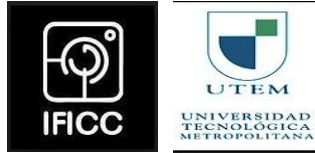


# XI CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOLOGÍA MATEMÁTICA SoLaBiMa 2019

Universidad Católica de Maule

22-25 de Octubre de 2019, Talca, Chile



## Variación en la ecología de polinización de *Oenothera epilobiifolia* (Onagraceae) en dos páramos de Venezuela

Gisela Rodríguez-Sánchez\*

Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

### Resumen

El estudio de variación interpoblacional en relaciones planta-polinizador permite entender procesos biológicos de adaptaciones y extinciones, así como procesos comunitarios. Por tanto, se quiso determinar si *Oenothera epilobiifolia* (Onagraceae) presenta variación en las estrategias de polinización en las unidades ecológicas páramo andino (PAN) y páramo altiandino (PAL) de Venezuela. Para esto, en cada una se midieron caracteres florales relacionados a visitas, se estudiaron sus relaciones mediante correlaciones de Pearson se determinaron los ensambles de visitantes florales con observaciones directas y con cámaras GoPro3 y se evaluó la agregación floral mediante el cálculo de la función de distribución radial  $g(r)$  con el estimador WM en el Software Programita. El uso de estadística tradicional y espacial permitió dilucidar las diferencias de estas poblaciones en estos dos sistemas, como la intensidad y escala de la agregación floral que es mayor en PAL donde se mantiene hasta una escala de 50,5cm; además que el contenido energético del néctar en PAL es mayor. Por lo tanto, en vista de haber registrado visitantes florales sólo en PAN, junto con asociaciones entre caracteres relacionados a visitas, se propone que hay un cambio en las estrategias de polinización de *O. epilobiifolia* en estos sistemas; por ende, se proponen como posibles ecotipos de polinización.

**Palabras clave:** Agregación floral, Andes, distribución radial, estrategia de polinización, ecotipos, ensamble de visitantes florales, polinización.

Equipo de trabajo:

**Roxibell Pelayo**<sup>1</sup>, Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas (ICAE), Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

**Pascual Soriano**<sup>2</sup>, Laboratorio de Ecología Animal A, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

**Ascanio Rojas**<sup>3</sup>, Centro Nacional de Cálculo Científico de la Universidad de Los Andes (CeCalCULA), Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

\* e-mail: giselatatiannarodriguez1904@gmail.com

<sup>1</sup> e-mail: roxipel@gmail.com

<sup>2</sup> e-mail: pascual@ula.ve

<sup>3</sup> e-mail: ascanio@ula.ve

## Introducción

Las estrategias de polinización normalmente son consideradas plasticidad fenotípica<sup>1</sup>; no obstante, si las poblaciones presentan rasgos fenotípicos únicos en una ecoregión, y al ser trasladada a otra su adecuación disminuye significativamente, se considera que esa población presenta adaptaciones a determinada ecoregión<sup>2</sup>. De hecho, Newman, *et al.*<sup>3</sup> proponen que los síndromes florales pueden ser extendidos a nivel de poblaciones, al menos para *Nerine humilis* (Amaryllidaceae). La hipótesis de especiación en plantas dirigida por polinizadores, apoyada por el modelo de Grant-Stebbins<sup>4-6</sup> es robusta en algunos casos; no obstante, también hay evidencia a favor de que condiciones ambientales como la temperatura, precipitaciones<sup>7</sup> y la altitud<sup>8</sup> también modelan la variación en algunos rasgos florales y que la distribución de polinizadores responde a la disponibilidad de recursos.

En este sentido, la determinación de ecotipos de polinización mediante la diferencia en estrategias de polinización entre poblaciones con estructura, junto con pruebas de aislamiento reproductivo, ha sido tomado por algunos autores como ejemplos y pruebas de especiación ecológica<sup>2,9,10</sup>. Esa variación puede deberse a presiones por polinizadores o presiones ambientales. Así, ante los gradientes altitudinales que presentan los Andes venezolanos y el impacto por cambio climático que amenaza estos sistemas, surgió la siguiente pregunta ¿La altitud tiene efecto sobre las estrategias de polinización de *Oenothera epilobiifolia*, en aspecto como los rasgos florales relacionados a visitas, sus ensambles de visitantes florales, la agregación y densidad floral? Ante esta pregunta, se esperaba encontrar que con la altitud aumentara la concentración de sacarosa en el néctar y la agregación floral de esta planta, y en consecuencia, cambiara la composición de los ensambles de sus visitantes florales.

## Materiales y Métodos

### Especie y área de estudio

*Oenothera epilobiifolia* Kunth (Onagraceae) es una hierba perenne. Tiene hojas alternas, flores solitarias axilares, hermafroditas, radiadas, tetrámeras y diclamídeas. Presenta tres estadios florales, distinguibles por el color de la corola: corolas verde-amarillentas, naranjas y rojas; los pétalos miden menos de 1cm. de largo. El área de estudio se encuentra en la vertiente húmeda de la Cuenca del Río Chama, Estado Mérida y comprende a las unidades ecológicas páramo andino (PAN) y páramo altiandino (PAL). PAN se ubica entre 3000 y 3800msnm, su temperatura media anual es inferior a 9°C con heladas nocturnas. En PAN se establecieron dos estaciones experimentales a 3600msnm y a 3500msnm. Por otra parte, PAL en general comienza en 3800msnm; presenta ciclos diarios recurrentes de congelamiento y descongelamiento de los centímetros más superficiales del suelo, la temperatura media está entre 2,5°C y -2°C<sup>11</sup>. En PAL se trabajó a una altitud de 4450msnm.

### Diseño experimental y análisis de resultados

El muestreo se llevó a cabo entre el 2 de agosto y el 25 de octubre de 2018. Para los rasgos florales se seleccionaron flores en los tres estadios admitiendo un máximo de dos flores por planta. Las flores fueron vaciadas de néctar y embolsadas, 24 horas después a cada flor se le midió la longitud de corola, nectario, ovario y apertura con un vernier analógico (Mauser); el volumen de néctar con

microcapilares de 0.5 y 1  $\mu\text{L}$  (DrummondScientific); la concentración de sacarosa en néctar con un refractómetro analógico (0-50°Brix, Eclipse, Bellingham & Stanley). Estos datos fueron normalizados con  $\text{Log}_{10}(x+1)$ , se calculó la media y la desviación estándar para cada conjunto de datos. Se realizaron pruebas t de Student para comparar la media de cada característica floral entre PAL y PAN. Además se calcularon correlaciones de Pearson para cada unidad ecológica entre algunos rasgos. Así mismo, se determinó el efecto blanco-bonanza. Todo se realizó en R versión 3.5.1., y los gráficos con el paquete ggplot2<sup>12</sup>.

También, en cada estación experimental se hicieron observaciones directas y con cámaras GoPro3, se registró el estadio floral de las flores visitadas, el número de visitas que efectuó el animal y su identidad. Además, se establecieron seis parcelas de 5x5m, a su vez cada una de ellas se subdividió en 100 miniparcels de 0.5x0.5m, en cada una de estas se tomó una fotografía a 1.5m del suelo, dentro de cada foto se establecieron cuatro puntos que marcan los límites de cada miniparcels así como una escala de 30cm. Utilizando estos últimos, le fue asignada una coordenada X y Y a cada flor en un plano cartesiano, empleando PhotoShop CS6<sup>13</sup>. Luego se calculó la función de distribución radial  $g(r)$ <sup>14</sup> con el estimador WM<sup>15</sup> para cada parcela en el Software Programita<sup>15-17</sup>, esta función determina el número de partículas, en esta caso flores, en anillos concéntricos y lo compara con la probabilidad de esa agregación, obtenida por permutación de los datos previos mediante un modelo nulo de aleatorización, por lo tanto, permite calcular la intensidad de la agregación y hasta qué escala se mantiene. También se calcularon densidades relativas de flores y se analizó mediante un diseño multifactorial con un análisis de varianza utilizando permutaciones (PERMANOVA) en Primer 6 & PERMANOVA +<sup>18</sup>. Finalmente, se calculó el contenido calórico del néctar poblacional usando la densidad relativa y la relación 1M de sacarosa tiene 1349.6 cal/mL, corrigiendo previamente el volumen de la solución con  $d = (0.0037921xC) + (0.0000178xC^2) + 0.9988603$ , donde C= grados Brix del refractómetro<sup>19</sup>

## Resultados

Se encontró que el néctar no está disponible en todos los estadios florales, sino principalmente en el estadio verde, e incluso en este estadio en PAL ( $n=60$ ) sólo el 47% de las flores estudiadas presentaron néctar y en PAN ( $n=111$ ) el 62%. En ese mismo sentido, la calidad del néctar en el estadio verde es variable entre los dos páramos estudiados sólo en la concentración de sacarosa [media  $\pm$  desviación estándar: PAL ( $16 \pm 5$ )%, PAN ( $21 \pm 8$ )%;  $t = -2.1304$ ,  $p = 0.04029$ ], mientras que para el volumen no hay diferencia significativa [media  $\pm$  desviación estándar: PAL ( $2.23 \pm 1.90$ ) $\mu\text{L}$ , PAN ( $3.69 \pm 3.19$ ) $\mu\text{L}$ ;  $t = -1.8869$ ,  $p = 0.06767$ ]. Por otra parte, las dimensiones florales de caracteres como corola [media  $\pm$  desviación estándar: PAL,  $n=38$  ( $0.614 \pm 0.104$ )cm, PAN,  $n= 70$ , ( $0.701 \pm 0.144$ )cm;  $t = -3.5139$ ,  $p = 0.000675$ ], nectario [media  $\pm$  desviación estándar: PAL,  $n=35$  ( $0.818 \pm 0.142$ )cm, PAN,  $n= 65$ , ( $1.114 \pm 0.170$ )cm;  $t = -9.0712$ ,  $p = 1.32e-13$ ] y ovario [media  $\pm$  desviación estándar: PAL,  $n=37$  ( $0.741 \pm 0.263$ )cm, PAN,  $n= 60$ , ( $0.916 \pm 0.316$ )cm;  $t = -2.9132$ ,  $p = 0.004605$ ] también son variables entre los dos páramos, siendo de mayor longitud siempre en PAN, excepto en el caso de la apertura, que no mostró diferencia significativa [media  $\pm$  desviación estándar: PAL,  $n=38$  ( $0.446 \pm 0.144$ )cm, PAN,  $n= 60$ , ( $0.4199 \pm 0.123$ )cm;  $t = 0.8158$ ,  $p = 0.4172$ ].

Así mismo, se encontraron correlaciones positivas entre el tamaño de la corola (PAL  $n=18$ ; PAN  $n=40$ ) y el nectario (PAL  $n=15$ ; PAN  $n=37$ ) con el volumen de néctar sólo en PAN [ $r = -0.004$ ,  $p = 0.988$ , PAL ( $r = 0.350$ ,  $p = 0.027$ )]. Esto implica que los caracteres que están asociados en PAN, varían de manera independiente en PAL. Por otra parte, con 47 horas de observación en PAN se

registraron dos especies de colibríes que visitan las flores legítimamente (*Oxygogon lindenii* y *Metallura tyrianthina*) y una mariposa de la familia Pieridae, en consecuencia la tasa de visitas legítimas en esta unidad ecológica es de 0.078 visitas/10min; las visitas se llevaron a cabo sólo en el estadio verde. Por el contrario, en PAL con 37 horas de esfuerzo no se registró ninguna visita en ningún estadio floral. No obstante, tanto en PAN como en PAL se registró actividad de aves y de *Bombus rudicundus*, visitando otras plantas, principalmente *Castilleja* spp. Por lo que en PAL, las flores de *O. epilobiifolia* no parecen ser un recurso apetecible, al menos en el período de observación de este trabajo.

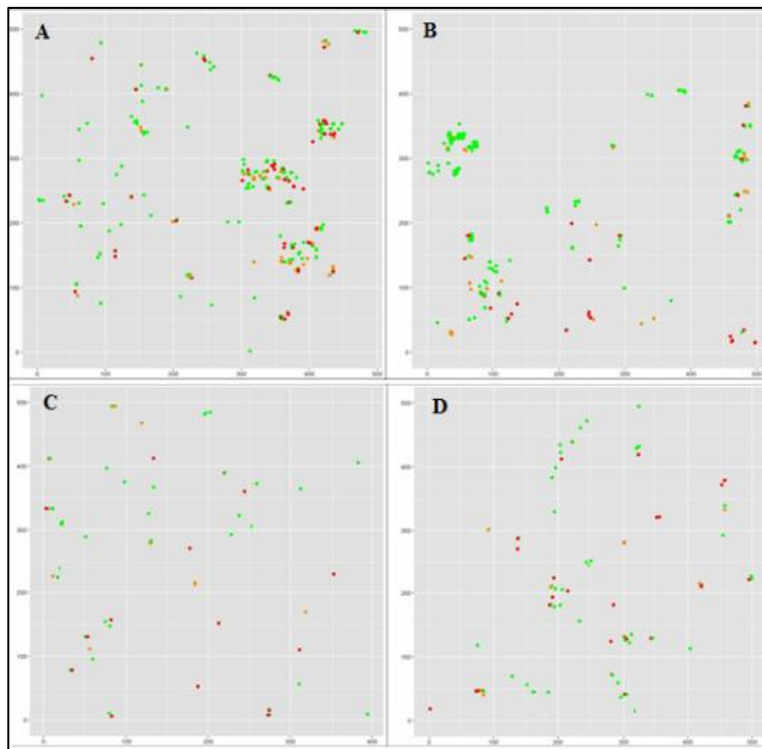


Figura 1. Posición de las flores de *O. epilobiifolia* en parcelas de 5x5m en PAL (A-B) y PAN (C-D). Los ejes están dados en centímetros (cm). Los colores indican el estadio floral de cada flor: Verde= Estadio verde; Naranja = Estadio Cambiando; Rojo = Estadio rojo.

También se encontró que la densidad relativa de las flores de *O. epilobiifolia* varía significativamente entre los estadios, pero de forma diferente en las unidades ecológicas [PERMANOVA, interacción entre factores  $PseudoF = 10,586$ ,  $p$  (MC) = 0,0006]. La prueba de a pares indica que el estadio verde presenta mayor densidad relativa [media  $\pm$  desviación estándar: PAL (5,82  $\pm$  1,94)cm, PAN (1,97  $\pm$  0,63)cm;  $t = 4,6255$ ,  $p = 0,0006$ ]. Por otra parte, las parcelas muestran la formación de agregados de flores de todos los estadios (Figura 1). El análisis estadístico revela que la agregación es diferente entre PAL y PAN, siendo mayor en PAL en escala e intensidad (Figura 2). Por lo tanto, las flores en PAL no sólo están más agregadas que en PAN, sino que el tamaño de los parches, también es mayor.

Finalmente, debido a la alta densidad floral en PAL la oferta poblacional es casi idéntica entre estas dos unidades ecológicas [Energía por flor PAL= 1.50 cal, PAN= 3.32 cal; Energía poblacional PAL= 4.10, PAN = 4.06]. Por lo tanto *O. epilobiifolia*, poblacionalmente, ofrece el mismo contenido calórico, pero en paquetes energéticos diferentes.

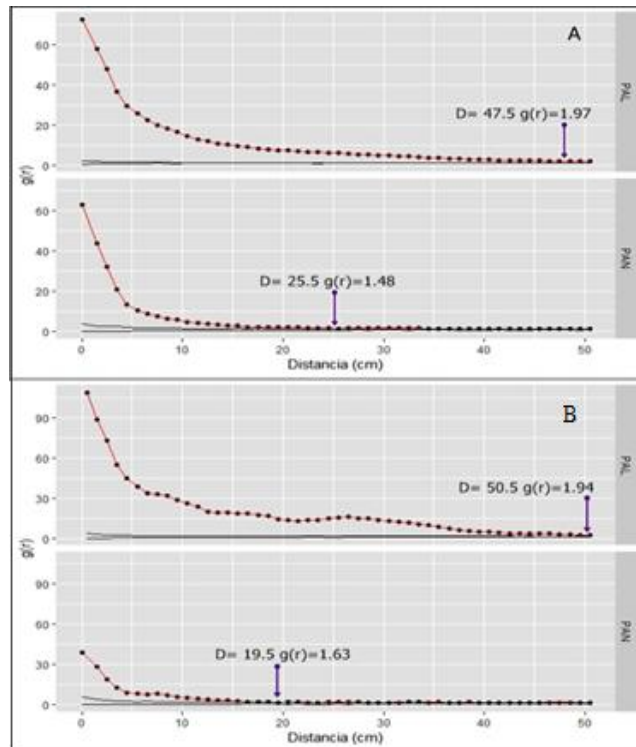


Figura 2. Función de distribución radial  $g(r)$  según la distancia de análisis para las flores de *O. epilobiifolia* en páramos venezolanos. Las flechas indican el valor de distancia en el cual la función  $g(r)$  entra al intervalo de confianza de 95%. A: Las flores sin distinguir entre los estadios. B: Las flores verdes.

## Discusión

Para *Oenothera epilobiifolia* (Onagraceae) fue referido un ensamble de visitantes florales en los páramos venezolanos, compuesto por dos colibríes y un abejorro<sup>20</sup>. No obstante, el haber encontrado diferencias en las visitas de las flores en los dos páramos de estudio, aunado a diferencias significativas en aspectos reproductivos relacionados a posibles visitas entre los dos páramos, parece sugerir un cambio en las estrategias de polinización de esta especie en estas dos unidades ecológicas. La concentración de néctar en PAN (21% p/p) concuerda con los rangos referidos para flores ornitófilas, mientras que PAL se encuentra por debajo<sup>21-24</sup>. Por otra parte, Faegri & van der Pijil<sup>25</sup> propusieron que en sistemas altos y con bajas temperaturas la agregación floral podría ser una estrategia que permite a los visitantes llevar a cabo varias visitas sin necesidad de realizar mucho trabajo; sin embargo, la igualdad en las ofertas poblacionales en ambas unidades ecológicas parece indicar que la ausencia de registros de visitantes florales en PAL se ve influenciada por una relación entre el trabajo involucrado (en el movimiento de buscar una flor, extraer la recompensa y moverse de una flor a otra) con la recompensa por visita. Esta idea se relaciona al punto negativo del efecto blanco-bonanza, que se produce cuando este es muy alto, aunado a bajo rendimientos energéticos en la recompensa floral. Así, poblacionalmente estas flores no parecen ser un recurso apetecible para los visitantes florales disponibles.

Si bien las poblaciones de plantas visitadas por polinizadores también mantienen variación fenotípica en caracteres florales relacionados a las visitas, tanto en polimorfismos como variación cuantitativa y, si la variación fenotípica de los visitantes florales a su vez responde a esta variación, entonces ese comportamiento tiene consecuencias sobre la selección de caracteres florales por parte

de los visitantes <sup>26</sup>; si no es así, entonces la presión sobre estos caracteres está relajada y evolucionan bajo otros mecanismos. Debido a que el tamaño y la forma de caracteres morfológicos como el nectario, la corola y su apertura han mostrado tener un efecto en las preferencias florales por parte de los polinizadores <sup>27-31</sup>; entonces, se podría sugerir que los polinizadores ejercen presiones selectivas sobre dichos caracteres <sup>32,33</sup>. Así, poblacionalmente el fenotipo que expresa estos caracteres en conjunto es el que se encuentra en mayor frecuencia, lo que implica que las presiones sobre ellos estarían ocurriendo en conjunto y, en consecuencia, su variación en el tiempo se dé de manera concertada. Experimentalmente, para demostrar esta expresión conjunta se hacen experimentos de translocación a sistemas donde la presión de los polinizadores no existe o es diferente y se evalúa si en las sucesivas generaciones se rompe la relación entre los caracteres morfológicos<sup>1,2,33</sup>.

En este orden de ideas, se podría considerar PAL y PAN como un experimento natural: en PAN donde se han registrado visitantes florales se han encontrado relaciones entre la longitud del nectario, de la corola y su apertura con el volumen de néctar; de manera que, si los colibríes de PAN perciben esta relación, es posible que visiten con mayor frecuencia flores de tallas grandes, favoreciendo el aumento de la frecuencia de esos fenotipos en la población. Por el contrario, en PAL no se registraron visitas a las flores de *O. epilobiifolia*, y tampoco se encontraron correlaciones significativas entre estos caracteres; en otras palabras, las relaciones observadas en PAN entre caracteres se rompen en PAL. Esto pareciera indicar que en PAL estos caracteres varían independientemente de los otros, lo que podría interpretarse como que no hay presiones por parte de los visitantes sobre ellos y, por ende, el efecto de la selección es menor en la diversidad de estos, evolucionando de manera neutral o cercana a la neutralidad y que su diversidad en la población se mantiene principalmente por mecanismos evolutivos como la deriva génica, mutaciones y recombinaciones <sup>34</sup>, apoyando la propuesta de que los visitantes florales en PAN estén ejerciendo presiones selectivas sobre esos caracteres morfológicos.

Si este fuese el caso, se podría afirmar que las poblaciones de *O. epilobiifolia* en PAL y PAN son ecotipos de polinización <sup>2</sup>. En PAN, a pesar de haber autocompatibilidad, los visitantes florales promueven la fecundación cruzada, y se hace evidente la predominancia en la población de fenotipos con características morfológicas relacionadas con visitantes florales; en PAL el sistema reproductivo es la autogamia y el efecto de la selección sobre caracteres morfológicos relacionados a visitantes florales debería ser bajo. En relación a lo antes expuesto, lo que se sospecha con estos resultados, es que esta variación no pareciera ser producto de diferencias en el ensamble de polinizadores como propone el modelo de Grant-Stebbins<sup>4-6</sup> para los ecotipos de polinización, sino más bien por cambios drásticos en el ambiente, debido a que en PAL se encuentran los posibles visitantes, pero no visitan estas flores. Además, las condiciones ambientales en PAL son considerablemente más drásticas en términos climáticos <sup>7,11,35</sup>, y en esta situación, la concentración de sacarosa en néctar podría estar respondiendo a otras presiones selectivas, por ejemplo: estrés hídrico, alta radiación, temperatura, disponibilidad de nutrientes en el suelo, entre otras. Todas estas variables han sido ampliamente referidas como influyentes en las características del néctar<sup>7,36-38</sup>. Las condiciones ecológicas (más allá de sólo las presiones por polinizadores) han mostrado poder dirigir principales cambios evolutivos en los sistemas reproductivos de las plantas<sup>39-42</sup>.

Normalmente se espera que la autogamia conlleve a una reducción en el número efectivo de la población, en consecuencia de una aceleración en la tasa de fijación de mutaciones y disminución

de la diversidad <sup>43</sup>. Sin embargo, se ha propuesto que en poblaciones autocompatibles de plantas algunos mecanismos mantienen la diversidad poblacional a pesar de no haber fertilización cruzada ni genes migrantes <sup>44-46</sup>. En plantas autocompatibles no sólo se ha demostrado que la tasa de recombinación es mayor en comparación con especies autoincompatibles <sup>47</sup>; sino que en poblaciones muy grandes de las primeras, la tasa de recombinación a escala poblacional también es mayor. Si además hay mucha clonalidad (lo que se sospecha en este caso en PAL, por la alta densidad relativa de flores encontradas y su intensidad de agregación) la tasa de mutación debe ser alta a escala poblacional.

En relación con esto, Eckert, *et al.* <sup>48</sup> mencionan que hay una tendencia a que especies con variación en caracteres florales en gradientes geográficos, explotan el seguro reproductivo en las transiciones de fertilización cruzada potenciada por polinización biótica a procesos de autocompatibilidad, especialmente en eventos de colonización. Esto apoya la idea de que en interacciones generalistas planta-polinizador, en donde las plantas son autocompatibles, la presencia y coexistencia de visitantes florales tiene un efecto aditivo sobre la reproducción de las plantas, y por ende, el fenotipo que potencia esa interacción se encuentra en mayor frecuencia en esas poblaciones; sin embargo, en ausencia de los visitantes, las plantas emplean el seguro reproductivo (CITAR DARWIN), y pudieran expresar otros fenotipos. Finalmente, es importante aclarar que incluso en PAL la dinámica de los polinizadores puede ser diferente en otro momento fenológico, cuando la oferta energética de otras plantas sea menor. Los resultados presentados corresponde a un periodo de la fenología de *O. epilobiifolia*, desde agosto hasta octubre; sin embargo, se desconoce la dinámica de la producción de néctar al comienzo de su floración, cuando el solapamiento con otras especies de la comunidad. Por ello, se recomienda para futuros estudios, analizar la producción de néctar y los visitantes florales a lo largo de toda la fenología de esta planta.

## Conclusiones

El uso de la estadística tradicional y espacial permitió estudiar la dinámica poblacional de estos sistemas y compararla para poder hacer conclusiones ecológicas y posibles propuestas evolutivas bajo un enfoque de dinámica eco-evo. De esta manera, la disminución en la concentración de sacarosa en el néctar, la reducción de las estructuras florales junto con la pérdida de sus relaciones, el aumento en la intensidad y escala de la agregación floral en PAL aunado a ausencias de visitas, al menos en el período de estudio de este trabajo, parecen indicar que hay diferencia en las estrategias de polinización de *O. epilobiifolia* en PAL y PAN. En PAL, la agregación y el aumento en la densidad floral pueden interpretarse como un mecanismo que permite mantener la diversidad poblacional mediante recombinación en ausencia de fertilización cruzada; en consecuencia, en esta unidad ecológica, los caracteres asociados a visitas parecen estar bajo neutralidad y varían independientemente de los demás. En PAN, a pesar de haber autocompatibilidad, la fertilización cruzada parece mantener alta la frecuencia en la población de fenotipos que presentan en conjunto caracteres relacionados a visitas. De esta manera, se propone a estas poblaciones como ecotipos de polinización. La variación de morfotipos florales en *O. epilobiifolia* no parece depender de la disponibilidad de visitantes flores, sino de variaciones en condiciones ecológicas de tipo ambiental.

## Referencias

- 1 Sun, M., Gross, K. & Schiestl, F. P. Floral adaptation to local pollinator guilds in a terrestrial orchid. *Annals of botany* **113**, 289-300, doi:10.1093/aob/mct219 (2014).
- 2 van der Niet, T., Peakall, R. & Johnson, S. D. Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of botany* **113**, 199-211, doi:10.1093/aob/mct290 (2014).
- 3 Newman, E., Manning, J. & Anderson, B. Local adaptation: Mechanical fit between floral ecotypes of *Nerine humilis* (Amaryllidaceae) and pollinator communities. *Evolution; international journal of organic evolution* **69**, 2262-2275, doi:10.1111/evo.12736 (2015).
- 4 Johnson, S. D. The pollination niche and its role in the diversification and maintenance of the southern African flora. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **365**, 499-516 (2010).
- 5 Grant, V. Pollination Systems as Isolating Mechanisms in Angiosperms. *Evolution; international journal of organic evolution* **3**, 82-97 (1949).
- 6 Stebbins, G. L. Adaptive Radiation of Reproductive Characteristics in Angiosperms, I: Pollination Mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**, 307-326 (1970).
- 7 Petanidou, T., van Laere, A. J. & Smets, E. Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering Mediterranean shrub. *Plant Systematics and Evolution* **199**, 79-92 (1996).
- 8 Heinrich, B. & Raven, P. H. Energetics and pollination ecology. *Science* **176**, 597-602 (1972).
- 9 Rundle, H. D. & Nosil, P. Ecological speciation. *Ecology letters* **8**, 336-352, doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x (2005).
- 10 Kay, K. M. & Sargent, R. D. The Role of Animal Pollination in Plant Speciation: Integrating Ecology, Geography, and Genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**, 637-656, doi:10.1146/annurev.ecolsys.110308.120310 (2009).
- 11 Ataroff, M. & Sarmiento, L. in *Reptiles de Los Andes de Venezuela* (eds E. La Marca & Pascual J. Soriano) 10-26 (Fundación Polar, Conservación Internacional, CODEPRE-ULA, Fundacite Mérida, BIGEOS, 2004).
- 12 Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics v. 3.1.0 (2018).
- 13 Adobe PhotoShop CS6 v. 6 (Adobe, 2012).
- 14 Weeks, E. *What is the pair correlation function  $g(r)$ ?*, <<http://www.physics.emory.edu/faculty/weeks/idl/gofr.html>> (2005).
- 15 Wiegand T. & Moloney, a. K. A. *A handbook of spatial point pattern analysis in ecology*. (Chapman and Hall/CRC press, 2014).
- 16 Wiegand T. & Moloney, a. K. A. Rings, circles and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos* **104**, 209-229 (2004).
- 17 Wiegand, T., A. Huth & Martínez, a. I. Recruitment in tropical tree species: revealing complex spatial patterns. *The American Naturalist* **174**, 106-104 (2009).
- 18 PERMANOVA+ for PRIMER v. 6 (PRIMER-E, Plymouth, UK, 2008).
- 19 Hicks, D. M. *et al.* Food for Pollinators: Quantifying the Nectar and Pollen Resources of Urban Flower Meadows. *PloS one* **11**, e0158117, doi:10.1371/journal.pone.0158117 (2016).
- 20 Pelayo, R. *Implicaciones ecológicas y evolutivas del robo de néctar en ecosistemas neotropicales venezolanos* Doctoral thesis, Universidad de Vigo, (2017).
- 21 Baker, H. G. Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* **13**, 37-41 (1975).
- 22 Nicolson, S. W. & Fleming, P. A. Nectar as food for birds: the physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Systematics and Evolution* **238**, 139-153, doi:10.1007/s00606-003-0276-7 (2003).
- 23 Kim, W., Gilet, T. & Bush, J. W. M. Optimal concentrations in nectar feeding. *PNAS*, 16618-16621, doi:10.1073/pnas.1108642108/-DCSupplemental (2011).
- 24 Chalcoff, V. R., Aizen, M. A. & Galetto, L. Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of botany* **97**, 413-421 (2005).
- 25 Faegri, K. & van der Pijil, L. *The principles of Pollination Ecology*. (Pergamon Press Ltd, 1979).
- 26 Stehlik, I., Caspersen, J. P. & Barrett, S. C. Spatial ecology of mating success in a sexually polymorphic plant. *Proceedings. Biological sciences* **273**, 387-394, doi:10.1098/rspb.2005.3317 (2006).
- 27 Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R. & Thomson, J. D. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**, 375-403 (2004).
- 28 Varela, C. W., Taisma, M. A. & Castañeda, C. Manipulación de las flores de *Ludwigia peruviana* (L.) H.Hara (Onagraceae) y su efecto sobre la frecuencia de visitas de insectos polinizadores. *FARAUTE Ciens. y Tec.* **5**, 18-26 (2010).
- 29 Pelayo, R. *et al.* Cambios en la estructura de ensambles de visitantes florales en *Espeletia schultzii* Wedd y *Senecio wedglacialis* Cuatrec (Asteraceae) ante modificaciones artificiales de algunos caracteres florales. *Ecotrópicos* **28**, 14-26 (2015).
- 30 Brown, M., Downs, C. T. & Johnson, S. D. Covariation of flower traits and bird pollinator assemblages among populations of *Kniphofia linearifolia* (Asphodelaceae). *Plant Systematics and Evolution* **294**, 199-206, doi:10.1007/s00606-011-0443-1 (2011).
- 31 Glaettli, M. & Barrett, S. C. Pollinator responses to variation in floral display and flower size in dioecious *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *The New phytologist* **179**, 1193-1201, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02532.x (2008).
- 32 Ornelas, J. F., Ordano, M., De-Nova, A. J., Quintero, M. E. & Garland, T., Jr. Phylogenetic analysis of interspecific variation in nectar of hummingbird-visited plants. *Journal of evolutionary biology* **20**, 1904-1917, doi:10.1111/j.1420-9101.2007.01374.x (2007).
- 33 Staton, M. & Young, H. Selecting for floral character associations in wild radish, *Raphanus sativus* L. *Journal of evolutionary biology* **7**, 271-285 (1994).
- 34 Ness, R. W., Mathieu Siol & Barrett, S. C. H. Genomic consequences of transitions from cross- to self-fertilization on the



- efficacy of selection in three independently derived selfing plants. *BMC Genomics* **13**, 2 (2012).
- 35 Monasterio, M. in *Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos* (ed Maximina Monasterio) 93-158 (Editorial de La Universidad de Los Andes, 1980).
- 36 Corbet, S. A. & Willmer, P. G. The nectar of *Juticia* and *Columnnea*: Composition and Concentration in a Humid Tropical Climate. *Oecologia* **51**, 412-418 (1981).
- 37 Cosacov, A., Cocucci, A. A. & Sérsic, A. N. Variación geográfica de la recompensa floral de *Calceolaria Polyrhiza* (Calceolariaceae): Influencia de factores bióticos y abióticos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **47**, 363-373 (2012).
- 38 Feinsinger, P. Ecological interacciones between plants and hummingbirds in a sucesinal Tropical Community. *Ecological Monographs* **48**, 269-287 (1978).
- 39 Paiaro, V., Oliva, G. E., Cocucci, A. A. & Sérsic, A. N. Caracterización y variación espacio-temporal del néctar en *Anarthrophillum desideratum* (Fabaceae): Influencia del clima y sus polinizadores. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **47**, 375-387 (2012).
- 40 Barrett, S. C. H. & Husband, B. C. Spatial and temporal variation in population size of *Eichhornia paniculata* in ephemeral habitats: implications for metapopulation dynamics. *Journal of Evolution* **86**, 1021-1031 (1998).
- 41 Barrett, S. C., Ness, R. W. & Vallejo-Marin, M. Evolutionary pathways to self-fertilization in a tristylous plant species. *The New phytologist* **183**, 546-556, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02937.x (2009).
- 42 Barrett, S. C. Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **365**, 99-109, doi:10.1098/rstb.2009.0199 (2010).
- 43 Ingvarsson, P. K. A metapopulation perspective on genetic diversity and differentiation in partyally self-fertilizing plants. *Evolution; international journal of organic evolution* **56**, 2368-2373 (2002).
- 44 Wright, Stephen I., Ness, Rob W., Foxe, John P. & Barrett, Spencer C. H. Genomic Consequences of Outcrossing and Selfing in Plants. *International Journal of Plant Sciences* **169**, 105-118, doi:10.1086/523366 (2008).
- 45 Yong, E. Tree's leaves genetically different from its roots. *Nature*, doi:10.1038/nature.2012.11156 (2012).
- 46 Takebayashi, N. & Morrel, P. Is self-fertilization an evolutionry dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionry approach. *American Journal of Botany* **88**, 1143-1150 (2001).
- 47 Roze, D. & Lenormand, T. Self-fertilization and the evolution of recombination. *Genetics* **170**, 841-857, doi:10.1534/genetics.104.036384 (2005).
- 48 Eckert, C. G., Samis, K. E. & Dart, S. in *Ecology and evolution of flowers* (eds L. D. Harder & S. C. Barrett) (Oxford University Press, 2006).