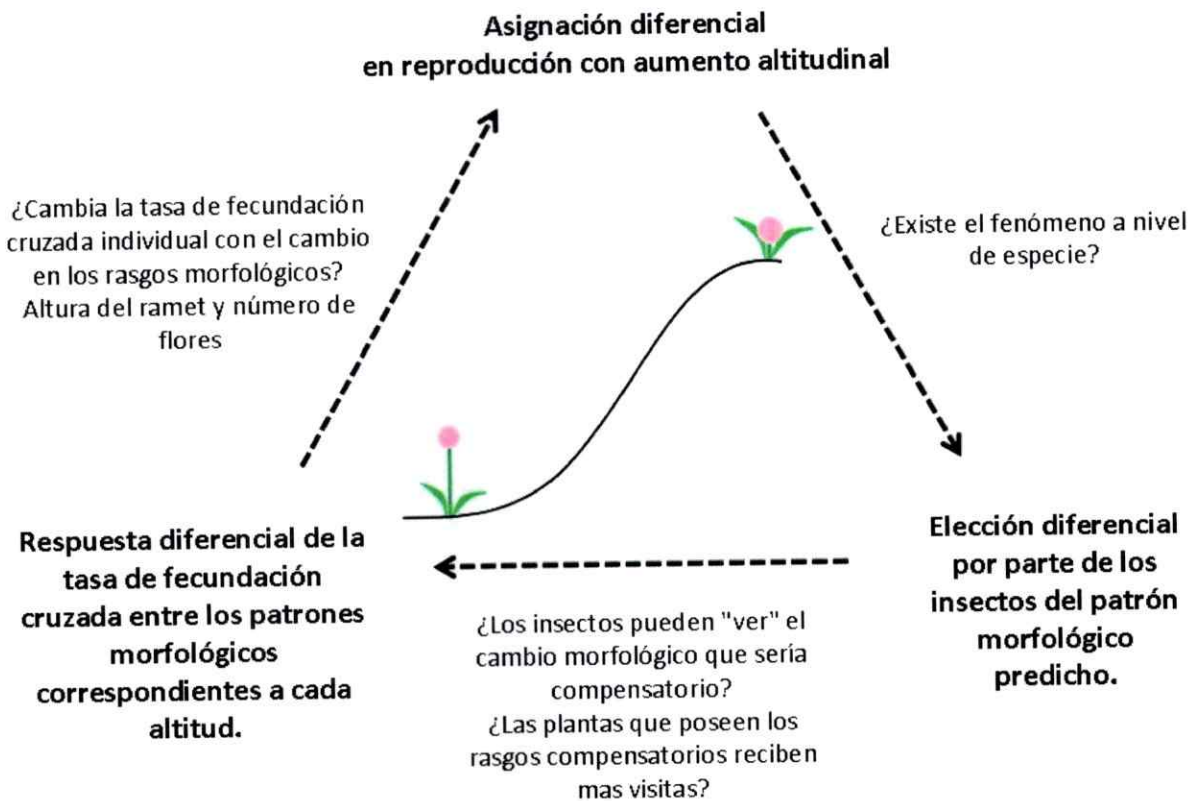


Figura 1: Triángulo de preguntas para abordar el mecanismo que estaría detrás de los rasgos compensatorios.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar si existen diferencias en los rasgos reproductivos y/o vegetativos de *Alstroemeria pallida* en un gradiente altitudinal de la Cordillera de Los Andes de Chile Central, verificando si estas diferencias contribuyen al aumento en la probabilidad de polinización, y por ende a diferencias en las tasas de fecundación cruzada.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la variabilidad de *Alstroemeria pallida* en la altura del ramet reproductivo, tamaño del despliegue floral, atraktividad de la umbella, estimada en área promedio de cada flor (cm²) y de la umbella (cm²), y niveles de composición de la inflorescencia bajo y sobre el límite arbóreo.
2. Determinar la distribución y asignación de biomasa vegetativa vs reproductiva bajo y sobre el límite arbóreo.

3. Estimar las tasas de visita de polinizadores, longevidad floral (tiempo de receptividad del estigma), probabilidades de polinización (tasa de visita x longevidad floral).

4. Evaluar la relevancia de las variables morfológicas en la tasa de visita de polinizadores a nivel de los ramets bajo y sobre el límite arbóreo.

5. Estimar las tasas de autofecundación genética a través de aloenzimas en *A. pallida* entre los diferentes pisos altitudinales y la relación con sus rasgos morfológicos a nivel de ramet.

4. HIPÓTESIS

Dado que la tasa de visita floral comunitaria de polinizadores en la zona andina disminuye con la altitud, las plantas alpinas adaptadas a la fecundación cruzada presentarían mecanismos compensatorios que permitirían maximizar la probabilidad de polinización, tales como: (1) aumento en tamaño relativo de las estructuras reproductivas y reducción del tamaño (altura) de los individuos; (2) aumento del número y tamaño de flores abiertas en el período de máxima floración, (3) aumento de la biomasa relativa de estructuras reproductivas.

Si los mecanismos descritos anteriormente compensan las diferencias en las tasas de polinización en el gradiente altitudinal, entonces (4) la tasa de fecundación cruzada en las poblaciones debería mantenerse en el gradiente altitudinal.

5. ESPECIE Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL SITIO DE ESTUDIO

Alstroemeria pallida Graham (*Alstroemeriaceae*), es una planta de distribución restringida en la Cordillera de Los Andes de Chile Central. Se encuentra entre Los Andes (32°50`S) y el curso superior del Río Maipo (34° 10`S) en la Cordillera de Santiago (Figura 2). Su distribución altitudinal abarca desde los 1.500 a 2.800 msnm (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003).

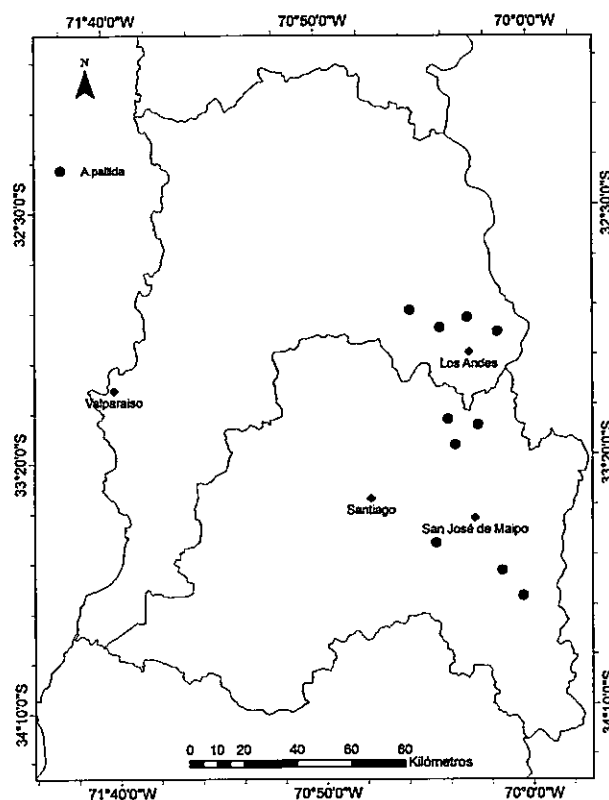


Figura 2: Distribución de *Alstroemeria pallida* Gram. Adaptado de Bayer, 1987 y Muñoz y Moreira, 2003.

Alstroemeria pallida es una hierba perenne, presenta rizomas (tallos subterráneos), de tal modo que los individuos (genets) no son distinguibles sino sus subunidades o ramet (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003). *Alstroemeria pallida* presenta vistosas flores de color rosado pálido con una franja amarilla en los dos tépalos superiores internos (Figura 3). Pan y Price (2002) muestran que la adecuación biológica en plantas con propagación vegetativa o clonal está compuesta por el reclutamiento de semillas (nuevos genet) y el reclutamiento de ramets vegetativos, pudiendo variar en la proporción en que contribuyen a la adecuación biológica las condiciones en las cuales crece. Para el presente estudio se considerará los ramets de *A. pallida* como las unidades funcionales para la polinización y la fecundación. En la zonas altas de Los Andes es visitada por los siguientes polinizadores: *Alloscirtetica gayi* (Hymenoptera-Apidae), *Alloscirtetica* sp. (Hymenoptera-Apidae), *Anthidium funereum* y *Megachile semirufa* (Hymenoptera-Megachilidae) y una especie de Panuridae (Arroyo *et al.*, 1982; Arroyo y Uslar, 1993) mientras en zonas más bajas de matorral montano es visitada por *Euherbstia excelens* (Andreninae-Andrenidae), *Alloscirtetica gayi* (Hymenoptera-Apidae), *Trichothungus herbsti* y *Cadeguala occidentalis* (Hymenoptera-Colletidae) y *Mourecotelles mixta* (Hymenoptera-Colletidae) (Uslar, 1982), *Megachile* sp. (Hymenoptera-Megachilidae), *Svastrides melanura* (Hymenoptera-Apidae), *Allocistertica gayi* (Hymenoptera-Apidae) y *Scaeva melamostoma* (Diptera-Syrphidae) (Cavieres, 1998).

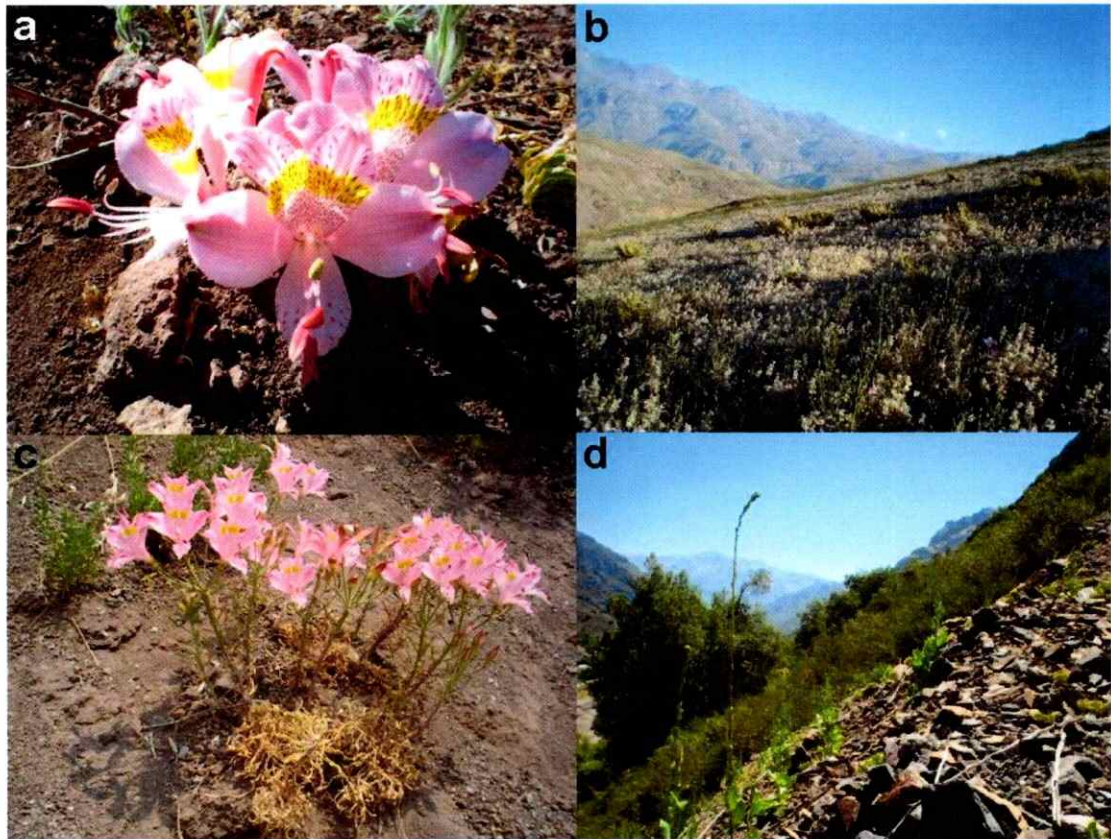


Figura 3: Cambio morfológico de *Alstroemeria pallida* en un gradiente altitudinal. a, b) *A. pallida* en Valle Nevado, Región Metropolitana, sobre el límite arbóreo a 2.320 msnm. c, d) *A. pallida* en Guardia Vieja, V Región, bajo el límite arbóreo a 1.700 msnm.

El clima general de la zona central de Chile es mediterráneo, con precipitaciones concentradas en el período frío del año y una estación seca en el período cálido (Di Castri y Hajek, 1976; Amigo y Ramírez, 1998). La zona donde se realizó el estudio presenta dos sub-bioclimas, el Mediterráneo xérico-oceánico y Mediterráneo pluviestacional (Luebert y Pliscoff, 2006).

La presente investigación se realizó abarcando la distribución de la especie ($32^{\circ}50'S - 34^{\circ}10'S$). Se utilizaron diferentes sitios en función de la particularidad de las preguntas y objetivos, los cuales serán detallados en cada una de las secciones (Figura 4).

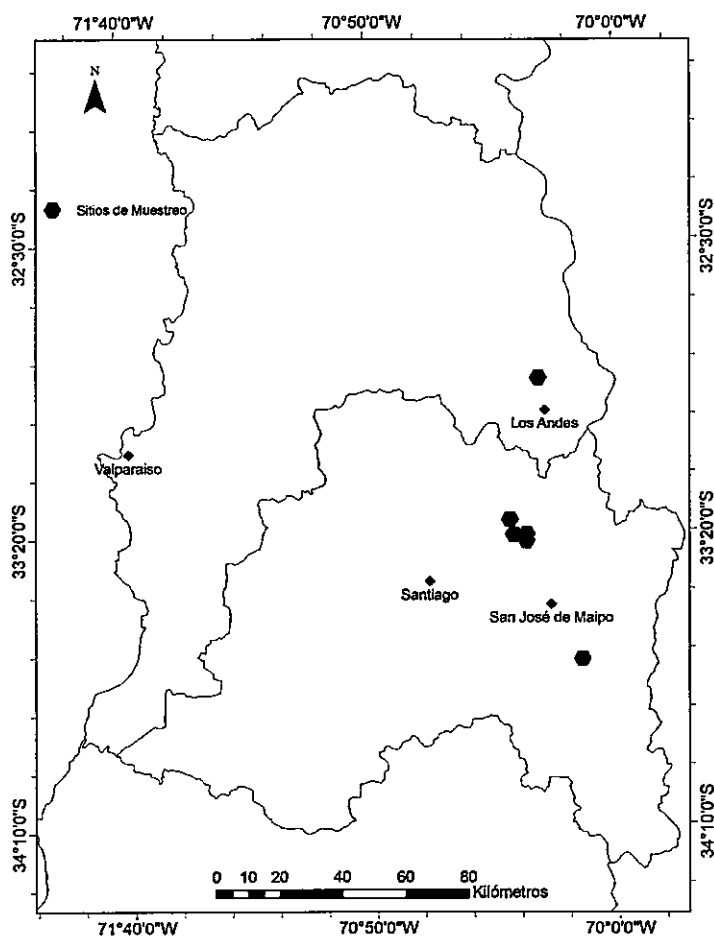


Figura 4: Mapa general de la distribución de los sitios de muestreo.

6. VARIACIÓN DE RASGOS VEGETATIVOS Y REPRODUCTIVOS EN *Alstroemeria pallida* Graham EN EL GRADIENTE ALTITUDINAL

6.1 Sitios de muestreo

Los objetivos 1 y 2 que consideran la evaluación de la variación de rasgos vegetativos y reproductivos de *A. pallida*, abarcando específicamente los temas de morfometría, distribución y asignación de biomasa, fueron realizados en seis localidades en Los Andes de Chile Central; Guardia Vieja (GV), Yerba Loca (YL), Camino La Disputada (CD), Farellones (F), Valle Nevado (VN) y El Yeso (EY). Las mediciones y recolección de muestras se efectuaron en el período de máxima floración entre los meses de Diciembre de 2008 y Enero de 2009 (Tabla 1).

Tabla 1: Coordenadas geográficas, piso vegetal y altitud (msnm) de los sitios de muestreo para evaluación de la variación de los rasgos vegetativos y reproductivos de *A. pallida*.

Población	Piso altitudinal	msnm	Latitud	Longitud
Guardia Vieja	Bajo el límite arbóreo	1.700	32°53'53,2"S	70°15'28,5"W
Yerba Loca	Bajo el límite arbóreo	1.650	33°20'42,8"S	70°20'50,8"W
Camino La Disputada poniente	Bajo el límite arbóreo	1.600	33°18'10,7"S	70°21'33,6"W
Farellones	Sobre el límite arbóreo	2.550	33°20'47,8"S	70°18'11"W
Valle Nevado	Sobre el límite arbóreo	2.320	33°21'49,7"S	70°18'16,3"W
El Yeso	Sobre el límite arbóreo	2.250	33°42'1"S	70°7'5,1"W

6.2 Método

6.2.1 Muestreo de rasgos vegetativos y reproductivos

En seis poblaciones de *Alstroemeria pallida* se realizó transectos en dirección 30° sobre la curva de nivel. A intervalos de tres metros se midió el ramet más cercano al transecto hasta contabilizar una muestra de 40 ramets por población. Cada vez que el transecto se extendía fuera de la población, se realizó un giro de 150° para continuar el muestreo. A cada ramet se le registró las variables detalladas a continuación:

Altura del ramet reproductivo

La altura del ramet se determinó midiéndolo desde el nivel del suelo hasta la altura de la umbella. Las mediciones fueron realizadas con una regla metálica de 60 cm (Figura 5c)

Despliegue floral

El despliegue floral se estimó a través del recuento del número de flores abiertas por umbella en el período de máxima floración para cada población en los 40 ramets.

Atractividad (tamaño floral en área)

Dado que la atractividad para los polinizadores podría estar influenciada por el tamaño de las flores, se midió en terreno el ancho y alto de cada flor (Figura 5: d y e). Con esta medida se estima el área calculando la superficie para un rombo (Figura 5: f1, f2 y f3) en cada flor, obteniéndose el área promedio de cada flor por ramet (cm^2) y el área total de la umbella (cm^2).

A cada ramet se midió otros atributos ecológicos que podrían tener relevancia para el desempeño de la especie en distintas condiciones ambientales:

1. *Coordenadas y altitud (msnm) de los ramets.* Mediante un GPS se determinó a cada ramet su posición geográfica y la altitud barométrica en la que se encontraba.
2. *Distancia de los tres vecinos más cercanos.* Se empleó esta métrica para estimar la densidad poblacional que afecta a cada ramet y así registrar si existe diferencia en la distribución espacial de los ramets.
3. *Altura y cobertura de la vegetación acompañante.* Se instaló una parcela cuadrada (1 m^2), con el ramet focal al centro de ésta (Figura 5: a y b). La estimación de la altura de la vegetación se realizó con una regla metálica de 60 cm, midiendo la altura media del estrato dominante en cada parcela. La cobertura vegetal de cada parcela fue medida a través de la escala de Braun Blanquet.

Todas las variables morfométricas y ecológicas fueron evaluadas a través de análisis de varianza múltiple (MANOVA) semi-paramétrico de dos factores (Sokal y Rohlf, 1981) para observar si existe diferencia significativa entre cada piso vegetacional (bajo y sobre el límite arbóreo) y entre las poblaciones, se permutaron 10.000 veces los datos. Los análisis fueron realizados con el programa R (paquete: vegan; R Development Core Team, 2011).

Posteriormente, todas las variables, tanto morfométricas como ecológicas, fueron correlacionadas en una matriz diagonal, aplicándose una prueba de correlación de Pearson para evaluar la significancia de las correlaciones entre las variables (R Development Core Team, 2011).

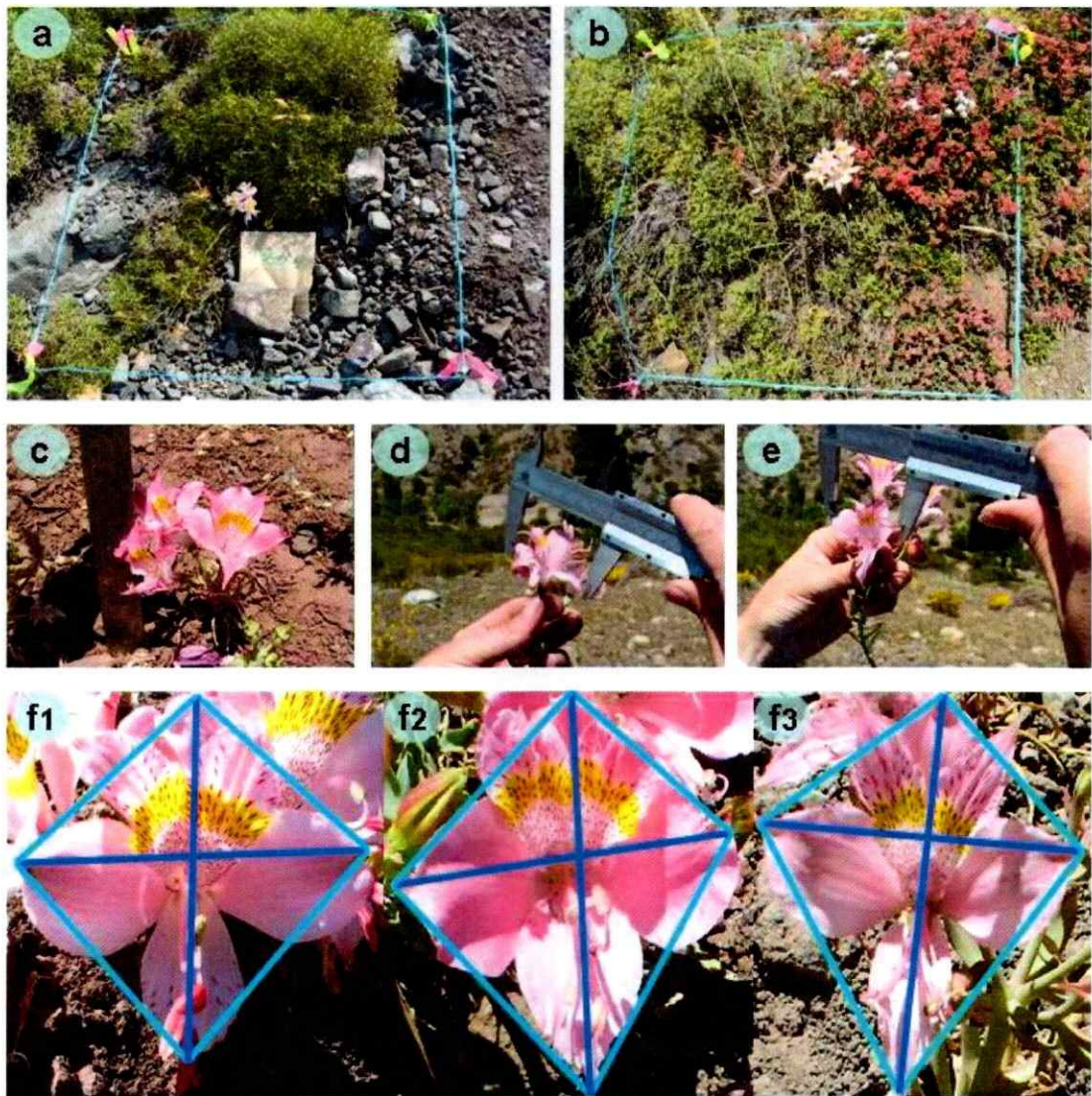


Figura 5: Métodos utilizados para medir las variables morfológicas. a, b) Instalación de parcelas cuadradas de 1 m²; c) Altura promedio del ramet; d, e) Alto y ancho de cada flor; f1, f2, f3) Área por flor en tres ejemplares diferentes (las líneas azules muestran las variables medidas, alto y ancho de cada flor, y las líneas celestes muestran cómo se determinó el área para cada flor).

6.2.2 Análisis de las variables morfométricas y ecológicas a nivel de ramet

El análisis sistémico a nivel del ramet de las relaciones entre los rasgos morfométricos y las variables ecológicas, se realizó para determinar cómo se relacionan las variables antes descritas entre sí, cuáles son los mecanismos que podrían mediar los fenotipos diferenciales de los ramets y si estos cambios fenotípicos se podrían relacionar con el gradiente altitudinal.

Se escogió la metodología de ecuaciones estructurales ya que permite ajustar las variables simultáneamente a nivel de ramets (Mitchell, 1992; Mitchell, 1994; Loehlin, 2004; Grace, 2006), además de evaluar la magnitud de cada interrelación dando al mismo tiempo una visión global del sistema en estudio (Engel y Irwin, 2003; Cariveau *et al.*, 2004; Irwin *et al.*, 2004; Irwin, 2006; Sapir, 2009). En la presente investigación se utilizó el paquete SEM del programa R para ajustar el modelo (Fox, 2006; R Development Core Team, 2011).

Las variables se consideraron sin jerarquía, estableciendo en el modelo todas las relaciones posibles. La altitud se consideró variable de efecto fijo. Las variables morfométricas y ecológicas fueron normalizadas mediante la transformación de potencia (Box y Cox, 1964). Con las variables normalizadas se confeccionó una matriz diagonal de correlación. Posteriormente se construyó un modelo teórico de cómo se relacionan las variables de acuerdo a la información biológica que se tiene del sistema en estudio, no se consideró

variables latentes. La matriz de correlaciones y el modelo teórico propuesto se ajustaron mediante ecuaciones estructurales (Mitchell, 1992; Mitchell, 1994; Loehlin, 2004; Grace, 2006).

Los mejores modelos se seleccionaron a través de la prueba estadística de bondad de ajuste (χ^2), una de las más usadas en SEM, para caracterizar el ajuste de datos (Canavos, 1988; Fox, 2006).

El cálculo de la bondad de ajuste de los datos a una distribución aproximada χ^2 permite evaluar si existen diferencias significativas entre la distribución de los datos observados y la distribución de los datos predichos por el modelo. Valores de χ^2 cercanos a uno indican que no hay diferencia entre los valores observados y los predichos. Por lo tanto, un valor de χ^2 no significativo o cercano a 1, indica que el modelo se ajusta a los datos y es un buen candidato para explicar las relaciones de las variables en cuestión. Todo esto indica que los datos predichos por el modelo y los datos observados no difieren significativamente, y por lo tanto, el modelo representa adecuadamente las relaciones entre las variables (Canavos, 1988; Fox, 2006).

En el caso de poseer varios modelos con valores de χ^2 similares, se utilizó el criterio de información Bayesiano (BIC), el cual permitió elegir el mejor modelo entre los que presentan ajustes similares, de acuerdo a economía de parámetros. Por último, se generó una interfase gráfica que permitió analizar el sistema en su conjunto y determinar cuáles serían las variables que más

explican el cambio en las variables morfométricas de *Alstroemeria pallida* a nivel de cada ramet.

6.2.3 Asignación en estructuras reproductivas

Se realizaron en los mismos transectos del muestreo de rasgos morfológicos, descrito en el punto 6.2.1., colectándose 40 ramets por población. Los ramets muestreados fueron embolsados en papel con un código identificador que señalaba lugar de origen y número de individuo dentro de la muestra (Figura 5a).

En laboratorio, cada ramet se separó en estructuras reproductivas, pedicelo y hoja. Los distintos componentes de cada ramet (240 muestras) fueron secados en estufa de aire forzado a 70°C durante 8 días y pesados. A los 10 días se pesaron nuevamente para revisar si había variación del peso.

Las variables fueron normalizadas a través de la transformación de potencia (Box y Cox, 1964). A cada componente se le realizó un análisis de varianza anidado para establecer si existen diferencias significativas entre las medias de los pesos secos entre altitudes (bajo y sobre el límite arbóreo) y a su vez, la variación que aportan las poblaciones dentro de cada piso. Los análisis fueron

realizados con el programa R (paquetes: MASS, car; R development Core Team, 2011).

La asignación relativa en las estructuras reproductivas se evaluó a través del cálculo de la biomasa relativa, es decir, el porcentaje de biomasa que aporta cada órgano y estructura vegetal al total del ramet (Fabbro y Körner, 2004) para cada población.

6.3 Resultados

En esta sección se mostrará la variación de los rasgos morfométricos de *Alstroemeria pallida*, que podrían variar en el gradiente altitudinal. También se describe las variables ecológicas que podrían estar asociadas al crecimiento de algunos de los órganos vegetales, tales como la altura de la cobertura que rodea cada ramet, el porcentaje de cobertura asociado a cada ramet y la densidad de ramets por metro cuadrado. Además, se muestra la distribución y asignación de biomasa en los ramets reproductivos de la especie.

6.3.1 Patrones de distribución de las variables morfométricas

La altura promedio de los ramets fue de 16,7 cm en los sectores bajos y de 9,5 cm en las zonas altas (Figura 6), con un valor promedio máximo de 22,9 cm en

GV y un mínimo de 7,2 cm en VN, observándose una alta variabilidad entre poblaciones y una tendencia promedio a reducir el tamaño del ramet con el incremento de la altitud.

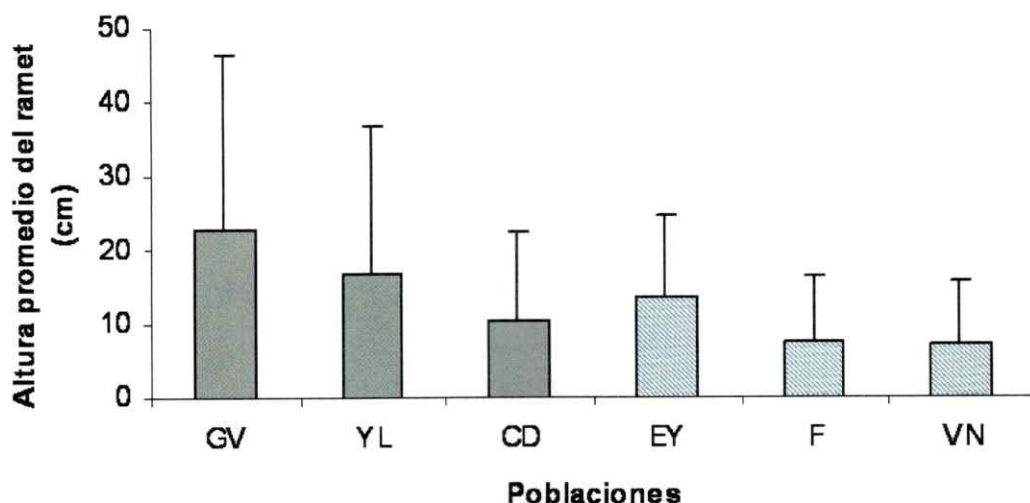


Figura 6: Altura del ramet promedio (cm) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

El tamaño promedio del despliegue floral fue de 3,9 y 3,7 (flores/umbella), en el piso altitudinal bajo y alto respectivamente, disminuyendo con la altitud. Los valores extremos fueron 3,6 flores/umbella en Farellones (F) y 3,9 flores/umbella en Guardia Vieja (GV) y Yerba Loca (YL). Al observar el gráfico de la Figura 7 podemos apreciar que la variación entre los distintos sitios es contenida por dos desviaciones estándar.

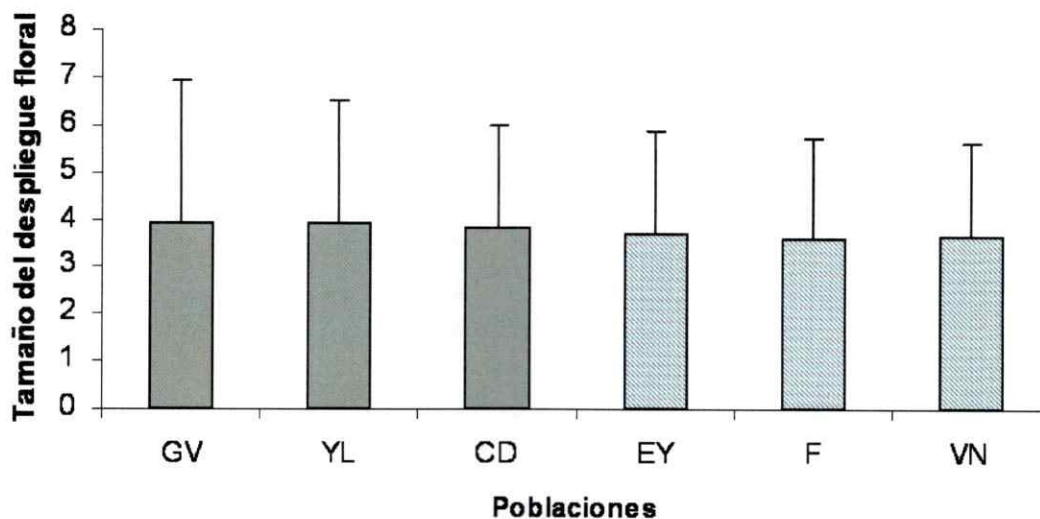


Figura 7: Tamaño del despliegue floral promedio (número de flores por umbella) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

El área promedio de cada flor presentó valores de 9,1 y 10,6 cm² para el piso altitudinal bajo y alto respectivamente (Figura 8), aumentando en promedio con la altitud. El máximo valor de área de una flor promedio fue de 12 cm² en F mientras que el mínimo valor promedio se encontró en la población GV con 7,9 cm².

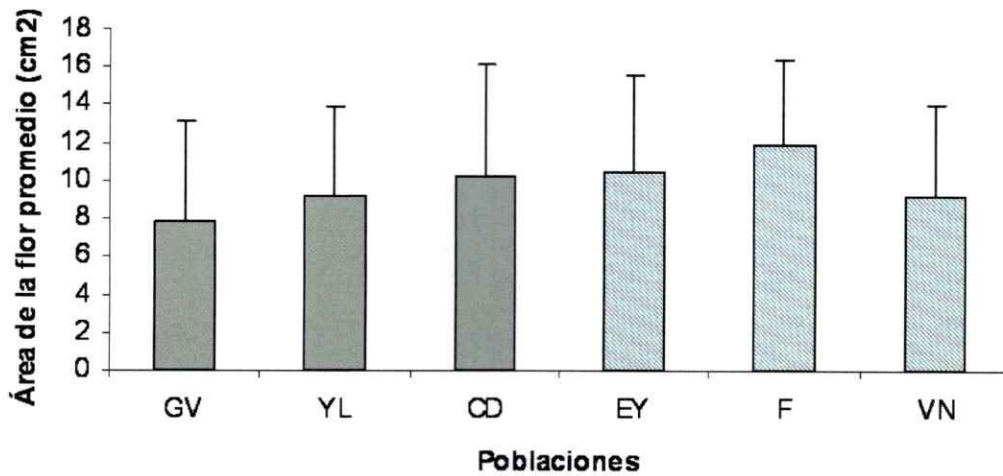


Figura 8: Área flor promedio de cada ramet (cm²) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

El área total promedio de la umbella, es decir, el área de todas las flores de la umbella en conjunto, fue de 34,7 y 38,6 cm² para el piso altitudinal bajo y alto respectivamente (Figura 9), observándose un aumento con la altitud. El área de la umbella fluctúa entre 30 cm² en GV y 43,5 cm² en F.

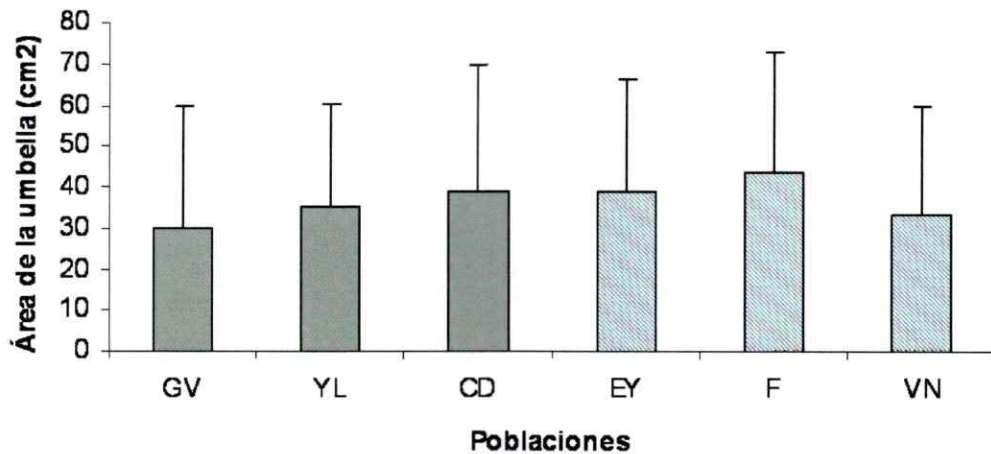


Figura 9: Área total promedio de la umbella (cm²) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

El nivel de composición de la umbella podría influir en la posibilidad de geitonogamia dentro del ramet. Bajo el límite arbóreo promedio de composición de la umbella fue de 2 niveles mientras que sobre el límite arbóreo se encontró 1,1 niveles de composición (Figura 10). En GV se encontró los máximos valores de nivel de composición obteniendo en promedio 2,9, en cambio las tres poblaciones ubicadas a mayor altitud -EY (1,2), F (1,1) y VN (1,1)- presentan menores niveles de composición de la umbella y, por tanto, menor posibilidad de geitonogamia entre los distintos niveles de composición de la umbella, apoyando el efecto de la protandria.

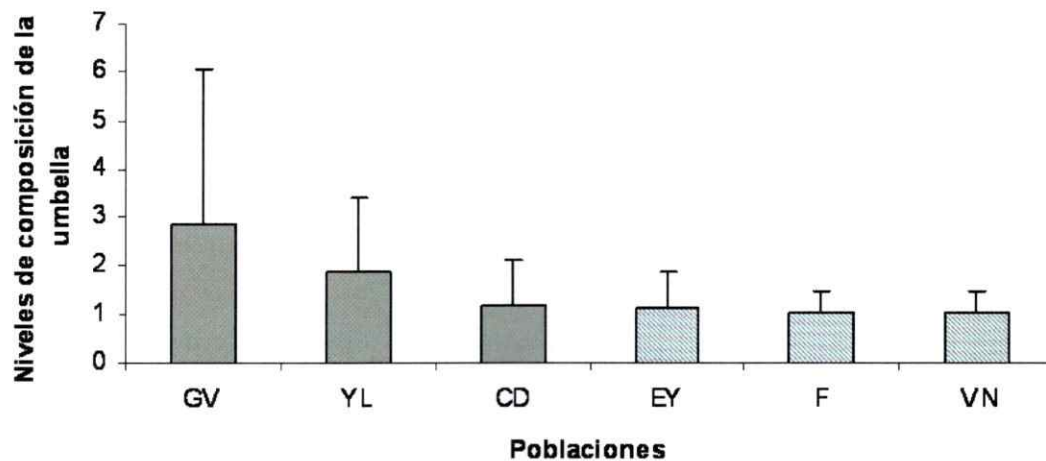


Figura 10: Niveles de composición promedio de la umbella en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gis-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

6.3.2 Patrones de distribución de las variables ecológicas

La altura promedio de la vegetación (m) que rodea a cada ramet fue de 37,2 cm bajo el límite arbóreo y 22 cm sobre (Figura 11), disminuyendo en el gradiente altitudinal. Se encontró un promedio de 17,3 cm en F y un máximo de 52,3 cm promedio en GV. Sin embargo, se encontró sitios que presentan vegetación baja en menores altitudes (e.g. CD) y viceversa (e.g. EY).

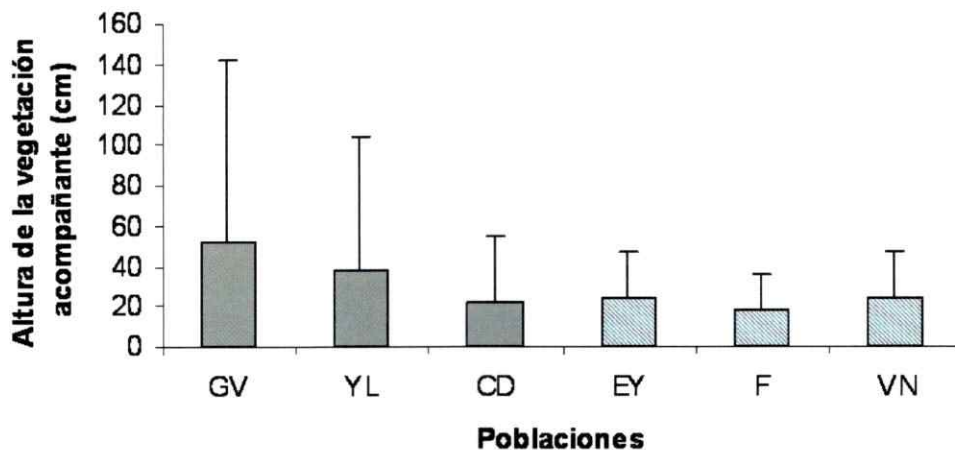


Figura 11: Altura promedio de la vegetación acompañante en 1 m² alrededor del ramet en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

La densidad promedio de los ramets fue de 25,8 y 25 ramet/m² en el piso bajo y alto respectivamente (Figura 12), destacándose la amplia dispersión de la variabilidad dentro de los pisos, la cual no presentó un patrón altitudinal claro.

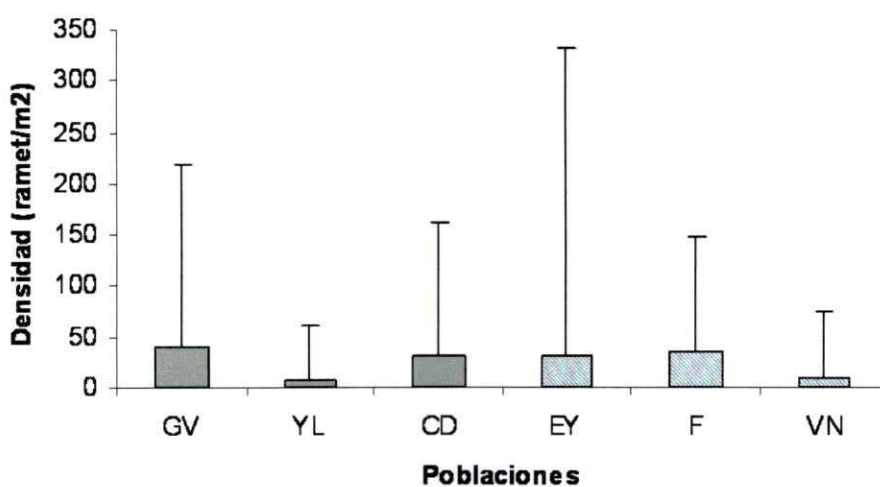


Figura 12: Densidad promedio de ramet/m² en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

La cobertura promedio en un metro cuadrado alrededor de cada ramet fue de 28% y 43% en las zonas bajas y altas respectivamente (Figura 13), aumentando en promedio con la altitud.

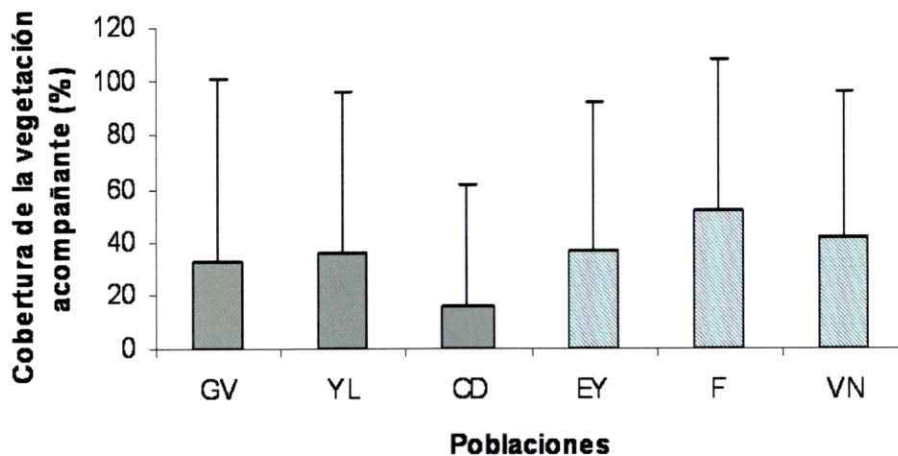


Figura 13: Cobertura promedio de la vegetación acompañante en 1 m² alrededor del ramet (%) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

El análisis de varianza múltiple (MANOVA) mostró que el conjunto de las variables morfométricas y ecológicas presentan diferencias significativas tanto entre pisos altitudinales (Tabla 2) como entre poblaciones. El porcentaje de la variación explicada es de 5% para la diferencia entre pisos altitudinales y 13% entre poblaciones.

Tabla 2: MANOVA variables morfométricas y ecológicas

	Grados de libertad	F	R ²	p-value	
Piso altitudinal	1	12,9405	0,05	< 0,001	***
Poblaciones	4	9,1449	0,13	< 0,001	***
Residuos	234		0,83		

6.3.3 Relaciones de las variables morfométricas y ecológicas a nivel de ramet

Al analizar la matriz de correlaciones entre todas las variables morfológicas y ecológicas se observó valores significativos positivos de correlación entre los siguientes pares de variables: área de la umbella y número de flores, área de la umbella y área de la flor promedio, niveles de composición de la umbella y altura del ramet. Esto sugiere que los ramets que son más altos, también tienen mayor desarrollo de las estructuras reproductivas (Tabla 3).

Además, en las variables ecológicas se encontró que la altura de la vegetación que rodea a los ramet, está positiva y significativamente correlacionada con la altura total del ramet y el nivel de composición de la umbella. Esto indicaría que en los sitios donde los ramets son más altos, también la comunidad vegetal asociada posee un mayor tamaño, lo que hablaría de una característica

asociada al sitio. La cobertura promedio de la vegetación está correlacionada positivamente con la altura del ramet y la altura de la vegetación que lo rodea (Tabla 3).

La altitud mostró correlaciones positivas y significativas tanto con el área promedio de la flor y de la umbella, como con el porcentaje de cobertura. Esto significa que a medida que se aumenta en altitud, estas variables también incrementan sus valores (Tabla 3).

En el caso de las correlaciones negativas, la altitud se relaciona significativamente con la altura del ramet, los niveles de composición de la umbella y la altura de la vegetación que rodea al ramet, es decir, a medida que aumenta la altitud, los ramets son más pequeños y con menos niveles de composición, además de la menor estatura de la vegetación que rodea a los ramets en los pisos más altos (Tabla 3).

Tabla 3: Matriz de correlaciones entre las variables morfométricas y las ecológicas asociadas a cada ramet evaluados en tres poblaciones a 1.650 msnm: Guardia Vieja (GV), Yerba Loca (YL), Camino La Disputada (CD) y tres poblaciones a 2.300 msnm: El Yeso (EY), Farellones (F) y Valle Nevado (VN). Niveles de significancia: 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '*' 0,1 '.' 1.

	Altura total ramet	Número de flores	Área promedio flor	Área umbella	Niveles de composición	Altura de la cobertura de la vegetación	Densidad	% Cobertura promedio de la vegetación	Altitud
Altura total ramet	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Número de flores	0,05	1	-	-	-	-	-	-	-
Área promedio de flor	-0,09	-0,13	1	-	-	-	-	-	-
Área umbella	-0,05	0,68 ^{***}	0,60 ^{***}	1	-	-	-	-	-
Niveles de composición	0,52 ^{***}	0,07	-0,10	-0,07	1	-	-	-	-
Altura de la cobertura de la vegetación	0,55 ^{***}	-0,01	-0,01	-0,04	0,44 ^{***}	1	-	-	-
Densidad	0,06	0,02	0,01	0,03	-0,001	0,03	1	-	-
% Cobertura promedio de la vegetación	0,30 ^{***}	-0,08	0,12	0,04	-0,004	0,39 ^{***}	-0,01	1	-
Altitud	-0,38 ^{***}	-0,09	0,29 ^{***}	0,15 ^{**}	-0,41 ^{***}	-0,27 ^{***}	0,01	0,28 ^{***}	1

Un análisis integrado de estas correlaciones (Tabla 3) se muestra en el análisis del sistema de ecuaciones estructurales (SEM), donde se relacionó las variables de los rasgos morfológicos de los ramets y las ecológicas asociadas.

El mejor modelo SEM ajustado posee los siguientes parámetros: χ^2 del modelo = 0,11899, Df = 3, valor observado = 0,98946. Índice de la bondad de ajuste = 0,9998. BIC = -16,323. El valor observado cercano a 1 permitió determinar que modelo representa las relaciones entre las variables.

Al evaluar a nivel de ramet todas las variables a la vez mediante el ajuste de un modelo SEM (Figura 14), se encontró que la altitud tiene un efecto negativo sobre el tamaño del ramet, es decir, el tamaño del ramet decrece a mayor altitud, al igual que la vegetación que lo acompaña y el área total de la umbella. Sin embargo, la altura de la vegetación que rodea a cada ramet tendría un mayor efecto en el tamaño de éste, lo que se refleja en la presencia de ramets más altos cuando la vegetación circundante es de mayor altura.

En el caso del número de flores, el efecto de la altitud resultó relativamente pequeño. Por otra parte, el número de flores y el área total de la umbella mostraron que estas dos variables están fuertemente relacionadas, sin mediar un gran efecto de la altitud sobre ellas (Figura 14). A su vez, el tamaño del ramet tuvo una pequeña influencia sobre el área total de la umbella. Sin embargo, el efecto del tamaño del ramet sobre el número de flores no permitió ajustar un mejor modelo, por tanto no se consideró esa vía en el modelo seleccionado.

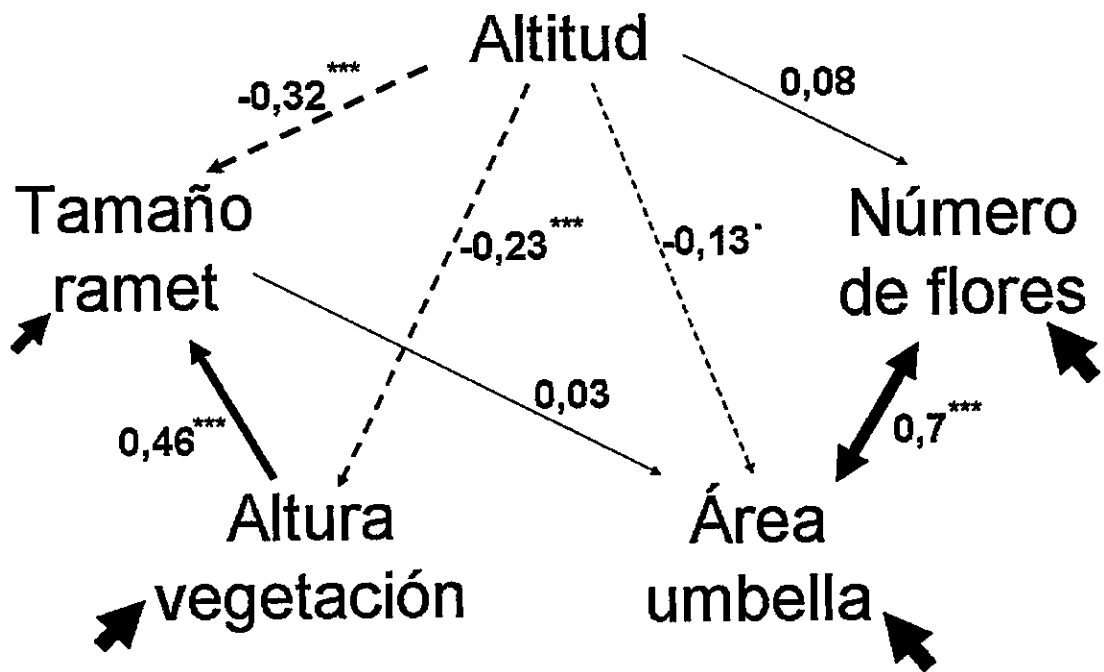


Figura 14: Diagrama de sistema de ecuaciones estructurales ajustado para los datos de morfometría a nivel de ramet. Las flechas representan las vías que relacionan las variables. Las flechas segmentadas representan correlaciones negativas y las continuas, correlaciones positivas entre las variables. El tamaño de las flechas es proporcional a su efecto en el modelo. Niveles de significancia: 0 '****' 0,001 '***' 0,01 '**' 0,05 '.' 0,1 '.' 1.

Los efectos directos de la altitud sobre los ramets fueron negativos, es decir, son inversamente proporcionales. Al adicionar los efectos indirectos de la altitud se observó que la mayor magnitud de influencia corresponde a la relación entre la altitud y el tamaño del ramet, seguido de la altura de la vegetación circundante. En el caso de las estructuras reproductivas, la altitud tiene un mayor efecto total, directo más indirecto, sobre el área de la umbella que sobre el número de flores (Tabla 4).

Tabla 4: Efectos directos (ED) e indirectos (EI) entre las variables morfométricas y las ecológicas asociadas a cada ramet, evaluados a través de SEM.

	Altitud ED	Tamaño ramet ED	Número de flores ED	Altura de la vegetación ED	Área de la umbella ED	Altitud EI	Efecto total Altitud
Tamaño del ramet	-0,32	-	-	0,46	-	-0,11	-0,43
Número de flores	-	-	-	-	0,7	-0,1	-0,1
Altura de la vegetación	-0,23	-	-	-	-	-	-0,23
Área de la umbella	-0,13	-	0,7	-	-	0,07	-0,06

6.3.4 Distribución de biomasa en el gradiente altitudinal

La distribución de la biomasa se estimó a partir del peso seco absoluto de hojas, tallos y estructuras reproductivas. El peso seco promedio de hojas no mostró una diferencia clara atribuible al cambio altitudinal (Tabla 5 y Figura 15). Sin embargo, el peso seco promedio del tallo mostró una gran diferencia entre los pisos altitudinales. A su vez, se observa que este órgano aporta la mayor parte del peso de órganos vegetativos (Tabla 5 y Figura 16).

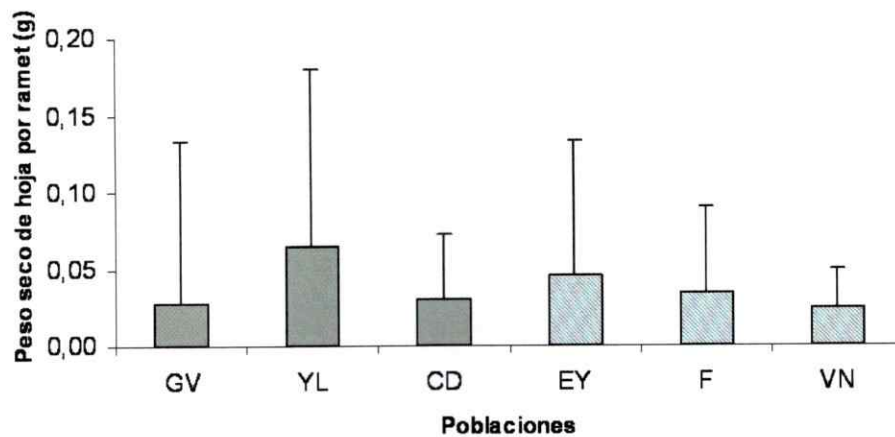


Figura 15: Peso seco promedio de hojas (g) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

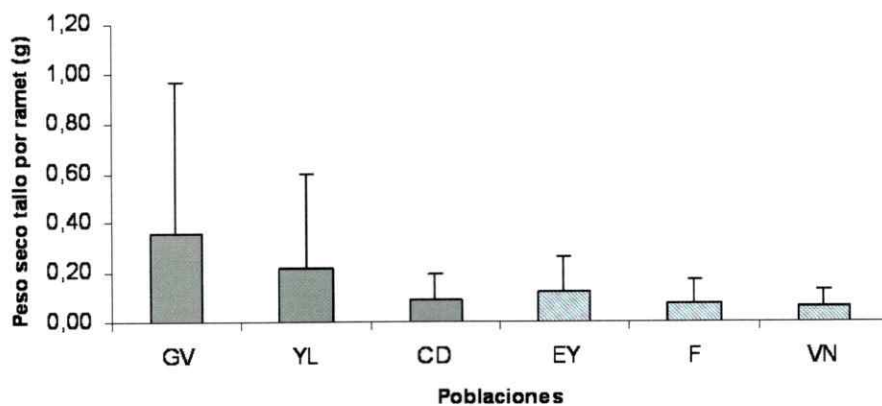


Figura 16: Peso seco promedio de tallo (g) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

El peso seco promedio de estructuras reproductivas, el cual reúne todas las estructuras sobre el nivel de diferenciación del meristemo floral (rayos, tépalos,

androceo y gineceo), presentó una gran heterogeneidad dentro de cada piso (Tabla 5 y Figura 17).

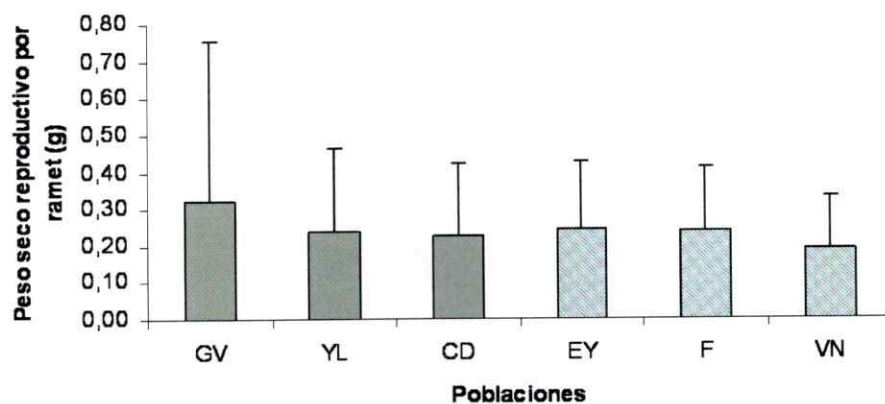


Figura 17: Peso seco promedio de estructuras reproductivas (g) en dos pisos altitudinales a 1.650 msnm (gris-sólido) y 2.300 msnm (gris-achurado). Las barras representan dos desviaciones estándar.

Tabla 5: Distribución de la biomasa (peso seco) por estructura vegetal de *Alstroemeria pallida* en tres poblaciones a 1.650 msnm: Guardia Vieja (GV), Yerba Loca (YL), Camino La Disputada (CD) y tres poblaciones a 2.300 msnm: Farellones (F), Valle Nevado (VN) y El Yeso (EY).

Variable	N	Piso altitudinal	Población	Promedio	Desviación estándar
Peso seco hoja	40	Arriba	EY	0,046	0,04
	40		F	0,034	0,03
	40		VN	0,023	0,01
	40	Abajo	GV	0,028	0,05
	40		YL	0,064	0,06
	31		CD	0,030	0,02
Peso seco tallo	40	Arriba	EY	0,124	0,07
	40		F	0,081	0,05
	40		VN	0,065	0,03
	40	Abajo	GV	0,353	0,31
	40		YL	0,219	0,19
	31		CD	0,089	0,05
Peso seco vegetativo (hoja+tallo)	40	Arriba	EY	0,170	0,10
	40		F	0,115	0,06
	40		VN	0,089	0,04
	40	Abajo	GV	0,381	0,35
	40		YL	0,283	0,23
	31		CD	0,119	0,06
Peso seco reproductivo	40	Arriba	EY	0,244	0,09
	40		F	0,241	0,09
	40		VN	0,189	0,07
	40	Abajo	GV	0,320	0,22
	40		YL	0,242	0,11
	31		CD	0,226	0,10

6.3.5 Asignación de biomasa en el gradiente altitudinal

La asignación reproductiva fue evaluada a través de la biomasa relativa, donde dentro de cada ramet se cuantificó el aporte porcentual de cada órgano y estructura vegetal al total de biomasa del ramet.

La biomasa relativa del tallo en el ramet se distribuyó entre 26 y 50% en las poblaciones de zonas bajas (1.650 msnm), y entre 23 y 30% en las poblaciones de altura (2.300 msnm). Las hojas en general aportaron poco a la biomasa del ramet, presentando valores entre 4 y 12% en las poblaciones de baja altitud. En el caso de la asignación en hojas de los ramet que crecen a 2.300 msnm, los valores fluctuaron entre 8 y 11% (Figura 18).

En cuanto a la asignación reproductiva, la cual reúne todas las estructuras sobre el nivel de diferenciación del meristemo floral (rayos, tépalos, androceo y gineceo) se encontró grandes aportes a la biomasa relativa en todos los casos. Las poblaciones ubicadas a menor altitud presentaron porcentajes que varían entre 46 y 65%, y dentro de las poblaciones ubicadas en las zonas altas se encontró valores que fluctúan entre 59 y 68% (Figura 18), lo cual representa un aumento en la asignación a estructuras reproductivas a mayor altitud.

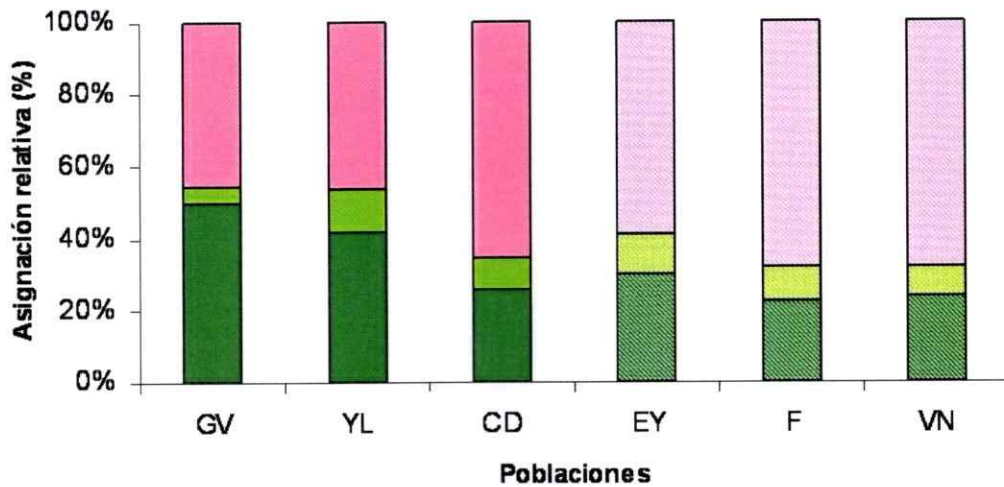


Figura 18: Biomasa relativa por ramet en tres poblaciones a 1.650 msnm (sólido): Guardia Vieja (GV), Yerba Loca (YL), Camino La Disputada (CD) y tres poblaciones a 2.300 msnm (achurado): El Yeso (EY), Farellones (F) y Valle Nevado (VN). Peso relativo tallo (verde oscuro), peso relativo hojas (verde claro) y peso relativo estructuras reproductivas (rosado).

6.4 DISCUSIÓN

6.4.1 Rasgos morfométricos y variables ecológicas

Una reducción de la altura del ramet en zonas altas, permitiría que las flores se encuentren a la altura de vuelo de los insectos tal como propone Cavieres (2000) para la especie *Phacelia secunda*. Los resultados promedio obtenidos por piso confirman esta idea, sin embargo, si se observa la altura del ramet entre las poblaciones de cada piso, se encuentra que gran parte de la varianza es explicada por la variación entre poblaciones más que la variación entre

pisos. Esto significaría que la disminución de la altura del ramet no posee un patrón altitudinal claro, sino más bien depende de cada población, sugiriendo que otras variables como la relevancia del sitio o la disponibilidad de nutrientes, propuestas en la literatura, restringirían el crecimiento en las zonas alpinas (Billings y Mooney, 1968; Billings, 1974; Bliss, 1971, 1985; Körner, 2003). Por otra parte, la existencia de correlaciones positivas entre variables ecológicas como altura de la vegetación acompañante y cobertura promedio, también podrían relacionarse con un micrositio más favorable en disponibilidad de recursos para todos los organismos presentes.

En cuanto a las variables asociadas a cada ramet, se observa que entre la altura total del ramet y los niveles de composición existe una correlación positiva, lo cual indica que ramets de mayor tamaño tendrían mayor composición de la umbella, pudiendo relacionarse con mayores niveles de geitonogamia, tal como describe Barrett (2002).

El estudio del tamaño del despliegue floral y la atractividad se realizó en base a dos supuestos: el primero es que estos rasgos varían con el gradiente altitudinal (Fabbro y Körner, 2004) y el segundo es que los polinizadores favorecen a las plantas que los poseen (Bell, 1985). El tamaño del despliegue floral evaluado a través del número de flores abiertas en el período de máxima floración en las seis poblaciones no muestra diferencia, lo cual indicaría que este rasgo no

posee gran variabilidad asociada al gradiente altitudinal, por tanto, no podría funcionar como un rasgo compensatorio para la disminución del servicio de polinización de esta especie. En el caso de la atractividad de las flores para los polinizadores, evaluada a través del área de cada flor y de la umbella en su conjunto, sí se encontraron diferencias en el promedio tanto entre los pisos como entre las poblaciones. Sin embargo, la variabilidad de estos rasgos sugiere que no obedecen a un patrón altitudinal.

El área total de la umbella está correlacionada con el número de flores, lo que significaría que a mayor área de la umbella existiría un mayor número de flores, no observándose un compromiso entre estos dos rasgos reproductivos. Este planteamiento concuerda con lo propuesto por Worley *et al.* (2000) y por Arroyo *et al.* (2006) que observan que el número y tamaño de las flores depende de la disponibilidad de recursos, los cuales estarían relacionados con las condiciones particulares de cada sitio.

Por otra parte, la mayor interacción entre flores y animales, observada a mayor tamaño floral no debería considerarse como la única condicionante de esta variable, pues existen diferentes razones que podrían explicar su variación, como los procesos del desarrollo, los cuales tienen que ver con mecanismos genéticos complejos de la diferenciación y elongación del meristemo floral (Whitney y Glover, 2007).

En cuanto a la altitud (msnm), ésta se correlaciona negativamente con la altura del ramet, con los niveles de composición y con la altura de la vegetación que rodea a cada ramet, es decir, a medida que se incrementa en altitud los ramet son más bajos, presentan umbrellas simples y la vegetación acompañante es de menor tamaño.

Al evaluar la interacción de todas las variables a la vez a nivel de cada ramet, se observa en el modelo de ecuaciones estructurales ajustado, que la altitud tiene una correlación negativa sobre la altura del ramet. Sin embargo, también se observa que la altura de la vegetación que rodea al ramet tiene una influencia positiva sobre su tamaño, lo cual se puede interpretar de dos formas. Por un lado, es posible que como el ramet está creciendo bajo sombra, se etiole y desarrolle una mayor altura. Alternativamente, el sitio puede poseer mejores niveles de nutrientes y menor desecación, entre otras variables ecológicas, lo cual le permitiría al ramet crecer a mayor altura al igual que la vegetación que lo rodea.

En el caso del tamaño del despliegue floral y la atractividad (área de la umbella), estas dos variables poseen una correlación altamente positiva, es decir, los ramets con más flores también presentan una mayor área de la umbella, lo cual concuerda con lo propuesto por Worley *et al.* (2000). Si se integran los resultados de altura del ramet y tamaño floral, se observa una

pequeña influencia del primero sobre el segundo, sugiriendo que a pesar de la variación, estos rasgos no estarían relacionados directamente. Por tanto, si la disponibilidad de recursos afecta el número y el tamaño de las flores, esto sería independiente de la altura del ramet, apoyando la idea de la etiolación del meristemo apical de brote bajo la sombra de la vegetación acompañante. En el futuro se podría verificar estas ideas mediante la realización de experimentos de sombreado diferencial de los ramet y un análisis nutricional del suelo en el que se desarrolla cada población.

6.4.2 Distribución y asignación de biomasa

La asignación diferencial a estructuras reproductivas propuesta a nivel comunitario para Los Alpes, muestra un posible mecanismo por el cual las plantas alto andinas podrían adaptarse a la disminución del servicio de polinización (Fabbro y Körner, 2004). En *A. pallida*, la biomasa en hojas no presentó variación entre los pisos, sin embargo, muestra gran variabilidad entre las poblaciones dentro de cada piso. El peso seco de los tallos florales o pedicelos y las estructuras reproductivas variaron tanto a nivel de piso altitudinal como de poblaciones. En la presente investigación se encontró poblaciones que cumplen el patrón propuesto por Fabbro y Körner (2004), donde se asigna mayor biomasa relativa a las estructuras reproductivas en las zonas de mayor altura, y otras que no explican su distribución de biomasa con el cambio en la

altitud, sugiriendo que la distribución de la biomasa dependería de otros factores.

La asignación relativa muestra una gran inversión en estructuras reproductivas, sobre 45% para todas las poblaciones. Sin embargo, la variación entre las poblaciones no es explicada por el gradiente altitudinal. Esto podría sugerir que la asignación relativa a estructuras reproductivas en *Alstroemeria pallida* no sería un mecanismo compensatorio para sortear la disminución en el servicio de polinización, sino más bien una respuesta específica a las condiciones ambientales y ecológicas de cada población. Esto concuerda con el trabajo de Sugiyama y Bazzaz (1998) en un experimento de asignación reproductiva en un gradiente nutricional. Más estudios serían necesarios para poder entender de forma más específica qué otros mecanismos y rasgos compensatorios podrían estar actuando en esta especie alto andina para su éxito reproductivo y sobrevivencia a lo largo de los diferentes gradientes ambientales en los que ésta se encuentra presente.

7. ROL DEL TAMAÑO DEL RAMET Y DEL DESPLIEGUE FLORAL EN LA TASA DE VISITA DE *Alstroemeria pallida* EN UN GRADIENTE ALTITUDINAL

Esta etapa del estudio se enfocó en la evaluación del rol del tamaño del ramet y del despliegue floral en la tasa de visita de *A. pallida*, correspondiente a los objetivos 3 y 4 que abarcan específicamente los temas evaluación de las diferencias en la tasa de visita y receptividad del estigma a nivel de cada ramet en el gradiente altitudinal y su relación con variables morfométricas.

7.1 Sitios de muestreo

Los muestreos fueron realizados en dos sitios, Yerba Loca (YL) ubicada a los 1.800 msnm y Farellones (F) a los 2.550 msnm (Tabla 6). Las observaciones se realizaron en enero del 2009 durante el período de máxima floración.

Tabla 6: Coordenadas geográficas, piso vegetacional y altitud (msnm) de sitios de muestreo para evaluación del rol del tamaño del ramet y el tamaño del despliegue floral en la tasa de visita de polinizadores de *A. pallida*.

Población	Piso altitudinal	msnm	Latitud	Longitud
Yerba Loca	Bajo el límite arbóreo	1.800	33°20'8,8"S	70°19'30,1"W
Farellones	Sobre el límite arbóreo	2.550	33°20'50,3"S	70°18'15,5"W

7.2 Método

7.2.1 Puntos de observación

La tasa de visita de polinizadores se determinó en 45 y 47 ramets en dos poblaciones: Yerba Loca a 1.800 msnm y Farellones a 2.550 msnm respectivamente. Un día antes de las observaciones de la visita de polinizadores se marcó los ramets en los puntos de observación (Figura 19), registrándose las variables morfométricas y ecológicas detalladas más abajo.



Figura 19: Puntos de observación de polinizadores. La cinta azul representa la posición y las estacas con número identifican a cada ramet permitiendo la observación a distancia de las visitas de polinizadores.

7.2.2 Medición de rasgos morfométricos

Se midió los siguientes rasgos morfométricos y las variables ecológicas que podrían ser relevantes para el análisis:

1. *Tamaño total del ramet*: desde el nivel del suelo hasta la altura promedio de la umbella, la cual fue medida con una regla metálica de 60cm.
2. *Número de flores*: se realizó un conteo de las flores abiertas en cada umbella en el período de máxima floración.
3. *Cobertura de flores*: mediante la escala de Braun Blanquet se estimó en parcelas de un metro cuadrado para cada ramet la cobertura de flores de la misma especie y otras que pudieran influir el comportamiento de los polinizadores.
4. *Cobertura de la vegetación*: mediante la escala de Braun Blanquet se estimó en parcelas de un metro cuadrado la cobertura de la vegetación que acompaña a cada ramet observado.
5. *Altura de la vegetación*: en parcelas de un metro cuadrado se midió con regla metálica de 60 cm la altura promedio del estrato dominante.
6. *Densidad*: mediante el método de los tres vecinos más cercanos se estimó la densidad intraespecífica que podría estar afectando a cada ramet.
7. *Altitud barométrica y coordenadas geográficas*: para cada ramet fueron estimadas a través de un GPS.

7.2.3 Receptividad del estigma

El estado fenológico de las flores fue determinado mediante observación de 57 flores por población. En cada piso vegetacional se determinó la duración de la receptividad del estigma durante la ventana de observación de polinizadores. *Alstroemeria pallida* es protándrica, es decir, los estambres maduran antes que el estigma esté receptivo. El polen es expulsado de una a dos anteras a la vez hasta completar las seis; tardando alrededor de cuatro días en la fase fenológica masculina (Figura 20, superior). El estilo emerge entre las anteras senescentes para luego desplegar el estigma, momento en el cual está receptivo (Figura 20, inferior), mecanismo similar a lo descrito en *A. aurea* (Aizen y Basilio, 1995)

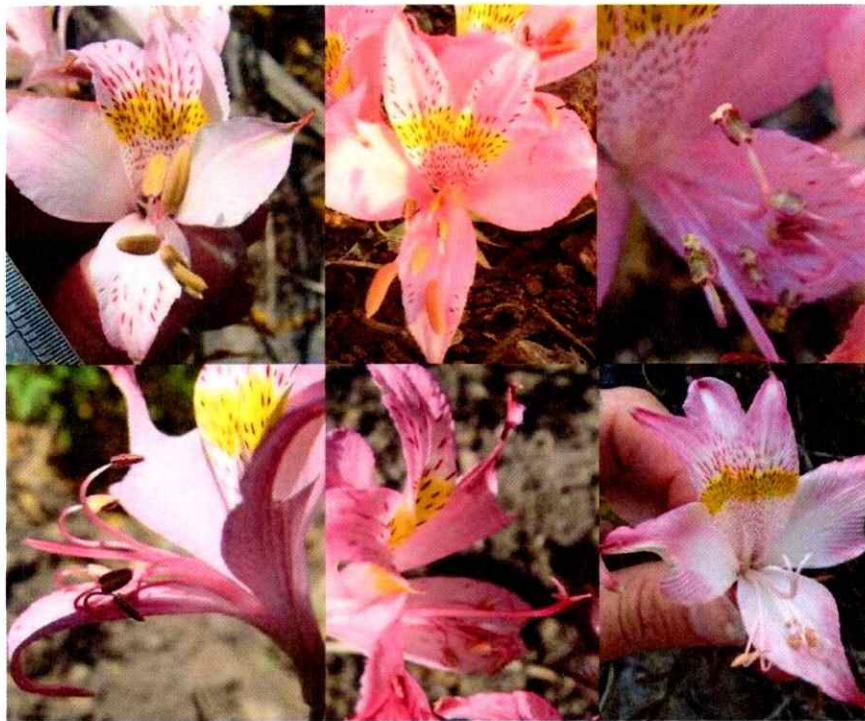


Figura 20: Fenología de la protandria en *Alstroemeria pallida*. Imágenes superiores: madurez y senescencia de anteras. Imágenes inferiores: despliegue del estigma.

7.2.4 Visitas de polinizadores

Tanto en Yerba Loca como en Farellones se estableció alrededor de 10 puntos de observación (Figura 19), los cuales fueron muestreados durante cuatro días despejados, desde que el sol llegaba a las laderas observadas hasta el ocaso. Se consideró como visitantes a todos los insectos que tuvieron contacto directo con las anteras y/o los estigmas (Figura 21) durante la ventana de observación. Los visitantes fueron fotografiados y colectados para su identificación posterior a través del estudio de insectarios. El esfuerzo de muestreo fue calculado a través de curvas de acumulación de especies (SAC) mediante el método de rarefacción en el programa R (paquete VEGAN, R Development Core Team, 2011).



Figura 21: Díptero con actividad en las anteras de *A. pallida*.

La visita de polinizadores se registró durante 15 minutos en cada punto de observación, luego se cambió al azar al siguiente punto hasta cubrir 45 minutos por día por cada ramet. Cada ramet fue observado al menos 90 minutos en total, acumulando las observaciones de varios días (adaptado de Arroyo *et al.*, 1982). El cálculo de la tasa de visita por flor fue obtenido del número total de visitantes por ramet dividido por el tiempo de observación y el número de flores que presentaba cada umbella (Kearns y Inouye, 1993; Arroyo *et al.*, 1982). Además se calculó la tasa de visita por umbella, dividiendo el número de visitas de cada ramet por el tiempo observado.

Posteriormente se estimó la ventana promedio de polinización total en cada población multiplicando la tasa de visita promedio (visitantes/min/flor) por la receptividad promedio del estigma, es decir, el tiempo total de exposición a polinizadores de cada flor en cada altitud (Bingham y Orthner, 1998).

7.2.5 Análisis estadístico

Cada una de las variables morfométricas fue evaluada mediante análisis de varianza previa normalización por la transformación de potencia, en tanto las variables en porcentaje fueron normalizadas con la transformación de Bliss (Arcoseno) (Sokal y Rohlf, 1981) para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de las variables en los diferentes pisos

vegetacionales, bajo y sobre el límite arbóreo. Posteriormente, todas las variables fueron correlacionadas en una matriz diagonal, aplicándose una prueba de correlación Pearson para evaluar la significancia de las correlaciones entre las variables.

Mediante la matriz de correlaciones se eligió las variables morfológicas de los ramets el tamaño del ramet y del despliegue floral (número de flores). La primera es el tamaño del ramet, descrita en la literatura como un facilitador de la polinización donde a mayor altitud (msnm) los ramet serían más bajos coincidiendo con la altura de vuelo de los polinizadores (Cavieres, 1998, 2000). La segunda es el número de flores, el cual está relacionado con la atraktividad de la inflorescencia vía tamaño del despliegue floral (Bell, 1985; Cavieres, 1998, 2000). Con estas variables se planteó dos modelos teóricos que relacionan las variables morfométricas tomando en cuenta la biología del sistema, uno en ausencia de la variable altitud (msnm) y otro alternativo en presencia de esta fuente de variación (Tabla 7).

Tabla 7: Modelos teóricos de las relaciones a nivel de ramets entre la tasa de visita de polinizadores, la altura del ramet y el número de flores, con y sin la presencia de la variable altitud. Las líneas continuas son relaciones directamente proporcionales y las líneas segmentadas serían relaciones indirectamente proporcionales.

Modelos teóricos propuestos	Relaciones teóricas de las variables
	<p>Dentro de las poblaciones de baja altitud (1.800 msnm) el tamaño de las plantas (cm) sería mayor. La tasa de visita se relacionaría directamente proporcional al tamaño del ramet y al número de flores.</p>
	<p>Dentro de las poblaciones de mayor altitud (2.550 msnm) el tamaño de las plantas (cm) sería menor relacionándose inversamente proporcional con la tasa de visita. El número de flores por ramet o tamaño del despliegue floral estaría relacionado directamente proporcional a la tasa de visita.</p>
	<p>Al incorporar la variación de la altitud dentro del modelo, es decir, la altitud afectaría a cada ramet, se esperaría, que el tamaño de las plantas (cm) fuera menor al aumentar la altitud, estableciendo una relación inversamente proporcional, al igual que con la tasa de visita. En tanto el número de flores por ramet o tamaño del despliegue floral estaría relacionado directamente proporcional tanto con la altitud como con la tasa de visita, es decir, a mayor altitud mayor número de flores y mayor número de visitas.</p>

El primer y segundo modelo relacionan en cada piso altitudinal, tanto el tamaño del ramet como el tamaño del despliegue floral con la tasa de visita (Tabla 7); en tanto, el tercer modelo relaciona estas mismas dos variables incorporando la altitud como variable de efecto fijo. Estos modelos fueron ajustados por piso altitudinal y para los dos pisos en conjunto.

Posteriormente se realizó el análisis del sistema biológico mediante sistemas de ecuaciones estructurales (Mitchell, 1992; Mitchell, 1994; Grace, 2006) para dilucidar cuál o cuáles variables son más importantes para la tasa de visita de polinizadores a nivel de cada ramet. Los estimadores utilizados para seleccionar los modelos fueron los mismos descritos en el punto 6.2.2.

7.3 Resultados

7.3.1 Verificación del supuesto de variación en el servicio de polinización entre dos pisos altitudinales en *Alstroemeria pallida*.

Los taxa asociados a cada población fueron *Megachile* sp. (Hymenoptera-Megachilidae), *Centris nigerrima* (Hymenoptera-Apidae), *Scaptia (Pseudoscione) viridiventris* (Diptera-Tabanidae), Gerontinae sp. (Diptera-Bombyliidae), Diptera 1 y 3, *Caenoalictius* sp. (Hymenoptera-Halictidae), *Bombus dalhbomii* (Hymenoptera-Apidae), *Bombus terrestris* (Hymenoptera-Apidae) en Yerba Loca a 1.800 msnm y *Megachile semirufa* (Hymenoptera-Megachilidae), *Centris nigerrima* (Hymenoptera-Apidae), *Caenopangonia brevirostris* (Diptera-Tabanidae), *Arthrobracus* sp. (Coleoptera-Meliridae), *Dorymirmex goetschi* y especie 1 (Hymenoptera-Formicidae) y *Bombus terrestris* (Hymenoptera-Apidae) en Farellones a 2.550 msnm.

Al analizar la curva de acumulación de especies (SAC) por rarefacción se obtuvo un valor de desaceleración en la incorporación de nuevos taxa en Farellones (2.550 msnm) alrededor de los 20 ramets acumulados, en cambio para Yerba Loca el punto crítico fue alrededor de los 10 ramets acumulados (Figura 22).

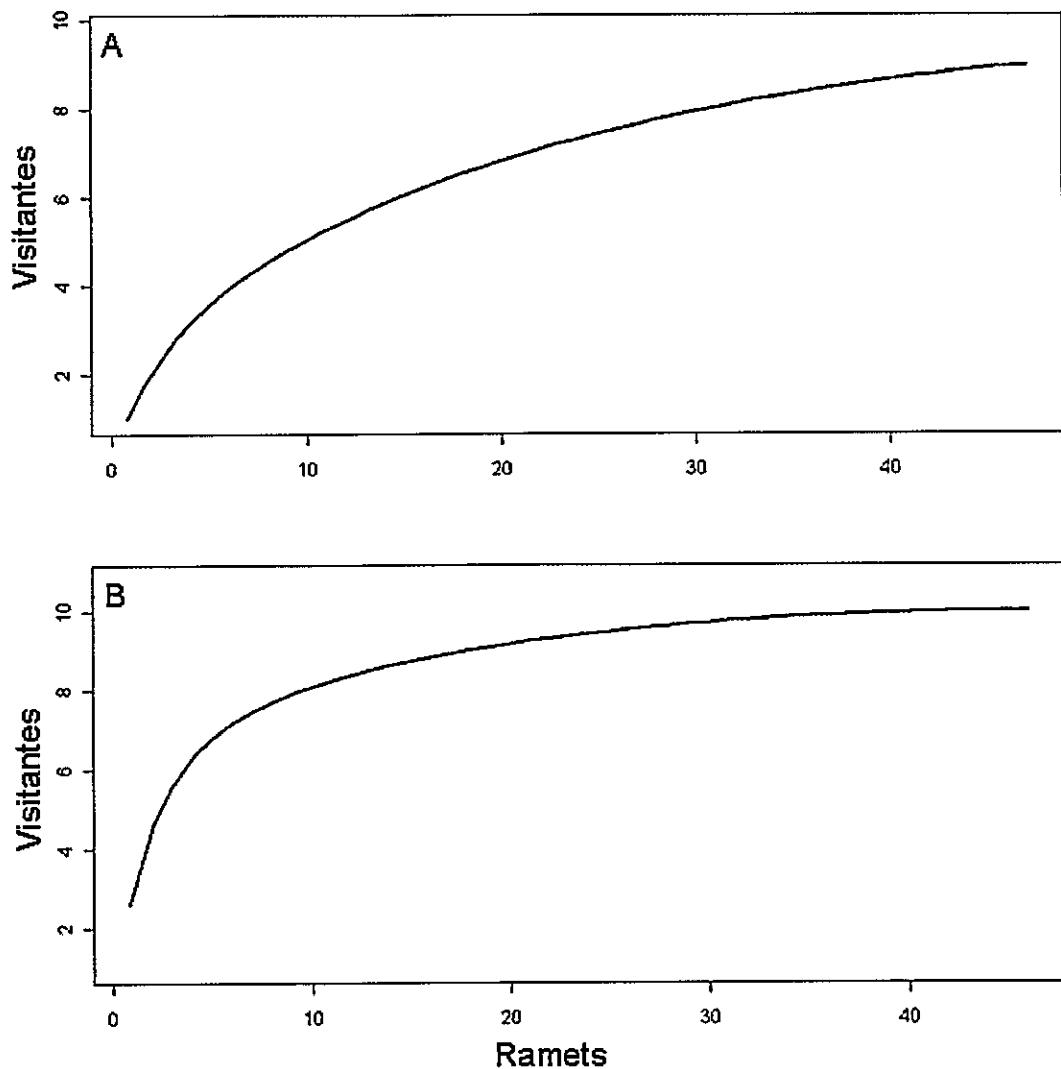


Figura 22: Curvas de acumulación de especies, método de rarefacción (SAC), especies de visitantes por ramet acumulado. A: SAC población de Farellones. B: SAC población Yerba Loca.

Para verificar que se cumpla el patrón comunitario de reducción de servicio de polinización en el gradiente altitudinal descrito por Arroyo *et al.* (1985) a nivel intraespecífico, fueron evaluadas las tasas de visita floral en los dos pisos altitudinales, bajo el límite arbóreo (Yerba Loca a 1.800 msnm) y sobre el límite

arbóreo (Farellones a 2.550 msnm). Se observó que la tasa promedio de visita de polinizadores fue de 0,043 visitantes/minuto/flor en Yerba Loca (1.800 msnm) bajo el límite arbóreo y de 0,007 visitantes/minuto/flor en Farellones (2.550 msnm) sobre el límite arbóreo. Las diferencias entre los dos pisos altitudinales son significativas, observándose una disminución en la tasa de visita por flor con el aumento de altitud (Tabla 8).

En un submuestreo de 57 flores de cada población se determinó que la receptividad promedio del estigma, durante la ventana de observación de la tasa de visita, fue de 1,3 días en Yerba Loca (1.800 msnm) y de 2,4 días en Farellones (2.550 msnm). Al calcular la cantidad de visitas por día se obtuvo 20,64 visitas/día en Yerba Loca (1.800 msnm) y 1,68 visitas/día en Farellones (2.550 msnm). Multiplicando los valores de receptividad del estigma por la tasa de visita por flor, se obtuvo el tiempo total promedio de exposición a polinizadores de una flor. Estos valores son 0,0559 en Yerba Loca (1.800 msnm) y 0,0168 en Farellones (2.550 msnm), confirmando la tendencia de disminución del servicio de polinización con la altitud, encontrada por Arroyo *et al.* (1985) en un estudio comunitario para el piso alto andino de Chile Central.

7.3.2 Tasas de visita de polinizadores, variables morfológicas y ecológicas asociadas

La tasa promedio de visita de polinizadores por ramet en la población de Yerba Loca (1.800 msnm) fue de 0,144 y en la zona de alta montaña, Farellones (2.550 msnm), fue de 0,024 visitantes/minuto, presentando diferencias significativas (Tabla 8). La correlación de la tasa de visita por ramet con la altitud fue inversamente proporcional mostrando un valor de -0,54 lo cual significa que a mayor altitud menor tasa de visita por ramet (Tabla 9).

El tamaño promedio del ramet presentó diferencias significativas entre Yerba Loca (1.800 msnm), con un valor promedio de 0,16 m y Farellones (2.550 msnm) con 0,13 m (Tabla 8). En la Figura 23 se puede observar que las pendientes de las líneas de tendencia que relacionan el tamaño del ramet con la tasa de visita no presentaron un efecto entre las variables y que la diferencia en la distribución de la variabilidad está mayormente contenida en el cambio altitudinal entre la población de Yerba Loca (rombos azules) y la población de Farellones (cuadrados rosados). A su vez, la correlación entre la tasa de visita por flor y el tamaño promedio del ramet fue débilmente significativa (Tabla 9).

Tabla 8: Análisis de varianza de tasa de visita de polinizadores y variables morfológicas y ecológicas en *Alstroemeria pallida* a nivel de piso altitudinal, bajo y sobre el límite arbóreo. Niveles de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

Variables	N	Piso altitudinal	Promedio	Desviación estándar	F	df	p-value
Tasa de visita por flor (visita/min/flor)	45	Arriba (2.550msnm)	0,007	0,008	80,545	1	<0,001***
	47	Abajo (1.800msnm)	0,043	0,030			
Tasa de visita por ramet (visita/min)	45	Arriba (2.550msnm)	0,024	0,029	67,949	1	<0,001***
	47	Abajo (1.800msnm)	0,144	0,131			
Altura total ramet	45	Arriba (2.550msnm)	0,13	0,04	4,6894	1	0,03299*
	47	Abajo (1.800msnm)	0,16	0,07			
Número de flores	45	Arriba (2.550msnm)	3,6	1,2	0,8561	1	0,3573
	47	Abajo (1.800msnm)	3,3	1,4			
% cobertura de flores total	45	Arriba (2.550msnm)	26	21	10,409	1	0,001749 **
	47	Abajo (1.800msnm)	14	18			
% cobertura de la vegetación	45	Arriba (2.550msnm)	49	30	36,927	1	<0,001***
	47	Abajo (1.800msnm)	18	16			
Altura de la vegetación acompañante	45	Arriba (2.550msnm)	0,17	0,05	1,7792	1	0,1856
	47	Abajo (1.800msnm)	0,25	0,19			
Densidad	45	Arriba (2.550msnm)	29,7	51,6	4,7624	1	0,03169*
	47	Abajo (1.800msnm)	8,0	9,5			

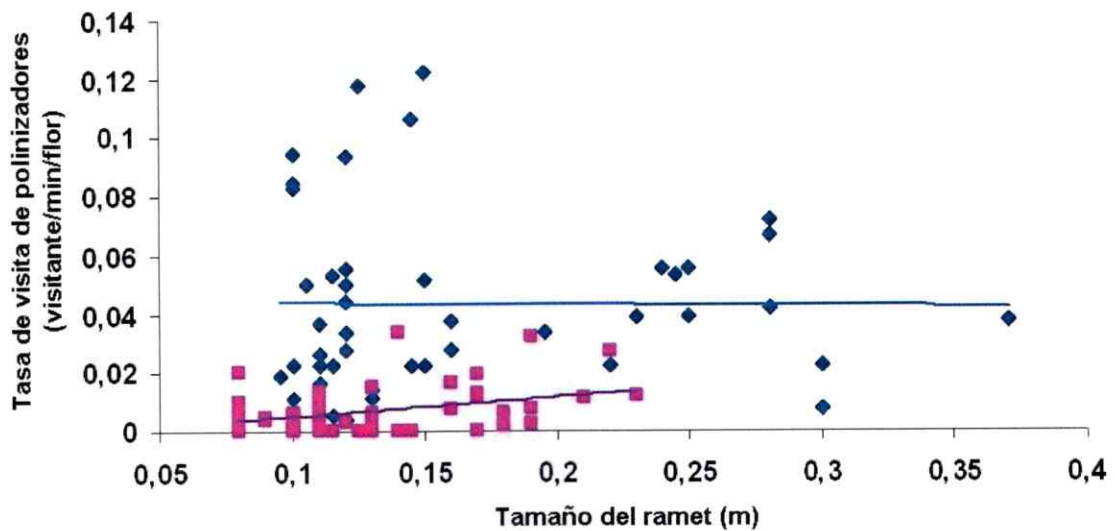


Figura 23: Relación entre la tasa de visita promedio por flor y el tamaño del ramet (m). Los rombos azules representan la población de Yerba Loca (1.800 msnm) y los cuadrados rosados representan la población de Farellones (2.550 msnm). Las líneas son las tendencias correspondientes a cada población.

El número promedio de flores no presentó diferencias significativas entre las poblaciones de Yerba Loca y Farellones con valores de 3,3 y 3,6 respectivamente (Tabla 8). En la Figura 24 se observa que las pendientes de las líneas de tendencia que relacionan el tamaño del despliegue floral (número de flores) con la tasa de visita son casi nulas, por lo tanto, no existe una relación fuerte entre las variables. Además, la diferencia en la distribución de la variabilidad también está mayormente contenida en el cambio altitudinal entre la población de Yerba Loca (rombos azules) y la población de Farellones (cuadrados rosados). La correlación de la tasa de visita de polinizadores por flor con el número de flores por ramet no fue significativa. Sin embargo, esta

variable mostró una correlación positiva y significativa con la tasa de visita a nivel de ramet de 0,28; es decir, al incrementar el número de flores también aumenta la tasa de visitas de polinizadores por ramet (Tabla 9).

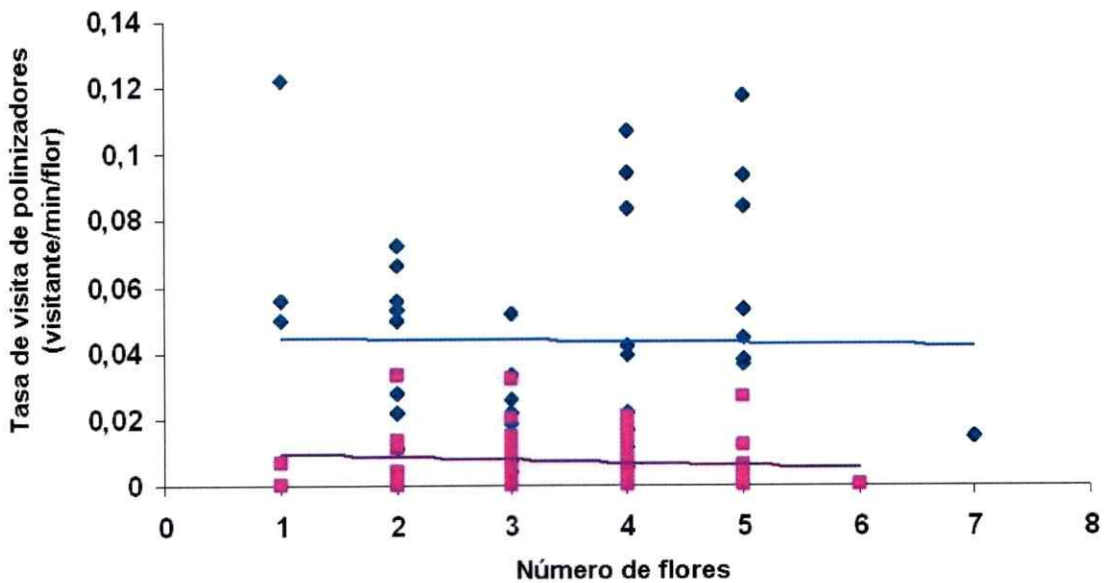


Figura 24: Relación entre la tasa de visita promedio por flor y el número de flores por ramet. Los rombos azules representan la población de Yerba Loca (1.800 msnm) y los cuadrados rosados representan la población de Farellones (2.550 msnm). Las líneas son las tendencias correspondientes a cada población.

La cobertura promedio de flores en 1 m² alrededor del ramet presentó diferencias significativas entre las poblaciones de Yerba Loca con valores promedio de 14% y Farellones con 26% (Tabla 8). La cobertura promedio de la vegetación en un metro cuadrado alrededor del ramet también presentó diferencias significativas entre las poblaciones de Yerba Loca con valores

promedio de 18% y Farellones con 49% (Tabla 8). No se observó una correlación significativa entre la cobertura de flores (1 m² alrededor del ramet) y la tasa de visita por flor, a diferencia de la cobertura de la vegetación acompañante que presentó una correlación negativa y significativa de -0,33 (Tabla 9) con la tasa de visita de polinizadores por flor, lo cual implicaría que a mayor cobertura de la vegetación acompañante menor tasa de visitas de polinizadores.

La altura promedio de la vegetación alrededor del ramet no presentó diferencias significativas, observándose valores promedio de 0,25 m en Yerba Loca y 0,17 m en Farellones (Tabla 8). A diferencia de la cobertura de la vegetación acompañante, la altura promedio de la vegetación que rodea el ramet tuvo una correlación positiva y significativa de 0,24 sobre la tasa de visita (Tabla 9), lo cual significa que a medida que aumenta la altura de la cobertura alrededor de cada ramet, éste recibe más visitas.

La densidad promedio de ramets presentó diferencias significativas entre las poblaciones de Yerba Loca con valores promedio de 8 ramets/m² y en Farellones de 30 ramets/ m² (Tabla 8). En la Tabla 9 se observa que la densidad de ramets presentó una correlación débilmente negativa pero significativa con una tasa de visita por flor de -0,19.

Tabla 9: Matriz de correlaciones entre las variables morfométricas y las ecológicas asociadas a los ramets evaluados para la tasa de visita de polinizadores a nivel de individuo. Niveles de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 '' 1

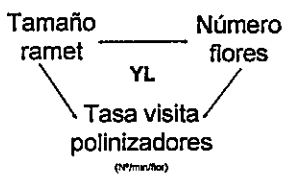
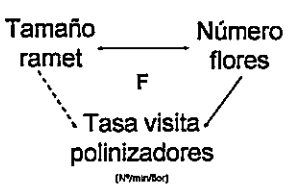
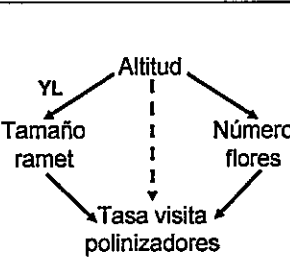
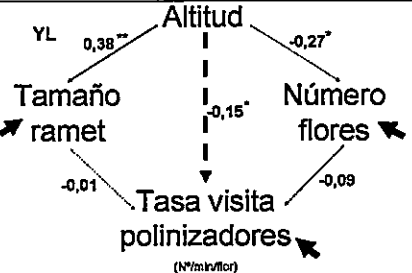
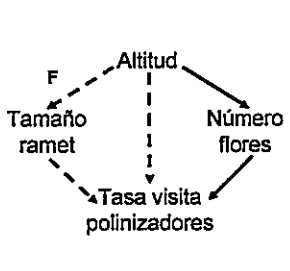
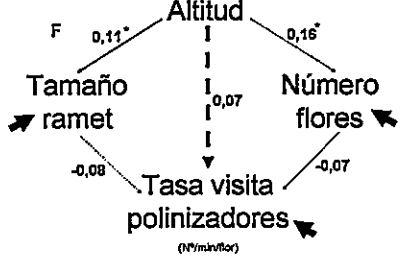
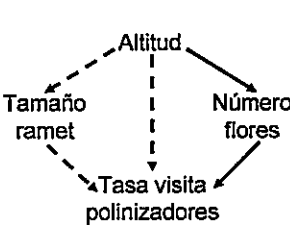
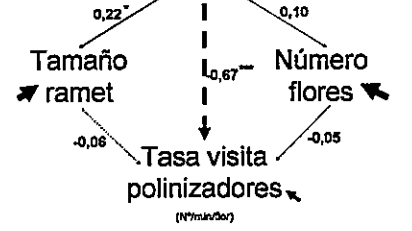
	Tasa visita polinizadores (n/min)	Tasa visita polinizadores (n/min/flor)	Altura ramet (m)	N° flores	Cobertura flores (%)	Cobertura vegetación (%)	Altura vegetación (m)	Densidad (ind/m2)	Altitud (msnm)
Tasa visita polinizadores (n/min)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Tasa visita polinizadores (n/min/flor)	0.86***	1	-	-	-	-	-	-	-
Altura ramet (m)	0.12	0.18 [*]	1	-	-	-	-	-	-
N° flores	0.26**	-0.09	-0.01	1	-	-	-	-	-
Cobertura flores (%)	-0.19 [*]	-0.16	0.02	0.02	1	-	-	-	-
Cobertura vegetación (%)	-0.30**	-0.33**	0.17	-0.06	0.28**	1	-	-	-
Altura vegetación (m)	0.19 [*]	0.24**	0.45****	0.05	-0.11	0.08	1	-	-
Densidad (ind/m2)	-0.16	-0.19 [*]	0.01	0.01	0.43****	0.30**	-0.12	1	-
Altitud (msnm)	-0.54****	-0.64****	-0.25 [*]	0.09	0.30**	0.54****	-0.27 [*]	0.28**	1

7.3.3 Relaciones entre la tasa de visita de polinizadores y los rasgos de ramets mediante SEM

En los modelos teóricos propuestos se determinó que los modelos evaluados sin la variable altitud (primero y segundo, Tabla 7) no ajustan, es decir, no se puede establecer la relación entre las variables dado que no existe un ajuste global óptimo para el modelo. Esto se suma a la evidencia aportada por el análisis de las Figuras 23 y 24, en las que se observa que el mayor efecto en la dispersión de los puntos entre el tamaño del ramet, el despliegue floral y la tasa de visita ocurre en presencia de la variable altitud.

En el caso del modelo teórico que incluye altitud (tercero, Tabla 7) se pudo ajustar tanto los SEM por cada sitio, Yerba Loca (YL) y Farellones (F), como el modelo que incluye todos los datos para ambas poblaciones. Si se observa los parámetros obtenidos para cada modelo ajustado en la Tabla 10, se puede determinar que el mejor modelo es el que incluye todos los datos a nivel de ramet en ambas poblaciones a la vez, con un valor observado de 0,94414 ampliamente mayor al de YL (Valor obs. = 0,32150) y F (Valor obs. = 0,78553). Por lo tanto, es necesario incluir la altitud para ajustar adecuadamente las variables morfológicas tamaño del ramet y tamaño del despliegue floral (número de flores) a la tasa de visita (visitante/min/flor).

Tabla 10: Modelos ajustados de las relaciones a nivel de ramets entre la tasa de visita de polinizadores, la altura del ramet y el número de flores, con y sin la presencia de la variable altitud.

Modelos teóricos	Modelos ajustados	Estimadores de los modelos
	No ajusta	Modelo YL sin altitud No ajusta
	No ajusta	Modelo F sin altitud No ajusta
		Ajuste modelo YL con altitud dentro de la población $\chi^2 = 0,98282$ Df = 1 Valor obs. = 0,32150 Bondad de ajuste = 0,98908 BIC = -2,8238
		Ajuste modelo F con altitud dentro de la población $\chi^2 = 0,074049$ Df = 1 Valor obs. = 0,78553 Bondad de ajuste = 0,9992 BIC = -3,7761
		Ajuste modelo YL+F con altitud $\chi^2 = 0,00491$ Df = 1 Valor obs. = 0,94414 Bondad de ajuste = 0,99997 BIC = -4,5169

El mejor modelo SEM ajustado, que incluye la altitud como fuente de variación y todos los ramets de ambas poblaciones, mostró los siguientes parámetros: χ^2 del modelo = 0,00491, Df = 1, valor observado = 0,94414. Índice de la bondad de ajuste = 0,99997. BIC= -4,5169. Estos parámetros indican un buen ajuste entre los datos observados y esperados y, por lo tanto, establece que las relaciones entre las variables concuerdan con la variabilidad presente en los datos (Figura 25).

Al evaluar a nivel de individuo todas las variables a la vez, mediante el ajuste de un modelo SEM, se encontró que en estas poblaciones el efecto de la altitud sobre la tasa de visita de los polinizadores por flor es negativo, es decir, decrece con la altitud. Cabe destacar que la magnitud del efecto directo de la altitud sobre la tasa de visita es la relación de mayor fuerza en todo el modelo incluyendo los efectos directos e indirectos (Tabla 11).

Por otra parte, la altitud tuvo un pequeño efecto sobre el tamaño del ramet en estas poblaciones, al igual que sobre el número de flores. Además, tanto el tamaño del ramet como el número de flores mostró un pequeño efecto sobre la tasa de visita de polinizadores a nivel de cada ramet.

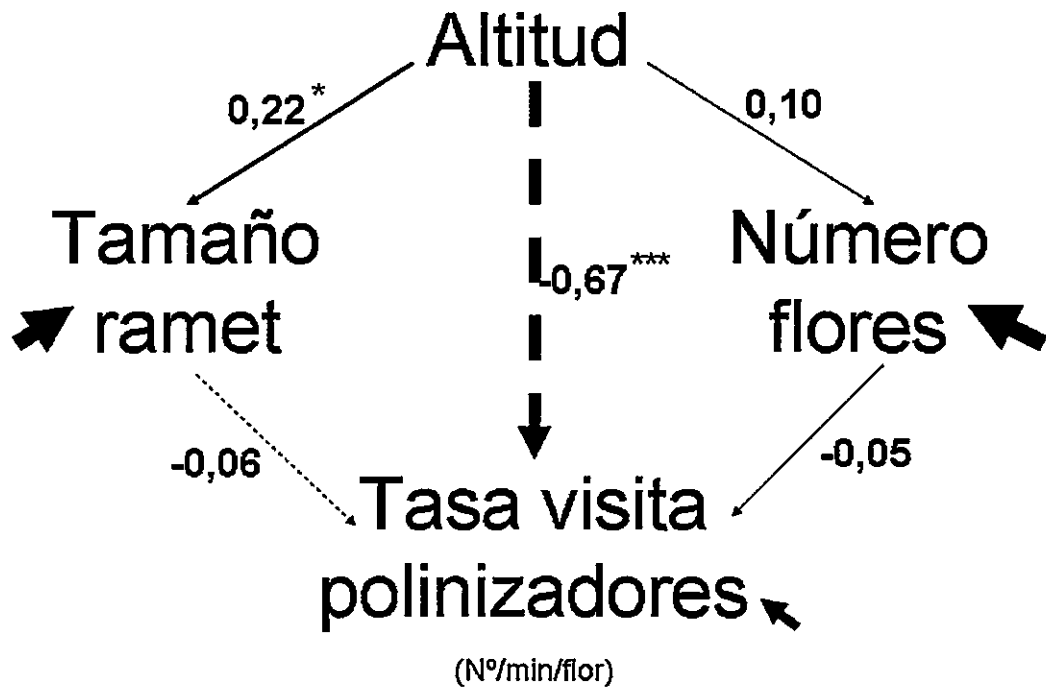


Figura 25: Diagrama de sistema de ecuaciones estructurales ajustado para los datos de tasa de visita de polinizadores a nivel de individuo. Las flechas representan las vías que relacionan las variables, el tamaño de éstas es proporcional al valor de la vía detallado a un costado de cada una. Las flechas segmentadas representan correlaciones negativas y las continuas correlaciones positivas entre las variables. Niveles de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 '.' 1.

Tabla 11: Descomposición de efectos directos (ED) e indirectos (EI) de la altitud sobre las variables tamaño del ramet, número de flores y la tasa de visita de polinizadores.

	Altitud ED	Tamaño ramet ED	Número flores ED	Altitud EI	Efecto total Altitud
Tamaño del ramet	0,22	-	-	-	0,22
Número de flores	0,1	-	-	-	-
Tasa de visita polinizadores	-0,67	-0,06	-0,05	-	-0,67

7.4 DISCUSIÓN

La tasa de visita/min/flor y la tasa promedio de visita de polinizadores por ramet, presentaron diferencias significativas entre los pisos altitudinales. Estas dos medidas difieren en que la última considera el número de flores, es decir, el tamaño del despliegue floral. Por otro lado, a nivel de cada ramet se observó una correlación positiva entre el número de flores y la tasa de visita (Nattero *et al.*, 2010), mostrando una variabilidad interna de las poblaciones que podría alterar el comportamiento de los visitantes (Barrett y Harder, 1996). Por su parte, la tasa de visita *per se* disminuye significativamente bajo y sobre el límite arbóreo de acuerdo a lo descrito por Arroyo *et al.* (1985).

La receptividad del estigma aumenta con la altitud, sin embargo, no es suficiente para equiparar la probabilidad de polinización entre los pisos bajo y sobre el límite arbóreo. A igual tamaño del despliegue floral y de la umbella, la longevidad floral podría compensar la disminución del servicio de polinización en el gradiente altitudinal (Primack, 1985; Biningham y Orthner, 1998). No obstante, se debe tener en consideración que tanto el desarrollo como la longevidad de las flores en *Alstroemeria*, están asociados a bajas concentraciones, endógenas o exógenas, de etileno (Wagstaff *et al.*, 2005), lo cual a su vez, está relacionado a plantas expuestas a estrés hídrico y a altas temperaturas (Taiz y Zeiger, 2006). Por ende, la variación de la longevidad floral en el gradiente altitudinal podría ser más que un rasgo mediado por la selección

de polinizadores, una respuesta fisiológica a condiciones ambientales, la cual tendría una consecuencia directa en la probabilidad de polinización. Esta disyuntiva se resolvería con un experimento de jardín común de *A. pallida* donde se pueda evaluar si la longevidad floral tiene un acervo genético u obedece a plasticidad fenotípica.

En cuanto a las variables ecológicas asociadas a los ramet estudiados, se observó un aumento de la cobertura de flores y de la cobertura de la vegetación que rodea a cada ramet sobre el límite arbóreo. La correlación fue negativa entre la cobertura de la vegetación y la tasa de visita. Se podría pensar que parches con mayor densidad de flores son más atractivos para los visitantes (Cavieres, 1998, 2000; Suárez *et al.*, 2009), sin embargo, a pesar de la variación altitudinal de esta variable, en este estudio no se observó una correlación con la tasa de visita. Del mismo modo, la densidad de ramet/m² (Cavieres, 1998) aumentó significativamente con la altitud, sin mostrar una fuerte correlación con la tasa de visita.

Al evaluar la interacción de todas las variables a la vez, a nivel de cada ramet, se puede examinar cuáles serían los mecanismos detrás de la variación en la tasa de visita y su relación con los rasgos de los ramets. Se observa, en el modelo de ecuaciones estructurales ajustado, que la altitud tiene una correlación fuertemente negativa con la tasa de visita por flor; sin embargo, los

rasgos de tamaño del ramet y del despliegue floral sólo tienen un pequeño efecto sobre la tasa de visita por flor. Si bien existe el fenómeno de la reducción de la tasa de visita con la altitud, la variación de los rasgos altura del ramet y número de flores, podría ser que éstos no contribuyan a atraer mayor cantidad de polinizadores en *Alstroemeria pallida*, a nivel de ramet, a diferencia de lo encontrado a nivel poblacional tanto en ésta como en otras especies en el gradiente altitudinal (Woorley *et al.* 2000; Totland, 2001; Arroyo *et al.*, 2006).

8. ROL DEL TAMAÑO DEL RAMET Y EL TAMAÑO DEL DESPLIEGUE FLORAL EN LAS TASAS DE FECUNDACIÓN CRUZADA POR RAMET EN *Alstroemeria pallida*.

Esta sección se enfocó en la evaluación del rol del tamaño del ramet y del despliegue floral en la tasa de fecundación cruzada de *A. pallida*, lo que corresponde al objetivo 5 que abarca el tema de la determinación de la tasa de autofecundación a nivel de ramet, mediante la extracción de aloenzimas.

8.1 Sitios de muestreo

Se recolectó semillas durante el período estival 2007-2008, en cuatro sitios que abarcan la distribución natural de la especie (Tabla 12). Las localidades fueron Guardia Vieja (GV), Camino La Disputada (CD), Farellones (F) y Valle Nevado (VN).

Tabla 12: Coordenadas geográficas, piso vegetacional y altitud (msnm) de sitios de muestreo para evaluación del rol del tamaño del ramet y el tamaño del despliegue floral en la tasa de fecundación cruzada de *A. pallida*.

Población	Piso altitudinal	msnm	Latitud	Longitud
Yerba Loca	Bajo el límite arbóreo	1.650	33°20'39,7"S	70°20'47,4"W
Camino La Disputada oriente	Bajo el límite arbóreo	1.700	33°17'36,3"S	70°21'12,6"W
Farellones	Sobre el límite arbóreo	2.550	33°20'49,2"S	70°18'11,8"W
Valle Nevado	Sobre el límite arbóreo	2.450	33°21'50,2"S	70°18'15,3"W

8.2 Método

8.2.1 Sistemas de apareamiento mixto y colecta de muestras

Los sistemas de apareamiento de las plantas, mayoritariamente hermafroditas, fluctúan entre la autofecundación y la fecundación cruzada de su descendencia (Barrett y Harder, 1996). Se ha propuesto el modelo de apareamiento mixto donde se obtiene una fracción de la progenie por autofecundación (s) y el resto derivado de cruzamientos al azar (t), pudiendo expresar la autofecundación como $s = 1 - t$.

A partir de este modelo se han desarrollado variaciones del modelo de apareamiento mixto original. Por ejemplo, Brown y Allard (1970) han demostrado que la descendencia materna puede inferirse de las matrices de descendencia, mientras que Shaw *et al.* (1980), y Ritland y Jain (1981) agregaron procedimientos con múltiples loci para la estimación de la polinización cruzada dado que los métodos multilocus tienen menor varianza estadística y una mayor robustez frente a la violación de los supuestos del modelo. Ritland (2002) propone una generalización del modelo para la estimación de sistemas de apareamiento usando n loci independientes.

Para estimar la tasa de autofecundación y fecundación cruzada en *A. pallida* se colectó 20 familias por población (15 semillas por cada ramet = una familia), lo

que dio un total de 1.200 semillas. *Alstroemeria pallida* posee una cápsula de dispersión por balacoria, por lo tanto, para la colección de semillas fue necesario embolsar los frutos en terreno posterior a la polinización abierta y antes de la madurez total (fines de enero), lo cual permitió obtener una muestra de semillas del tamaño adecuado garantizando la pertenencia de cada una a su familia. Los ramets fueron colectados una vez que las semillas fueron liberadas dentro de las bolsas de muselina (fines de febrero y marzo) determinando su altitud barométrica (msnm) y coordenadas geográficas.

8.2.2 Análisis morfométrico y muestreo de semillas

Los ramet fueron medidos en el laboratorio para determinar su tamaño (cm), y el número de flores y frutos. Las semillas colectadas fueron contadas y pesadas en una balanza precisión (Denver Instrument Company, modelo: AA-00DS).

Cada una de las variables morfométricas fue normalizada mediante la transformación de potencia (Box y Cox, 1964) y evaluada mediante análisis de varianza anidado, para observar si existe diferencia significativa. Posteriormente, todas las variables fueron correlacionadas en una matriz diagonal, aplicándose una prueba de correlación Pearson para evaluar la significancia de las correlaciones entre éstas.

8.2.3 Alloenzimas

En el laboratorio fueron analizadas 1.200 semillas mediante las alloenzimas ADH; PGI1, PGI2, GOT e IDH para determinar la tasa de autofecundación a nivel individual en las poblaciones a diferentes altitudes. El método utilizado fue adaptado de lo propuesto por Soltis y Soltis (1989) y se describe a continuación:

8.2.3.1 Extracción de alloenzimas de las semillas

Las semillas fueron remojadas en cuatro gotas de agua por 12 horas, luego se trituraron mecánicamente y fueron molidas en morteros con tres gotas de Buffer de extracción (Dithiothreitol). Con cintas de papel de tres milímetros, de dos grosores diferentes fueron absorbidas las proteínas de cada semilla y posteriormente colocadas en los geles para electroforesis.

8.2.3.2 Confección y electroforesis de geles para alloenzimas

La preparación de los geles se realizó con dos Buffers (LiOH 14%, pH 7 e Histidina, pH 6,5), los cuales fueron los medios de disolución para el almidón preparado en ciclos de agitación variables de 30 a 15 segundos en microondas. Las burbujas de los geles fueron removidas empleando una bomba de vacío. Los geles fueron almacenados por 12 horas en un refrigerador a 4°C antes de utilizarlos.

Los segmentos de papel con el Buffer de extracción fueron instalados en los geles para electroforesis con un marcador de color verde en uno de los

costados de las muestras. Los geles se sometieron a un gradiente eléctrico donde las proteínas migraron de acuerdo a su carga (LiOH a 60mA e Histidina 45mA).

8.2.3.3 Revelado y tinción de geles de aloenzimas

Cada gel contuvo una muestra de entre 40 y 45 semillas. Los geles se cortaron longitudinalmente en su alto, de modo tal que se obtuvo 5 a 6 réplicas que fueron teñidas con diferentes marcadores aloenzimáticos (ADH; PGI1, PGI2, GOT, IDH). El revelado de los geles se realizó en estufa a una temperatura de 45°C por 10 a 25 minutos dependiendo de la enzima. Los geles donde estuvo revelada la posición de la migración de las enzimas fueron analizados en una placa luminosa y fotografiados. Los resultados fueron recopilados en matrices de datos para posteriormente ser analizados.

8.2.3.4 Estimación de las tasas de la fecundación cruzada

Con las observaciones de las fotografías de los geles teñidos se confeccionó una matriz de caracteres de las familias presentes en cada población. Se computó la tasa de fecundación cruzada (t_m) utilizando los datos moleculares resumidos en la matriz tanto a nivel de cada ramet como de las cuatro poblaciones estudiadas utilizando el programa MLTR (Ritland, 2002).

8.2.4 Interrelación de las variables morfométricas y la tasa individual de fecundación cruzada

El análisis del sistema biológico se realizó mediante sistemas de ecuaciones estructurales (SEM) (e.g. Mitchell, 1992; Sapir, 2009) para dilucidar cuál o cuáles variables morfológicas explican la tasa de fecundación cruzada. Esto permitió evaluar la relevancia de las variables morfológicas en la tasa de fecundación cruzada para cada ramet, computado en R (Development Core Team, 2011). Los estimadores utilizados fueron los mismos descritos en el punto 6.2.2.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Patrones altitudinales de la tasa de fecundación cruzada

La tasa de fecundación cruzada promedio (t_m) fue de 0,741 bajo el límite arbóreo y de 0,764 sobre el límite arbóreo; el análisis de varianza anidado no mostró diferencias significativas con el cambio altitudinal (Figura 26). Las diferencias entre las poblaciones dentro de cada piso fueron débilmente significativas (Tabla 14). Al calcular los componentes de varianza se obtuvo que la variación entre los pisos altitudinales explica un 2,3%, en cambio la variación entre las poblaciones aporta un 4,8%.

La tasa de fecundación cruzada promedio (t_m) de las poblaciones de menor altitud (1.650 msnm) fue 0,8462 en Yerba Loca y 0,6297 en Camino La Disputada. En el caso de las poblaciones de mayor altitud (2.500 msnm) los valores promedio observados fueron 0,7430 en Farellones y 0,7844 en Valle Nevado (Figura 26) sin encontrar diferencias entre las poblaciones de abajo y arriba del límite arbóreo (Tabla 13).

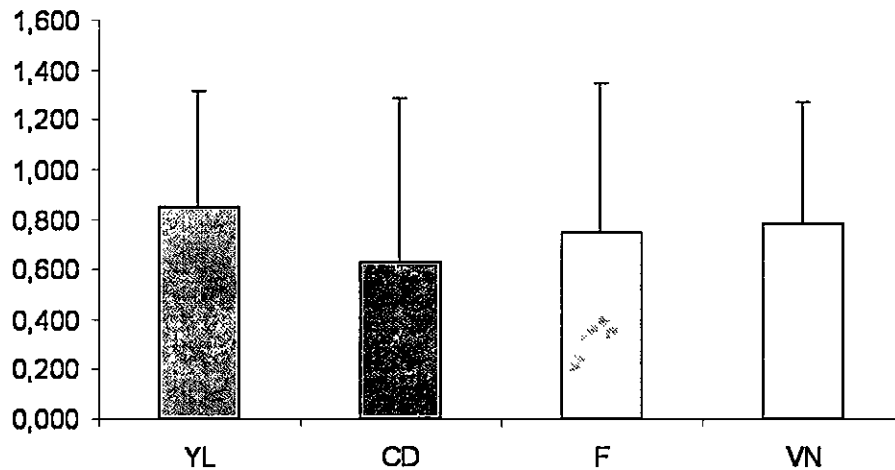


Figura 26: Tasa de fecundación cruzada (tm) en dos poblaciones a 1.650 msnm (gris-sólido): Yerba Loca (YL) y Camino La Disputada (CD) y dos poblaciones a 2.500 msnm (gris-achurado): Farellones (F) y Valle Nevado (VN). Las barras representan dos desviaciones estándar.

8.3.2 Rasgos reproductivos y vegetativos del ramet

El número promedio de flores por ramet fue de 5,5 y 3,8 en el piso altitudinal bajo y alto respectivamente (Tabla 13), disminuyendo significativamente con la altitud. También varió significativamente entre las poblaciones de cada piso (Tabla 14). Los componentes de varianza mostraron que la variación entre los pisos vegetacionales explica un 0,8%, en cambio la variación entre las poblaciones aporta un 20,5%.

El número promedio de frutos por ramet fue de 4,3 en los sectores bajos y de 3,4 en las zonas altas, disminuyendo significativamente entre ambos pisos

(Tabla 13). Entre las poblaciones de cada piso también se encontró diferencias significativas (Tabla 14). Los componentes de varianza mostraron que la variación entre los pisos vegetacionales explica un 4,9%, en cambio la variación entre las poblaciones aporta un 8,4%.

El porcentaje de formación de frutos del total de flores de cada ramet presentó valores de 85,5% en las zonas bajo el límite arbóreo y 91,1% en las zonas de mayor altitud (Tabla 13) sin mostrar diferencias significativas entre los pisos altitudinales. Entre las poblaciones dentro de cada piso se presentaron diferencias significativas (Tabla 14). Los componentes de varianza mostraron que la variación entre los pisos vegetacionales explica un 9,1%, en cambio la variación entre las poblaciones aporta un 29,7%.

El número promedio de semillas viables por ramet fue de 41 y 40 en el piso altitudinal bajo y alto respectivamente (Tabla 13), sin observarse diferencias significativas. En cambio, entre las poblaciones dentro de cada piso se obtuvo diferencias significativas (Tabla 14). La varianza explicada por piso fue de un 5,4% y por las poblaciones de un 14,1%.

El porcentaje de semillas viables por ramet fue de 90% en las zonas de baja altitud y de 93% en las zonas de altura (Tabla 13), sin obtenerse diferencias

significativas entre los pisos altitudinales. La variabilidad aportada por las poblaciones dentro de cada piso tampoco fue significativa (Tabla 14).

El peso promedio de una semilla viable por ramet fue de 0,0168 g y 0,0171 g para el piso bajo y alto respectivamente (Tabla 13). El análisis de varianza anidado no encontró diferencias significativas aportadas por los pisos vegetacionales, en cambio mostró que la variabilidad entre las poblaciones dentro del piso fue significativa explicando un 13% de la varianza. (Tabla 14).

El tamaño promedio del ramet presentó valores de 16,8 cm y 10,1 cm para el piso bajo y alto respectivamente (Tabla 13) disminuyendo significativamente con la altitud. La variabilidad aportada por las poblaciones no fue significativa (Tabla 14). Al calcular los componentes de varianza se observó que la variación entre los pisos vegetacionales explica un 22,6% de la variabilidad.

Tabla 13: Tasa de fecundación cruzada multialélica (tm) y rasgos del ramet.

Variable	n (familias)	Piso altitudinal	Población	Promedio	Desviación estándar
Tasa de fecundación cruzada (tm)	20	Arriba	F	0,7430	0,2998
	21		VN	0,7844	0,2426
	21	Abajo	YL	0,8462	0,2344
	20		CD	0,6297	0,3262
Número de flores	19	Arriba	F	3,8	0,9
	21		VN	3,7	0,7
	21	Abajo	YL	7,1	3,1
	20		CD	3,8	0,9
Número de frutos	19	Arriba	F	3,7	0,7
	21		VN	3,1	0,9
	21	Abajo	YL	4,9	2,3
	20		CD	3,8	0,9
Porcentaje de formación de frutos del total de flores	20	Arriba	F	98	7
	21		VN	85	19
	21	Abajo	YL	73	20
	20		CD	99	4
Número de semillas viables	20	Arriba	F	48,9	18,9
	21		VN	31,1	14,9
	21	Abajo	YL	48,2	30,2
	20		CD	33,0	12,1
Porcentaje de semillas viables	20	Arriba	F	94	13
	19		VN	93	13
	16	Abajo	YL	88	14
	5		CD	96	4
Peso promedio semilla	20	Arriba	F	0,019	0,003
	21		VN	0,016	0,004
	21	Abajo	YL	0,015	0,004
	20		CD	0,019	0,003
Altura total ramet	19	Arriba	F	9,7	3,3
	21		VN	10,6	3,9
	21	Abajo	YL	15,5	4,9
	20		CD	18,3	8,5

Tabla 14: Análisis de varianza anidado de la tasa de fecundación cruzada multialélica (tm) y los rasgos morfométricos de *Alstroemeria pallida* en dos pisos altitudinales.

Niveles de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

Variables	Nivel de anidamiento	Grados de libertad	F	p-value
Tasa de fecundación cruzada (tm)	piso	1	0.0978	7.6E-01
	piso:pob	2	3.0819	5.2E-02 .
Número de flores	piso	1	12.554	6.8E-04 ***
	piso:pob	2	11.408	4.6E-05 ***
Número de frutos	piso	1	11.6018	1.1E-03 **
	piso:pob	2	4.8633	1.0E-02 *
Porcentaje de formación de frutos del total de flores	piso	1	2.5248	1.2E-01
	piso:pob	2	20.3922	7.8E-08 ***
Número de semillas viables	piso	1	0.0127	9.1E-01
	piso:pob	2	7.9819	7.0E-04 ***
Porcentaje de semillas viables	piso	1	1.8884	1.7E-01
	piso:pob	2	1.1025	3.4E-01
Peso promedio semilla	piso	1	0.1443	7.1E-01
	piso:pob	2	7.3074	1.2E-03 **
Altura total ramet	piso	1	36.0885	5.9E-08 ***
	piso:pob	2	0.9128	4.1E-01

8.3.3 Relaciones a nivel de individuo de la tasa de fecundación cruzada y los rasgos morfométricos

Al analizar la matriz de correlaciones entre la tasa de fecundación cruzada (t_m) a nivel de ramet, y todos los rasgos morfométricos, tanto reproductivos como vegetativos, se observó que la mayoría de las correlaciones son negativas. No obstante, se observó una correlación positiva significativa entre t_m y el tamaño del despliegue floral, es decir, la tasa de fecundación cruzada aumentó con el mayor número de flores presentes en un ramet. La relación entre t_m y el número de frutos también resultó positiva, lo cual podría indicar que los individuos que tienen más flores, también tienen más frutos, como se observa en la Tabla 15. La correlación positiva más fuerte se observó entre el número de flores y frutos.

El número de semillas viables se mostró positivamente correlacionado con el número de flores y frutos, siendo esta última relación la de mayor magnitud. Cabe destacar que ramets de mayor altura (cm) estuvieron correlacionados con mayor número de semillas viables (Tabla 15).

La altitud mostró correlaciones negativas y significativas con el número de flores y frutos, y la altura total del ramet (cm), es decir, a medida que aumenta la altitud estas variables decrecen (Tabla 15).

Tabla 15: Matriz de correlaciones entre las siguientes variables: tasa de fecundación cruzada (tm), número de flores, número de frutos, número de semillas viables, peso promedio de una semilla, tamaño del ramet (cm) y altitud (msnm) asociadas a los ramet evaluados en dos poblaciones a 1.650 msnm: Yerba Loca (YL), Camino La Disputada (CD) y dos poblaciones a 2.500 msnm: Farellones (F) y Valle Nevado (VN). Niveles de significancia: 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1

	Tasa de fecundación cruzada (tm)	Número de flores	Número de frutos	Número de semillas viables	Peso promedio semilla	Altura total ramet	Altitud
Tasa de fecundación cruzada (tm)	1	-	-	-	-	-	-
Número de flores	0.28 **	1	-	-	-	-	-
Número de frutos	0.24 *	0.80 ***	1	-	-	-	-
Número de semillas viables	0.12	0.33 **	0.47 ***	1	-	-	-
Peso promedio semilla	0.13	-0.09	-0.07	0.22 *	1	-	-
Altura total ramet	0.11	0.16	0.26 *	0.29 **	0.20 *	1	-
Altitud	0.01	-0.41 ***	-0.30 **	0.03	0.11	-0.51 ***	1

Un análisis integrado de estas correlaciones se muestra al examinar las variables en su conjunto en un modelo de ecuaciones estructurales (SEM). El mejor SEM ajustado es el representado en la Figura 27, el cual obtuvo los siguientes parámetros: χ^2 del modelo= 0,08053, Df= 1, valor observado= 0,77658. Índice de la bondad de ajuste= 0,9947. BIC= -4,4413. Con este

modelo, a nivel global, la altitud tuvo un efecto negativo importante sobre el tamaño del ramet y el número de flores. A su vez, se observó una relación negativa entre la altitud y el número de frutos, sin embargo, esta última fue pequeña en magnitud.

El tamaño del ramet y el número de flores contribuyeron positivamente a la variación de las tasas de fecundación cruzada (t_m), sin embargo, el efecto de mayor magnitud sobre t_m fue del número de flores. El número de frutos se relacionó negativamente con t_m , pero la magnitud de la vía asociada fue pequeña. La altitud tuvo un efecto positivo moderado sobre la tasa de fecundación cruzada, siendo el número de flores la variable más relevante en el caso de t_m (Figura 27).

El tamaño del ramet se relacionó positivamente con el número de frutos, es decir, plantas de mayor tamaño producirían más frutos. Cabe destacar que la relación más fuerte dentro de este SEM fue entre el número de flores y frutos, siendo ésta positiva, lo cual indicaría que a mayor número de flores, mayor número de frutos (Figura 27).

Al agregar tanto los efectos directos como los indirectos de la altitud sobre t_m se observa un gran efecto positivo. A su vez, se aprecia un fuerte efecto negativo de la altitud sobre el tamaño del ramet, el número de flores y de frutos (Tabla 16).

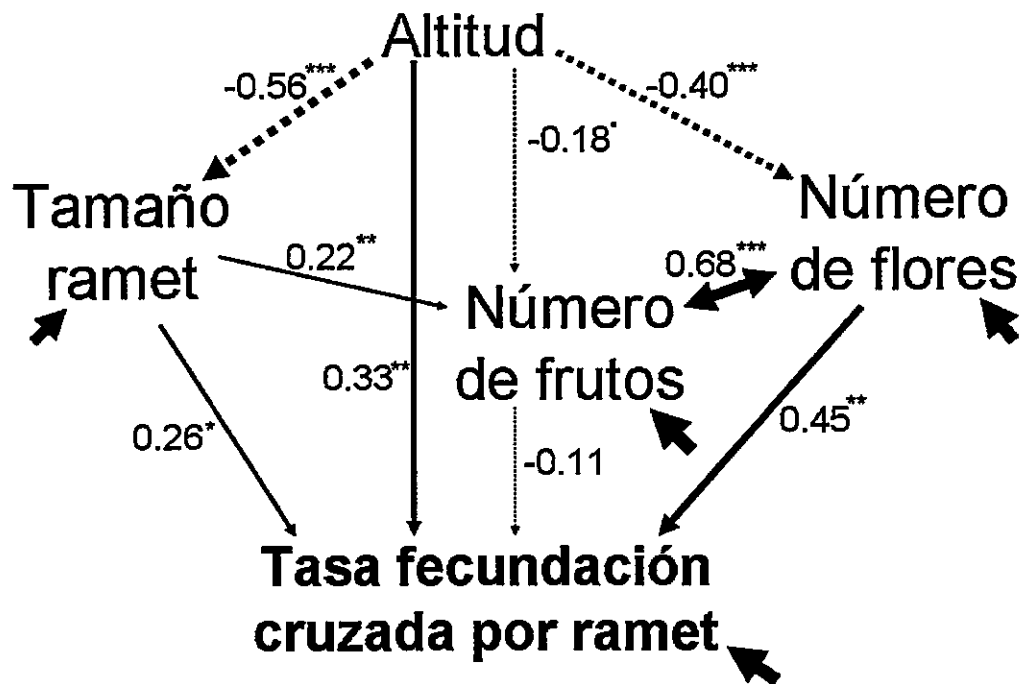


Figura 27: Diagrama de sistema de ecuaciones estructurales de tasa de fecundación cruzada con las variables morfométricas asociadas a nivel ramet. Los valores de las vías son el resultado de SEM estimado a través de correlaciones. Las flechas continuas son relaciones proporcionales entre las variables, y las discontinuas son relaciones inversamente proporcionales. Niveles de significancia: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 '' 1.

Tabla 16: Descomposición de efectos directos (ED) e indirectos (EI) de la altitud sobre las variables morfométricas y la tasa de fecundación cruzada.

	Altitud ED	Tamaño ramet ED	Número flores ED	Número de frutos ED	Altitud EI	Efecto total Altitud
Tamaño del ramet	-0,56	-	-	-	-	-0,56
Número de flores	-0,40	-	-	0,68	-0,12	-0,52
Número de frutos	-0,18	0,22	0,68	-	-0,27	-0,45
Tasa fecundación cruzada	0,33	0,26	0,45	-0,11	0,19	0,52

8.4 DISCUSIÓN

La tasa de fecundación cruzada (t_m) no muestra diferencias significativas entre los pisos altitudinales ni entre las poblaciones, con altos valores de fecundación cruzada en altura (e.g. 0,764). Sin embargo, al calcular el aporte a la varianza del piso y las poblaciones se obtiene alrededor de un 7% de la varianza explicada. Esto sugiere que existen otras variables que podrían estar explicando mejor la variación de t_m . Por otra parte, dados estos valores de t_m , se podría inferir que no existe restricción para la fecundación cruzada a pesar de la disminución de los visitantes en el gradiente altitudinal, descrita por Arroyo *et al.* (1985). Esto concuerda con lo encontrado por Ægisdóttir *et al.*, (2009) en poblaciones alpinas aisladas de *Campanula thyrsoides*, las que presentaron altos niveles de diversidad genética y fecundación cruzada.

El porcentaje de formación de frutos del total de flores fue superior al 70% en todas las poblaciones, siendo mayor el porcentaje promedio en las zonas altas. El número de semillas viables por ramet no presentó diferencias significativas entre los pisos pero si entre las poblaciones, mientras que el porcentaje de semillas viables no mostró diferencias significativas entre los pisos ni entre poblaciones dentro de cada piso. Cabe destacar que el porcentaje promedio de semillas viables fue relativamente alto, con un valor aproximado de 90%. Estos valores confirman que, si bien la tasa de visita de polinizadores decrece con la

altitud (Arroyo *et al.*, 1985), el número de visitas y la calidad de éstas serían suficientes para fecundar la mayoría de los óvulos y para no generar diferencias en las tasas de fecundación cruzada (t_m) tanto bajo como sobre el límite arbóreo, pese a las contrastantes condiciones ecológicas.

A nivel de ramet, se observa correlaciones positivas entre t_m y el tamaño del despliegue floral, lo que coincide con lo reportado por French *et al.* (2005). Además se observó que ramets con más flores producen más frutos, lo cual indicaría que los ramets más grandes, en tamaño, presentan más flores y frutos, no existiendo un compromiso entre estos rasgos. Por su parte, el número de semillas viables está positivamente relacionado tanto con el número de flores (Herrera, 1993; Arroyo *et al.*, 2006) como de frutos.

Los ramets de mayor tamaño también producen mayor cantidad de semillas viables. Existen dos alternativas que podrían explicar estas relaciones: (i) los ramets más grandes producen más estructuras reproductivas y semillas o (ii) en el micrositio donde se desarrolla el ramet de mayor tamaño existe una mejor disponibilidad de recursos para el desarrollo del ramet en general.

Al evaluar la interacción de todas las variables a la vez, a nivel de cada ramet, se puede examinar cuáles podrían ser los mecanismos detrás de la variación en la tasa de fecundación cruzada y su relación con los rasgos de los ramets.

Tanto el tamaño de ramet como el despliegue floral disminuyen significativamente con la altitud y a su vez, influyen positivamente sobre la tasa de fecundación cruzada, siendo el tamaño del despliegue floral (número de flores) la variable directa que afecta en mayor magnitud la tasa de fecundación cruzada.

9. CONCLUSIONES GENERALES

La dinámica de los sistemas de interacción planta - polinizador se describe como relaciones complejas; con restricciones que actúan a diferentes niveles: ecológicos, genéticos, del desarrollo y de diseño de los organismos involucrados. Estas limitantes pueden obedecer tanto a factores actuales como históricos.

Dada esta heterogeneidad, se han propuesto los ambientes de montaña como propicios para evaluar en un contexto de "experimento natural", la evolución de rasgos que permiten a las plantas adaptadas a la fecundación cruzada sobrevivir en ambientes con restricción de vectores de polinización. En tal caso, la presente investigación se planteó como supuesto la disminución del servicio de polinización en el gradiente altitudinal bajo y sobre el límite arbóreo a nivel intraespecífico.

El presente trabajo busca entender los mecanismos a nivel del ramet que le permitirían a *Alstroemeria pallida* responder a los distintos niveles de servicio de polinización entre dos pisos altitudinales. Verificando el supuesto de la disminución del servicio de polinización a nivel comunitario en los altos Andes (Arroyo *et al.*, 1985), se encontró, para la especie focal *Alstroemeria pallida*, que la tasa de visita/minuto/flor decrece con la altitud, por lo tanto, se verifica el

supuesto de restricción del servicio de polinización. Las diferencias son significativas incluso calculando la tasa de visita por ramet.

Sin embargo, la receptividad del estigma por flor promedio aumentó con la altitud de acuerdo con lo encontrado por Primack (1985). Calculando el tiempo total de exposición a polinizadores de cada flor, es decir, la tasa de visita promedio (visitantes/min/flor) por la receptividad promedio del estigma, para evaluar si el aumento de la receptividad del estigma compensaría la disminución en la tasa de visita en el gradiente como proponen Biningham y Orthner (1998). Se encontró que a pesar que el piso altitudinal sobre el límite arbóreo tiene un tiempo de receptividad más prolongado, este incremento no es suficiente para compensar la disminución del tiempo total de exposición a polinizadores dada la gran diferencia entre las tasas de visita de ambos pisos.

El tamaño del despliegue floral (número de flores) no presenta un patrón de variación significativo ni entre los pisos ni entre las poblaciones. Sin embargo, al analizarlo a nivel de ramet, presenta una relación positiva con el área de la umbella, es decir, ramets con más flores también poseen mayor tamaño de la umbella (cm²). El tamaño del despliegue floral se relaciona positivamente con la tasa de fecundación cruzada (Brunet y Sweet, 2006), pero a nivel de ramet no está asociada con la tasa de visita de polinizadores. Una posible explicación podría ser que estos rasgos actuarían como señales para polinizadores más

eficientes, es decir, no atraerían un mayor número de visitantes, sino más bien incrementarían la calidad de las visitas (Binningham y Orthner, 1998).

Por otra parte, la variación en el tamaño del ramet (cm) se relaciona fuertemente con la altura de la cobertura que rodea a cada ramet, lo cual podría indicar un efecto del sitio donde habita *A. pallida*, más que un efecto compensatorio para la disminución en el servicio de polinización.

En general, se observa que ramets más grandes producen más flores y frutos, los cuales presentan una alta tasa de fecundación cruzada. Esto indicaría que los ramets que presentan mayor vigor en su desarrollo, también tienen mayor éxito reproductivo, a pesar de la disminución del servicio de polinización con la altitud. En relación a la hipótesis de aumento de la probabilidad de la polinización (APP), si bien se encontró que el servicio de polinización disminuye en el gradiente altitudinal, éste es suficiente para la formación de frutos por fecundación cruzada. Esto podría sugerir que la variabilidad de los distintos rasgos morfométricos y reproductivos dentro del gradiente altitudinal de Los Andes de Chile Central, no actuarían directamente sobre el éxito reproductivo de *Alstroemeria pallida*, sino más bien podrían estar obedeciendo a distintas condiciones ambientales (Herrera, 1993), ecológicas e inclusive a su historia evolutiva. No obstante, la nula variación en las tasas de fecundación cruzada, no podría descartar que algunos rasgos pudieran estar actuando para favorecer

la polinización cruzada mediante vectores bióticos en el piso altitudinal alto, donde existe una disminución del servicio de polinización, sugiriendo una mayor atracción a polinizadores más eficientes (Kearns, 1992).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abrol, D.P., Kapil, R.P. 1986. Factors affecting pollination activity of *Megachile lanata* lepel. Proceedings of Indian Academy of Science. Animal Science 95: 757-769.
- Aizen, M., Basilio, E. 1995. Within and among flower sex-phase distribution in *Alstroemeria aurea* (*Alstroemeriaceae*). Canadian Journal of Botany 73: 1986-1994.
- Amigo, J., Ramírez, C. 1998. A bioclimatic classification of Chile: woodland communities in the temperate zone. Plant Ecology 136(1): 9-26.
- Arroyo, M.T.K., Squeo, F. 1990. Relationship between plant breeding systems and pollination. En: Kawano, S. (Ed.). Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants. Academic Press, Londres. pp 205-227.
- Arroyo, M.T.K., Uslar, P. 1993. Breeding systems in a temperate mediterranean-type climate montane sclerophyllous forest in central Chile. Botanical Journal of Linnean Society 111: 83-102.
- Arroyo, M.T.K., Armesto, J., Villagrán, C. 1981. Plant phenological patterns in the high Andean Cordillera of Central Chile. Journal of Ecology 69: 205-233.
- Arroyo, M.T.K., Primack, R., Armesto, J. 1982. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. American Journal of Botany 69(1): 82-97.

- Arroyo, M.T.K., Armesto, J., Primack, R. 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. II. Effect of temperature and visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution* 149: 187-203.
- Arroyo, M.T.K., Muñoz, M.S., Henríquez, C., Till-Bottraud, I., Pérez, F. 2006. Erratic pollination, high selfing levels and their correlates and consequences in an altitudinally widespread above-tree-line species in the high Andes of Chile. *Acta Oecologica* 30: 248-257.
- Arroyo, M.T.K., Till-Bottraud, I., Torres, C., Henríquez, C., Martínez, J. 2007. Display size preferences and foraging habits of high Andean butterflies pollinating *Chaetanthera lycopodioides* (Asteraceae) in subnival of central Chilean Andes. *Artic, Antarctic and Alpine Research* 39: 347-352.
- Ægisdóttir, H., Kuss, P., Stöcklin, J. 2009. Isolated populations of a rare alpine plant show high genetic diversity and considerable population differentiation. *Annals of Botany* 104: 1313–1322.
- Barrett, S.C.H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3: 335-341.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H., Harder, L.D. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 73-79.

- Bauert, M.R. 1996. Genetic diversity and ecotypic differentiation in arctic and alpine populations of *Polygonum viviparum*. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* 28: 190-195.
- Bayer, E. 1987. Die gattung in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung. München* 24: 1-362.
- Bell, G. 1985. On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 224(1235): 223-265.
- Bell, J.M., Karron, J.D., Mitchell, R.J. 2005. Interspecific competition for pollination lowers seed production and outcrossing in *Mimulus ringens*. *Ecology* 86: 762-771.
- Bergman, P., Molau, U., Holmgren, B. 1996. Micrometeorological impacts on insects activity and plant reproductive success in an alpine environment, Swedish Lapland. *Arctic and Alpine Research* 28(2): 196-202.
- Billings, W. 1974. Arctic and alpine vegetation: plant adaptation to cold summer climates. En: Ives, J., Barry, R. (Eds.). *Arctic and Alpine Environments*. Methuen, London. pp 403-443.
- Billings, W., Mooney, H. 1968. The ecology of arctic and alpine plants. *Biological Review* 43: 481-529.
- Bliss, L. 1971. Arctic and alpine plant life cycle. *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 405-438.

- Bliss, L. 1985. Alpine. En: Billings, W.D., Mooney, H.A. (Eds.). *Physiological ecology of North American plant terrestrial communities*. Chapman & Hall, New York. pp 41-65.
- Bingham, R.A., Orthner, A.R. 1998. Efficient pollination of alpine plants. *Nature* 391: 238-239.
- Box, G.E.P., Cox, D.R. 1964. An analysis of transformations (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society B* 26: 211-252.
- Brown, A.H.D., Allard, R.W. 1970. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphisms. *Genetics* 66: 133-145.
- Brunet, J. Sweet, H. 2006. Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution* 60(2): 234-246.
- Cabrera, M. 2002. Respuestas ecofisiológicas de plantas en ecosistemas de zonas con clima mediterráneo y ambientes de altamontaña. *Revista Chilena de Historia Natural* 75(3): 625-637.
- Canavos, G. 1988. *Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos*. Mc Graw Hill, México. 651 pp.
- Cariveau, D. Irwin, R. Brody, A. Sevillano Garcia-Mayeya, L. Von Der Ohe, A. 2004 Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104(1): 15-26.

- Cavieres, L. 1998. Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham (*Amaryllidaceae*). *Gayana Botánica* 55(1): 1-10.
- Cavieres, L. 1999. Bancos de semillas persistentes: modelos de germinación retardada de semillas y su aplicación en ambientes alpinos. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 457-466.
- Cavieres, L. 2000. Variación morfológica de *Phacelia secunda* J. F. Gmel. (*Hydrophyllaceae*) a lo largo de un gradiente altitudinal en Chile central. *Gayana Botánica* 57(1): 89-96.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. 1997. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.
- Chittka, L. Raine, N. 2006. Recognition of flowers by pollinators, *Current Opinion in Plant Biology* 9(4): 428-435.
- Conner, J. Rush, S. 1996 Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 105(4): 509-516.
- Di Castri, F., Hajek, E.R. 1976. Bioclimatología de Chile. Santiago, Chile, Vicerrectoría Académica de la Universidad Católica de Chile.
- Eckert, C.E., Barrett, S.C.H. 1994. Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (Lythraceae): Population-genetic and experimental analyses. *Evolution* 48(4): 952-964.

- Eckert, C.G., Ozimec, B., Herlihy, C.R., Griffin, C.A., Routley, M.B. 2009. Floral morphology mediates temporal variation in the mating system of a self-compatible plant. *Ecology* 90: 1540-1548.
- Engel, E.C. Irwin, R. 2003. Linking pollinator visitation rate and pollen receipt. *American Journal of Botany* 90(11): 1612–1618.
- Fabbro, T., Körner, C. 2004. Altitudinal differences in flower traits and reproductive allocation. *Flora* 199: 70-81.
- Font Quer, P. 1993. *Diccionario de Botánica Tomo I*. Ed. Labor S.A, Barcelona. 607 pp.
- Fox, J. 2006. Structural equation modeling with the SEM package in R. *Structural Equation Modeling* 13: 465-486.
- French, G.C., Ennos, R.A., Silverside, A.J., Hollingswoth, P.M. 2005. The relationship between flower size, inbreeding coefficient and inferred selfing rate in British *Euphrasia* species. *Heredity* 94: 44-51.
- García-Camacho, R., Totland, O. 2009. Pollen limitation in the alpine: a meta-analysis. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 41(1): 103–111.
- Germino, M., Smith, W. 2000. Differences in Microsite, Plant Form, and Low-Temperature Photoinhibition in Alpine Plants. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 32(4): 388-396.
- Grace, J. 2006. *Structural equation modeling and natural systems*. Cambridge University Press. 378p.

- Hagerup, O. 1951. Pollination in the Faroes—in spite of rain and poverty of insects. *Biologiske Meddelelser Kongelige Danske Videnskabernes Selskap*, 18: 1-48.
- Harder, L.D., Aizen, M.A. 2010. Floral adaptation and diversification under pollen limitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 365: 529-543.
- Harder, L.D., Johnson, S.D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist* 183: 530-545.
- Hegland, S.J., Totland, O. 2005. Relationships between species' floral traits and pollinator visitation in a temperate grassland. *Oecologia* 145(4): 586-594.
- Herlihy, C.R., Eckert, C.G. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature* 416: 320-323.
- Herrera, C. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63(3): 251-275.
- Irwin, 2006. The consequences of direct versus indirect species interactions to selection on traits: pollination and nectar robbing in *Ipomopsis aggregata*. *The American Naturalist* 167(3): 315-328.
- Irwin, R., Lynn, E., Adler, S., Brody, A. 2004. The dual role of floral traits: pollinator attraction and plant defense. *Ecology* 85(6): 1503–1511.

- Jolls, C. 1980. Phenotypic patterns of variation in biomass allocation in *Sedum lanceolatum* Torr. At four elevational sites in the Front Range, Rocky Mountains, Colorado. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107: 65-70.
- Kameyama, K., Kudo, G. 2009. Flowering phenology influences seed production and outcrossing rate in populations of an alpine snowbed shrub, *Phyllodoce aleutica*: effects of pollinators and self-incompatibility. *Annals of Botany* 103: 1385-1394.
- Kearns, C.A. 1992. Anthophilous fly distribution across an elevation gradient. *American Midland Naturalist* 127(1): 172-182.
- Kearns, C., Inouye, D. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado, USA.
- Klinkhamer, P., de Jong, T., de Bruyn, G-J. 1989. Plant size and pollinator visitation in *Cynoglossum officinale*. *Oikos* 54(2): 201-204.
- Klinkhamer, P., de Jong, T. 1993. Phenotypic gender in plants: Effects of plant size and environment on allocation to seeds and flowers in *Cynoglossum officinale*. *Oikos* 67(1): 81-86.
- Klinkhamer, P., de Jong, T., Metz, J. 1994. Why plants can be too attractive. A discussion of measures to estimate male fitness. *Journal of Ecology* 82(1): 191-194.
- Körner, C. 2003. *Alpine plant life*. 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. 344 p.

- Körner, C. 2007. The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22(11): 569-574.
- Loehlin, J. 2004. *Latent variable models. An introduction to factor, path, and structural equation analysis.* Lawrence Erlbaum Associates Publishers, New Jersey, USA. 330 p.
- Luebert, F. y Pliscoff, P. 2006. *Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile.* Editorial Universitaria, Santiago. 316 p.
- Manuel, N., Cornic, G., Aubert, S., Choler, P., Bligny R., Heber U. 1999. Protection against photoinhibition in the alpine plant *Geum montanum* *Oecologia* 119(2): 149-158.
- Marco, D., Arroyo, M.T.K. 1998. The breeding system of *Oxalis squamata*, a tristylous South American species. *Botany Acta* 111: 497-504.
- McGraw, J., Vavrek, M. 1989. The rol of buried viable seeds in arctic and alpine plant communities. En: Leck, M.A., Parker, V., Simpson, R. (Eds.). *Ecology of Soils Seed Banks.* Academic Press, San Diego, USA. pp 91-105.
- Medel, R. Botto-Mahan, C. Arroyo, MTK.. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology* 84: 1721-1732.
- Mitchell, R.J. 1992. Testing evolutionary and ecological hypotheses using path analysis and structural equation modelling. *Functional Ecology* 6(2): 123-129.

- Mitchell, R.J. 1994. Effects of floral traits, pollinator visitation, and plant size on *Ipomopsis aggregata* fruit production. *The American Naturalist* 143(5): 870-889.
- Moeller, D., Geber, M. 2005. Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution* 59: 786–799.
- Mosquin, T. 1966. Reproductive specialization as a factor in the evolution of the Canadian flora. En: Taylor, R., Luwdwig, R. (Eds.). *The Evolution of Canada's Flora*. University of Toronto Press, Toronto. pp 41-63.
- Muñoz, M., Moreira, A. 2003. *Alstroemerias de Chile. Diversidad, distribución y conservación*. Ed. Taller La Era, Santiago, Chile. 140 pp.
- Nattero, J., Cocucci, A.A., Medel, R. 2010. Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1957-1968.
- Olsson, K., Agren, J. 2002. Latitudinal population differentiation in phenology, life history and flower morphology in the perennial herb *Lythrum salicaria*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 983-996.
- Pan, J., Price, J. 2002. Fitness and evolution in clonal plants: the impact of clonal growth. *Evolutionary Ecology* 15: 583–600.
- Primack, R. 1985. Longevity of Individual Flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 15-37.

- Proctor, M., Yeo, P., Lack, A. 1996. Natural history of pollination. Harper Collins, London, UK. 479 p.
- Quiroga, M.P., Premoli, A.C., Ezcurra, C. 2002. Morphological and isozyme variation in *Cerastium arvense* (Caryophyllaceae) in the southern Andes. Canadian Journal of Botany 80: 786-795.
- R Development Core Team 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Ritland, K. Jain, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. Heredity 47: 35–52.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. Heredity 88: 221–228.
- Rochow, T.F. 1970. Ecological investigations of *Thlaspi alpestre* L. along an elevational gradient in the central Rocky Mountains. Ecology 51: 649-656.
- Rougier, D. 2005. Evolución de caracteres florales relacionados con el sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) en Chile. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 167 pp.
- Sapir, Y. 2009. Effects of floral traits and plant genetic composition on pollinator behavior. Arthropod-Plant Interactions 3: 115–129.
- Shaw, D.V., Kahler, A.L., Allard, R. W. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. Proceedings of National Academy of Science 78(2): 1298-1302.

- Silvertown, J., Charlesworth, D. 2001. Plant population biology. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom. 347 pp.
- Sokal, R. R. Rohlf, F. J. 1981. Biometry, 2nd ed. W. H. Freeman and Company, New York. 859p.
- Soltis, D., Soltis, P. 1989. Isozymes in plant biology. Chapman & Hall, London, UK. 268 p.
- Suárez, L., Gonzáles, W.L., Gianoli, E. 2009. Foliar damage modifies floral attractiveness to pollinators in *Alstroemeria exerens*. *Evolutionary Ecology* 23(4): 545-555.
- Sugiyama, S., Bazzaz, F.A. 1998. Size dependence of reproductive allocation: the influence of resource availability, competition and genetic identity. *Functional Ecology* 12: 280-288.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Plant physiology. 4th Edition. Ed. Sinauer Associates, USA. 700 pp.
- Tate, J., Simpson, B. 2004. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. *American Journal of Botany* 91(2): 207–213.
- Thompson, J.D. 2001. How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system? *Oecologia* 126(3): 386-394.

- Totland, O. 1994. Influence of climate, time of day and season, and flower density on insect flower visitation in alpine Norway. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 26: 66-71.
- Totland, O. 1997. Limitations on reproduction in alpine *Ranunculus acris*. *Canadian Journal of Botany* 75: 137-144.
- Totland, O. 2001. Environment-dependent pollen limitation and selection on floral traits in an alpine species. *Ecology* 82: 2233-2244.
- Totland O., Schulte-Herbrüggen, B. 2003. Breeding system, insect flower visitation, and floral traits of two alpine *Cerastium* species in Norway. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35(2): 242-247.
- Uslar, P. 1982. Sistemas de reproducción en plantas: zona ecotonal entre la zona andina y matorral esclerófilo de Chile central. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 205 pp.
- Varley, G., Gradwell, M., Hassell, P. 1973. *Insect population ecology: an analytical approach*. Blackwell Scientific, Oxford. 212 p.
- Wagstaff, C., Chanasut, U., Harren, F.J.M., Laarhoven, L.J., Thomas, B., Rogers, H., Stead, A.D. 2005. Ethylene and flower longevity in *Alstroemeria*: relationship between tepal senescence, abscission and ethylene biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56: 1007-1016.
- Waser, N.M. Ollerton, J. 2006. *Plant-pollinator Interactions: from specialization to generalization*. University of Chicago Press, Chicago, IL. 488p.

- Whitney, H.M., Glover, B.J. 2007. Morphology and development of floral features recognised by pollinators. *Arthropod-Plant Interactions* 1(3): 147-158.
- Worley, A.C., Baker, A.M., Thompson, J.D., Barrett, S.C.H. (2000). Floral display in *Narcissus*: Variation in flower size and number at the species, population, and individual levels. *International Journal of Plant Sciences* 161(1): 69-79.