UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia)

Alejandra Franco Saldarriaga

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Área curricular de Biología
Maestría en Ciencias-Biología
Bogotá, Colombia
2014

# Estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* (NT) Mez. (Bromeliaceae) en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, Colombia)

Alejandra Franco Saldarriaga

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Biología

Directora
María Argenis Bonilla Gómez, Ph. D.
Profesora Asociada, Departamento de Biología

Línea de Investigación
Ecología
Grupo de Investigación
Biología de Organismos Tropicales
(BIOTUN)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Área Curricular de Biología
Maestría en Ciencias-Biología
Bogotá, Colombia
2014

# Agradecimientos

Al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias, a la Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIB) y a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, por el financiamiento de esta investigación dentro de la convocatoria 566 año 2012 (Convenio 0729 de 2012).

A la Universidad Nacional de Colombia, principalmente al programa de Biología por acogerme durante todo el proceso académico y a todos los profesores que hicieron parte de mi formación y aprendizaje.

A la Subdirección de Gestión y Manejo de Áreas Protegidas de Parques Nacionales Naturales de Colombia por el permiso de estudio de investigación científica en el P.N.N Chingaza.

Al Parque Nacional Natural Chingaza, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mí trabajo de campo en este lugar tan mágico, y a cada uno de las personas que compartieron e hicieron de mi estadía más confortable, principalmente a Pilar Alfonso, Elquín Pedraza y Don Guzmán.

A la profesora María Argenis Bonilla por aceptar apoyarme en esta etapa de formación, por motivarme a seguir en la línea de investigación en ecología, incentivarme el amor al trabajo en campo, estar pendiente en cada uno de los pasos de este proyecto y por sus valiosos comentarios y correcciones en el manuscrito.

Al grupo de investigación de biología de organismos tropicales (BIOTUN) por el apoyo desde un comienzo de la maestría, por ofrecerme un espacio grato para el desarrollo de la tesis y por el préstamo de equipos. Gracias también a cada una de las personas que lo conforman, principalmente a Angélica, Laura, Manuela, Carolina, por sus palabras de aliento y valiosos comentarios.

Al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, principalmente a Gary Stiles por facilitarme la revisión de la colección de aves y la toma de las respectivas medidas morfológicas.

A los profesores Carlos Sarmiento y Germán Amat por la identificación de los insectos.

*Estrategias de la reproducción sexual de Puya nitida Mez.*

A mi padre Fernando Franco y a mi madre Luz Inés Saldarriaga, por la confianza, el apoyo incondicional, y por compartir conmigo cada paso del camino para lograr ser una mejor mujer y profesional. Por inculcarme valores que han sido indispensables en mi vida, como la honestidad, la disciplina y el amor por lo que se hace.

A Cristian Mur, Nabhí Romero y a cada una de las personas que de una u otra forma me colaboraron en campo.

# Resumen

Se estudiaron las estrategias de reproducción sexual de *Puya nitida* en el Parque Nacional Natural Chingaza, Cundinamarca, entre los meses de febrero del 2013 y febrero del 2014; se evaluó aspectos de la bióloga floral, como la morfología y desarrollo floral, antesis, y producción de néctar; los patrones fenológicos a nivel de población, parche y roseta; algunas interacciones planta-animal, y la viabilidad y germinación de semillas. Se encontró que *P. nitida* es una especie que se adecua al síndrome de ornitofilia debido a sus características tanto de la morfología y despliegue floral, como de producción néctar. Asimismo, presentó separación temporal y espacial de los órganos masculinos y femeninos, y un sistema de reproducción mixto. A nivel de población el patrón fenológico fue sincrónico, con una frecuencia anual y duración prolongada (> 5 meses) para la maduración de los frutos e intermedia (4 meses) para la floración, presentando para este último un pico en el mes de noviembre. A nivel de parche, el patrón fue asincrónico, puesto que se registraron rosetas infértiles, fértiles y muertas simultáneamente. A nivel de roseta la floración también fue asincrónica con una duración de dos meses; se reconoció una floración tipo acrópeta, encontrando flores en varios estados de desarrollo, al mismo tiempo. *P. nitida* también presentó una mayor cantidad y calidad de los frutos para los tratamientos de polinización cruzada manual y polinización natural, y un ISI =0,08, indicando que esta especie es en su mayor parte autoincompatible. Los principales visitantes de esta planta fueron *Eriocnemis vestita*, *Lesbia victoriae* y *Chalcostigma heteropogon*, colibríes que pueden ser los polinizadores más eficientes debido a su comportamiento de visita y morfología. Se registraron interacciones antagonistas por parte del ladrón de néctar *Diglossa humeralis* y diferentes especies de larvas y adultos de dípteros y coleópteros, que consumieron estructuras como primordios florales, flores, frutos y semillas. Se evidenció que *P. nitida* presenta altos niveles de viabilidad de semillas y que la germinación de estas está determinada por las condiciones de luz, siendo fotoblásticas positivas. Los resultados sugieren que aunque *P. nitida* presenta reproducción clonal depende de polinizadores y posee diferentes mecanismos que contribuyen a la polinización cruzada.

***Palabras clave**:* Biología reproductiva, Cundinamarca, Páramo, visitantes florales, Bromeliaceae.

# Abstract

The strategies of sexual reproduction of *Puya nitida* were studied in the National Natural park Chingaza (Cundinamarca), from February 2013 to February 2014. Aspects of the floral biology were studied, such as floral morphology and floral development, anthesis and nectar production. The phenological patterns at population, patch and individual level were studied as well as some plant-animal interactions and the viability and seed germination. *P. nitida* is a species adapted to the ornithophyly syndrome due to its morphological characteristics, floral display and nectar production. Also, *P. nitida* presented a temporal and spatial separation of male and female organs, and a mixed mating system. At the population level, the phenological pattern was synchronic, with an annual frequency; the duration of fruiting was prolonged (> 5 months) while the flowering was intermediate (4 months) with a peak in November. At patch level, the pattern was asynchronous, due to infertile, fertile and dead rosettes were recorded simultaneously. At level of rosette, the flowering was also asynchronously, with a duration of two months; one acropetal flowering type was recognized, finding flowers in various stages of development at the same time. Furthermore, *P. nitida* presented a greater fruit quantity and quality for manual cross pollination and natural pollination, besides an ISI= 0.08, indicating that this species is mostly self-incompatible. The main visitors of *P. nitida* were *Eriocnemis vestita*, *Lesbia victoriae* y *Chalcostigma heteropogon,* these hummingbirds can be considered as the most efficient pollinators, due to their visiting behavior and morphology. Also antagonistic interactions by the nectar robbers *Diglossa humeralis* and different species of larvae and adults of Diptera and Coleoptera were recorded. Larvae and adults of Diptera and Coleoptera consumed structures such as flower primordial, flowers, fruits and seeds. The same way it was demonstrated that *P. nitida* has high levels of seed viability and that the seed germination was determined by light conditions, being positive photoblastic. The results suggest that although *P. nitida* presented clonal reproduction, it depends on pollinators and it has different mechanisms that contribute to cross-pollination.

***Key words**:* reproductive biology, Cundinamarca, Paramo, floral visitors, Bromeliaceae

# Tabla de contenido

Agradecimientos ..... 3
Resumen ..... 5
Abstract ..... 6
Lista de figuras ..... 9
Lista de Tablas ..... 11
1. Introducción ..... 12
2. Objetivos ..... 15
2.1 Objetivo general ..... 15
2.2 Objetivos específicos ..... 15
3. Marco teórico ..... 16
3.1 Sistema reproductivo ..... 16
3.2 Biología floral ..... 17
3.3 Fenología ..... 18
3.4 Interacciones planta-animal ..... 19
4. Estado del arte ..... 21
5. Materiales y métodos ..... 25
5.1 Área de estudio ..... 25
5.2 Especie de estudio ..... 26
5.3 Fase de campo ..... 27
5.4 Caracterizacion de Parches ..... 27
5.5 Biología Floral ..... 28
5.5.1 Morfología floral ..... 28
5.5.2 Desarrollo Floral ..... 28
5.5.3 Receptividad estigmática ..... 28
5.5.4 Producción de néctar ..... 28
5.6 Registro fenológico ..... 29
5.6.1 Nivel de población ..... 29
5.6.2 Nivel de parche ..... 29
5.6.3 Nivel de roseta ..... 30
5.7 Sistema de reproducción sexual en *Puya nitida* ..... 30

5.7.1 Tasa de germinación de semillas de *Puya nitida* bajo condiciones de laboratorio ..... 32
5.8 Interacción planta-animal ..... 33
5.8.1 Visitantes florales ..... 33
5.8.2 Herbivoría ..... 33
5.9 Tratamiento de los datos ..... 34
6. Resultados ..... 37
6.1 Caracterización de parches ..... 37
6.2 Biología Floral ..... 38
6.2.1 Morfología floral, desarrollo Floral y receptividad estigmática ..... 38
6.2.2 Producción de néctar ..... 43
6.3 Patrón fenológico ..... 43
6.3.1 Nivel de población ..... 43
6.3.2 Nivel de parche ..... 45
6.3.3 Nivel de roseta ..... 47
6.4 Sistema de reproducción sexual en *Puya nitida* ..... 48
6.4.1 Germinación de semillas de *Puya nitida* bajo condiciones de laboratorio ..... 52
6.5 Interacción planta-animal ..... 54
6.5.1 Visitantes florales ..... 54
6.5.2 Herbivoría ..... 57
7. Discusión ..... 61
7.1 Biología Floral ..... 61
7.1.1 Morfología floral ..... 61
7.1.2 Producción de néctar ..... 63
7.2 Registro Fenológico ..... 64
7.3 Sistema de reproducción sexual en *Puya nitida* ..... 67
7.3.1 Germinación de semillas de *Puya nitida* bajo condiciones de laboratorio ..... 72
7.4 Interacción planta-animal ..... 74
7.4.1 Visitantes florales ..... 74
7.4.2 Herbivoría ..... 78
8. Conclusiones ..... 83
9. Recomendaciones ..... 85
10. Bibliografía ..... 87
11. Anexos ..... 95
Anexo A ..... 95
Anexo B ..... 95

# Lista de figuras

**Figura 5-1:** Mapa del Parque Nacional Natural Chingaza, la estrella roja indica la ubicación del sitio de muestreo. (Tomado de Vargas & Pedraza 2003)……..26

**Figura 5-2:** Promedio mensual multianual de precipitación para 43 años (1970-2013) de medición en la estación Palacio, la estación más cercana al sitio de muestreo, datos tomados del sistema de informacion hidrológica del campamento de Palacios (Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá (EAAB))……26

**Figura 5-3:** Estados Fenológicos de *Puya nitida*. A. Fruto inmaduro; B. Fruto maduro; C Fruto en proceso de dispersión de semillas……..30

**Figura 5-4:** Estados del embrión de *Puya nitida*. A y B. Semilla germinada, la flecha señala la radícula; C. Semilla con embrión en buen estado; D. Embrión dañado; E. Semilla vacía……32

**Figura 6-1:** A. Aspecto general de un parche y detalle de la formación de clones (flecha) de *Puya nitida*; B. Representación grafica de la distribución de las rosetas dentro de los parches de *Puya nitida*. Circulo vacio: roseta infértil, Circulo con punto adentro: roseta fértil, Circulo con cruz: roseta muerta……..37

**Figura 6-2:** Registro de la variación en la coloración de las flores de *Puya nitida* …….38

**Figura 6-3:** Detalle de las características diagnosticas en las diferentes fases florales de *Puya nitida*: A. Fase 0 o yema; B. Estado 1 o botón cerrado; C. Estado 2 o botón cerrado con pétalos visibles; D. Estado 3 o botón abierto; E. Estado 4 o Flor no expandida; F. Fase 5 o Flor expandida; G. Fase 6 o Inicio de la senescencia; H. Fase 7 o flor senescente……42

**Figura 6-4:** Crecimiento del androceo y gineceo según los estados florales de *Puya nitida*. Se representa la posición del estigma en relación a las anteras y la duración de cada etapa. Las figuras con círculos amarillos son las anteras sin hacer dehiscencia, los círculos amarillos con puntos naranjas son las anteras liberando polen; los triángulos y flechas de color crema son las anteras vacías y en contacto con el estigma; la figura en forma de bastón color verde con circulo verde, es el estigma inmaduro; morado, estigma recibiendo polen; y rosado estigma maduro……..42

**Figura 6-5**: Posición de las anteras en la fase cinco, evidencia del contacto con *Eriocnemis vestita* ……...43

**Figura 6-6:** Variacion mensual en el número de frutos inmaduros, frutos maduros y frutos con semillas dispersadas de *Puya nitida*……..45

**Figura 6-7:** Variación mensual en el número de botones florales y flores de *Puya nitida* y precipitación promedio en el P.N.N Chingaza……..45

**Figura 6-8:** Variación mensual en el porcentaje (%) de parches en estado fenológico de frutos inmaduros, frutos maduros y frutos con dispersión de semillas……46

**Figura 6-9:** Variación mensual del porcentaje (%) de parches con presencia de primordios florales, botones y flores……..46

**Figura 6-10:** Variación mensual del porcentaje de rosetas en estado fenológico de frutos inmaduros, frutos maduros, frutos con dispersión de semillas y flores……48

**Figura 6-11:** Porcentaje de frutos formados y no formados por cada uno de los tratamientos de polinización manual, AP (Autopolinización), GT (Geitonogamia), PCM (Polinización cruzada manual), PCN (Polinización cruzada natural), PN (Polinización natural)……50

**Figura 6-12:** Tipos de frutos formados a partir de los experimentos de polinización manual. A. Diferencias en los tamaños, B. Frutos con signos de herbivoría, C. Corte horizontal de los frutos, se muestra la falta de desarrollo de las semillas. D. Corte horizontal de los frutos, se muestra las semillas formadas .……51

**Figura 6-13:** Características de los frutos formados en los diferentes tratamientos/experimentos de polinización aplicados a *P. nitida*. PN=Polinización Natural, AP=Autopolinización, PCM=Polinización Cruzada, PCN=Polinización cruzada natural y GT=Geitonogamia. .……..52

**Figura 6-14:** Número de semillas germinadas semanalmente, por cada uno de los tratamientos…53

**Figura 6-15:** Porcentaje de semillas germinadas, viables, dañadas y vacías para el tratamiento de luz y oscuridad……...54

**Figura 6-16:** Número de registros de las especies de aves visitantes de *Puya nitida* ….....56

**Figura 6-17**: Visitantes florales más frecuentes de *Puya nitida*, mostrando su forma de la visita. A *Chalcostigma heteropogon*, B. *Eriocnemis vestita* C. *Lesbia victoriae* ……...57

**Figura 6-18:** Insectos encontrados en las estructuras reproductivas de *Puya nitida*. A Hymenoptera: Braconidae, subfamilia Opiinae, Género Opius, macho y hembra; B. Diptera: Psychodidae; C. Coleoptera, Nitidulidae; D. Diptera, Bibionidae; E. Diptera, Syrphidae; F y G. Coleoptera, Chrysomelidae …….……58

**Figura 6-19:** Estructuras reproductivas afectadas por las diferentes especies de insectos encontrados. A. Flor, se señala heces de insectos y estigma afectado; B Fruto afectado; C. Primordios de las inflorescencias……..59

**Figura 6-20:** Número de frutos y porcentaje de primordios afectados por herbivoría a través de los meses……....60

# Lista de Tablas

**Tabla 5-1:** Descripción de los experimentos de polinización usados para determinar el sistema reproductivo de *Puya nitida* (modificado de Dafni 2001)…….31

**Tabla 6-1:** Corrección de la Chi-cuadrado, para pares de experimentos de polinización, se muestran solo las diferencias significativas. AP (Autopolinización), GT (Geitonogamia), PCM (Polinización cruzada manual), PCN (Polinización cruzada natural), PN (Polinización natural)….49

**Tabla 6-2:** Características de los frutos formados en diferentes tratamientos de polinización aplicados a *P. nitida*. Las cantidades indican la media y la desviación estándar, el tamaño de la muestra se señala entre paréntesis. PN=Polinización Natural, AP=Autopolinización, PCM=Polinización Cruzada, PCN=Polinización cruzada natural y GT=Geitonogamia…….51

**Tabla 6-3:** Medidas morfológicas de los principales visitantes de *Puya nitida*……...56

# 1. Introducción

Las plantas con flor presentan una enorme diversidad con respecto a los sistemas de reproducción. Como primera medida pueden exhibir dos mecanismos para la regeneración de sus poblaciones, pueden producir descendencia tanto de forma sexual como asexual (Vallejo-Marín *et al.* 2010).

La forma más común de reproducción asexual, es la reproducción vegetativa también conocida como crecimiento clonal, en la cual una planta de genotipo parental produce a partir de sus meristemos (bulbos, raíces, etc.), nuevas unidades genética y morfológicamente similares, formando organismos modulares. El conjunto de módulos originados a partir de una única semilla o de un genotipo parental, se conoce como *genet* o individuo genético, mientras que cada uno de los módulos es llamado *ramet* o individuo fisiológico (Caswell 1985; Vallejo-Marín *et al.* 2010).

Por otro lado, la polinización es el primero de una serie de procesos que conducen a la reproducción sexual en las plantas. En sentido estricto, este término hace referencia a la transferencia de polen de un órgano sexual masculino a uno femenino (Murcia 2002). No obstante, se ha evidenciado una amplia y compleja diversificación en cuanto a las opciones de organización temporal (*dicogamia*) y espacial (*hercogamia*) de dichos órganos, tanto al nivel de la flor, como de las inflorescencias, plantas y poblaciones. Esta diversificación llevó a que se generara diferentes niveles de autopolinización o polinización cruzada (modo de apareamiento) con importantes consecuencias en la adecuación de las plantas (Barret 2002, 2010).

En algunas especies de plantas, la reproducción sexual y asexual puede ocurrir simultáneamente e interactuar de manera funcional, generando ciertas ventajas en aquellas que son perennes o resultando en diversas formas de antagonismos en otras especies.

Además, estos tipos de reproducción tienen diferentes implicaciones ecológicas y evolutivas, y proveen rutas alternativas para que los genes sean transmitidos a generaciones futuras (Vallejo-Marín *et al.* 2010).

De este modo, la reproducción clonal permite que los genotipos exitosos persistan, y eventualmente por la producción de *ramets* puedan colonizar ambientes que son adversos para la reproducción sexual, sin involucrar fases críticas como la germinación y establecimiento de plántulas. Adicionalmente, permite que por el crecimiento de la planta, puedan capturar más recursos, ocupar más espacio físico e interactuar con un gran número de especies. En el caso de la reproducción sexual, esta resulta en nuevas recombinaciones genéticas y la colonización de nuevos ambientes a través de la dispersión de semillas a grandes distancias (Mandujano *et al.* 1998; Vallejo-Marín *et al.* 2010). Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen un número de factores que causan variación en estos mecanismos de reproducción, entre ellos, la variación ambiental, la abundancia y tipo de vectores que transportan y mueven el polen, así como la interacción con otros factores bióticos y abióticos (González *et al.* 2010; Zhu & Lou 2010).

En los ecosistemas de alta montaña tropical (páramos) por ejemplo, se presentan condiciones ambientales extremas, como oscilaciones contrastantes diarias en la temperatura (días soleados con radiación solar intensa, y noches muy frías y húmedas) (Vargas & Pedraza 2003), las cuales hacen que la actividad y la disponibilidad de los polinizadores se convierta en un servicio limitado, afectando considerablemente la reproducción sexual de muchas especies de plantas (de Vos *et al.* 2012). De esta manera, cuando la escasez de polinizadores restringe este tipo de reproducción, la clonación puede ser adoptada por varias especies de plantas, y así, convertirse en una estrategia importante de regeneración en estos ecosistemas.

En el caso de los páramos colombianos se encuentran especies clónales pertenecientes a los géneros *Calamagrostis, Chusquea, Puya, Oreobulus y Aragoa* (Chaparro & Mora 2003). *Puya nitida* es una especie endémica de Colombia, distribuida en los páramos del departamento de Cundinamarca y abundante en el parque Nacional Natural Chingaza. Se caracteriza por ser una especie monocárpica perenne. Al igual que otras plantas del género *Puya*, ésta especie tiene mecanismos de regeneración por clonación. Sin embargo, no se han realizado estudios de la biología reproductiva en esta especie que examinen si la reproducción sexual, aporta de manera significativa a la regeneración de sus poblaciones, y

a raíz de esto, que dependa de polinizadores y posea diferentes mecanismos de la biología floral que contribuyan a la polinización cruzada.

De acuerdo a lo anterior, y con el fin de contribuir al entendimiento de las interacciones ecológicas en las comunidades naturales de los ecosistemas de alta montaña tropical y su efecto sobre el éxito reproductivo de *P. nitida*, el presente estudio pretende responder las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles aspectos de la biología floral contribuyen a la polinización cruzada de *Puya nitida?*
2. ¿Cómo es el patrón de la fenología reproductiva y de qué manera contribuye a la polinización cruzada en *P. nitida*?
3. ¿Cómo es el sistema de reproducción sexual en *Puya nitida*?
4. ¿Cómo es el aporte de la polinización cruzada a la reproducción sexual de *Puya nitida?*
5. ¿Cuáles son los principales visitantes florales y cómo contribuyen a la polinización cruzada en *Puya nitida?*

# 2. Objetivos

## 2.1 Objetivo general

- Evaluar las estrategias de la reproducción sexual de *Puya nitida* en el páramo del Parque Nacional Natural Chingaza.

## 2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el patrón fenológico y la biología floral de *Puya nitida.*
- Identificar el sistema de reproducción sexual de *Puya nitida*
- Identificar los principales visitantes florales y su aporte a la reproducción de *Puya nitida.*

# 3. Marco teórico

En algunas especies de plantas la reproducción sexual y asexual puede ocurrir simultáneamente e interactuar, no obstante, cada una de ellas posee diferentes efectos a nivel ecológico y evolutivo. Así, la reproducción clonal permite el mantenimiento y la expansión de poblaciones locales y la persistencia de los genotipos exitosos (Mandujano *et al.* 1998; Mendoza & Franco 1998), y se puede considerar como una estrategia que tiende a maximizar el valor adaptativo de los individuos genéticos (*genets*), al permitirles participar en varios eventos de reproducción sexual (Chaparro & Mora 2003). Mientras que la reproducción sexual resulta en nuevas recombinaciones genéticas y en la colonización de nuevos ambientes a través de la dispersión de las semillas (Mandujano *et al*. 1998).

El aporte de la reproducción sexual al crecimiento o éxito de las poblaciones, depende inicialmente de la efectividad de procesos como la polinización, el cual a su vez, obedece a ciertos aspectos que están involucrados y que lo determinan como tal, entre ellos se pueden mencionar el sistema reproductivo, la biología floral, la fenología y los visitantes florales (Barret 2002, Murcia 2002).

## 3.1 Sistema reproductivo

Las plantas con flor presentan una gran diversidad de patrones y sistemas de apareamiento debido principalmente a las siguientes razones (Lloyd & Schoen 1992; Barret & Harder 1996; Vogler *et al*. 1998; Murcia 2002; Travers *et al.* 2004; Raduski *et al*. 2011; Karron *et al.* 2012):

1) Los órganos sexuales masculinos y femeninos pueden estar juntos o separados en diferentes niveles de organización, tales como a nivel de flor, inflorescencia,

individuo y población, y adicionalmente, ser funcionales en los mismos o diferentes intervalos de tiempo (dicogamia, hercogamia).

2) El sistema reproductivo depende del grado de autoincompatibilidad. La presencia de flores con los dos sexos (hermafroditas) no implica que la planta sea capaz de autofecundarse, ya que las plantas emplean mecanismos genéticos para reconocer o rechazar el polen propio (típicamente controlado por el locus multialelico S).

3) Los sistemas de reproducción pueden variar entre las poblaciones e incluso entre los individuos, como resultado de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, edad de la flor, condiciones internas del estilo, disponibilidad de vectores, limitación de polen, etc.) y /o genéticas (mutaciones o polimorfismos en locus multialélico S)).

4) Debido a su inmovilidad las plantas requieren vectores para trasferir sus gametos masculinos (polen) entre los individuos. Esta dependencia promueve la evolución de diversas adaptaciones florales asociadas con los agentes particulares de dispersión del polen (animales, viento y agua).

5) En el caso de vectores animales, el éxito de la polinización depende de la cantidad y calidad de los granos de polen compatibles, depositados en el estigma de la planta luego de ser visitados, de la frecuencia y duración de las visitas, del uso del hábitat, la morfología del animal y del grado de contacto que haya tenido con las partes reproductivas de la flor, entre otras (Murcia 2002; Roca & Sazima 2013).

## 3.2 Biología floral

Con respecto a la biología floral, esta está relacionada con el análisis de las características morfológicas de las flores, del desarrollo floral, la receptividad estigmática, antesis, duración de la flor, presentación y viabilidad del polen, ofrecimiento de recursos como el néctar para visitantes y polinizadores, entre otros (Murcia 2002).

Debido a que los polinizadores ejercen presiones de selección sobre la evolución de dichas características, es posible que exista un cierto grado de correspondencia entre la forma y el color de una flor y el tipo de animal que la visita y poliniza; a esto se le ha denominado

"síndromes de polinización", los cuales fueron descritos inicialmente por Vogel y Faegri y Van der pjil (Murcia 2002, Ollerton *et al.* 2009).

Dichos síndromes han servido como hipótesis teóricas en muchos estudios para evaluar su valor predictivo, usando una gama de rasgos florales y sin tener conocimiento previo de los polinizadores (Ollerton *et al.* 2009). No obstante, los síndromes de polinización, han sido motivo de discusión, ya que estos parecen ser más bien la excepción a la regla debido a que: 1) muchas especies de plantas son visitadas y polinizadas por un amplio y diverso espectro de especies animales; 2) hay rasgos florales que son difíciles de interpretar y de asociar a ciertos grupos funcionales de polinizadores; 3) las interacciones planta polinizador pueden ser alteradas por las condiciones ambientales, transformaciones antropogénicas, introducción de especies exóticas, entre otras; 4) las adaptaciones florales pueden ser también influenciadas por visitantes antagonistas como herbívoros y ladrones de néctar, por una mezcla de polinizadores de diferentes grupos funcionales, y/o por efectos pleiotrópicos de otros rasgos de la planta; y 5) las interacciones son de corta duración y están determinadas por la longitud de la estación de la floración. Así, la densidad relativa de las flores y polinizadores puede variar en una misma estación y entre una estación y otra (Vaquez & Aizen 2004; Gómez & Perfectii 2009; Ollerton *et al.* 2009).

## 3.3 Fenología

La fenología es el estudio de la periodicidad de las diferentes fases que ocurren en el ciclo de vida de los organismos. En las plantas se ha reconocido principalmente la fenología de las hojas, la fenología floral y la fructificación, a partir de las cuales se pueden describir diferentes patrones de acuerdo a la frecuencia, sincronía, duración y la regularidad con que esas ocurren, y a su vez, ser detallados en cada uno de los niveles de organización encontrados. Por ejemplo, en la fenología floral, cada uno de los patrones (frecuencia, la duración, la sincronía y la regularidad) pueden ser reconocidos a nivel de la flor, inflorescencia, rama, población, gremio, comunidad, etc. (Newstrom *et al.*,1994; Fenner 1998; Sakai 2001).

Por otro lado, dichos patrones pueden variar de acuerdo a las condiciones ambientales abióticas como la temperatura, la humedad, la duración del día, las épocas de lluvia, etc; por factores bióticos como interacciones con herbívoros, polinizadores, dispersores de

frutos y semillas, e interacciones de facilitación y competencia interespecífica o intraespecífica por estos y otros recursos (Fenner 1998; Sakai 2001; Ramírez 2002).

Asimismo, existe una gran variedad de términos que permiten describir los patrones fenológicos, sin embargo, en muchas ocasiones estos son usados indiferentemente para definir el mismo patrón, lo cual conduce a descripciones ambiguas y confusas (Newstrom *et al.,*1994; Sakai 2001). A partir de esto, Newstrom *et al.,* (1994) resaltaron la importancia de estandarizar un sistema de clasificación cuantitativo para definirlos, especialmente en el trópico donde son difíciles de detectar por su complejidad e irregularidad. Por consiguiente, estos autores generaron una clasificación basados en tres aspectos principales, como son: la frecuencia (continua, subanual, anual y supranual), la regularidad (regular o irregular) y la duración (breve (< 1 mes), intermedia (1- 5 meses) y extendida (> 5 meses)), los cuales pueden ser aplicados a cualquier nivel de análisis (flor, inflorescencia, ramas, individuo, población, comunidad, gremios).

## 3.4 Interacciones planta-animal

Las plantas pueden experimentar simultáneamente interacciones mutualistas, como la polinización y la dispersión de frutos y semillas, y antagonistas como la herbivoría, el robo de néctar y la depredación de semillas (Cariveau *et al*. 2004).

En el caso de los polinizadores, estos pueden variar en cuanto a su eficiencia, de acuerdo su morfología, frecuencia y comportamiento al momento de realizar la visita. A su vez, el comportamiento de los polinizadores puede estar influenciado por la disponibilidad y distribución de las recompensas, los ciclos circadianos que promueven pulsos de actividad nocturnos, diurnos, etc; y las condiciones físicas y ambientales como lluvias, tormentas, nubosidad, vientos, humedad, temperatura, entre otros (Williams & Adam 2000).

Así por ejemplo, dentro de poblaciones de plantas cuyo recurso está disperso, las visitas tienden a ser reducidas, porque estos animales requieren de un gasto energético y de tiempo mayor al moverse a grandes distancias entre las flores; contrario a lo que ocurre cuando el recurso es denso y agrupado, donde los polinizadores tienden a establecer territorios o concentrar sus movimientos a áreas pequeñas (Ayre *et al*. 2005; García-Meneses & Ramsay 2012).

El cambio de comportamiento de forrajeo en respuesta a la densidad de recursos, trae como consecuencia la afectación de procesos como la receptividad de polen, fecundación de óvulos y producción de semillas viables, lo cual se ve representado finalmente en el éxito reproductivo de la planta (Elliott & Irwin 2009).

Entre las interacciones no mutualistas se puede mencionar el robo de néctar y la depredación de flores y estructuras relacionadas (Irwin 2009). El robo de néctar hace referencia al comportamiento de forrajeo, efectuado por algunos animales que acceden al néctar de manera ilegitima, realizando agujeros en las bases de las corolas de las flores y evitando entrar en contacto con las partes reproductivas de la flor (Irwin 2003).

La florivoría es un tipo de daño causado por el consumo de botones florales y flores maduras antes del desarrollo de las semillas. Incluye el daño a brácteas, sépalos, pétalos, estambres, pistilos y óvulos, es decir, estructuras relacionadas fuertemente con el potencial reproductivo de las plantas (McCall & Irwin 2006). Tanto el robo de néctar como la florivoría pueden tener efectos directos e indirectos, positivos, neutrales y negativos sobre el éxito reproductivo de las plantas (Yanwen *et al.* 2008; McCall & Irwin 2006).

La depredación pre-dispersión de semillas se caracteriza por el consumo de frutos y semillas cuando estas no están completamente maduras y aún no se han dispersado (Ramírez & Traveset 2010). Al igual que los otros tipos de depredación, puede tener efectos sobre el éxito reproductivo de las plantas, y más aún si se tiene en cuenta que el daño a las semillas puede ser más costoso que el daño a estructuras florales, puesto que probablemente los óvulos fertilizados son más valiosos que aquellos que están sin fertilizar (McCall & Irwin 2006).

# 4. Estado del arte

Bromeliaceae es una familia de plantas monocotiledoneas nativas del Neotrópico, con una extensión de unas pocas especies al sur de Estados Unidos. Están clasificadas en tres subfamilias (Pitcairnioideae, Bromelioideae y Tillandsioideae) que comprenden cerca de 60 géneros y 2900 especies descritas. La mayoría de las especies son epífitas, pero también las hay terrestres, las cuales crecen en el suelo o sobre la superficie de rocas (Frank & Lounibos 2009).

*Puya* es un género de la familia Bromeliaceae y pertenece a la subfamilia Pitcairnioideae. Comprende plantas terrestres, arrosetadas, acaules o cortamente caulescentes, espinosas, que producen inflorescencias terminales y mueren durante el proceso de fructificación y dispersión de semillas (Smith & Downs 1974). Consta de 185 especies distribuidas desde Costa Rica hasta Chile, principalmente concentradas en la cordillera de los Andes, desde el nivel del mar hasta los 5000 msnm. Las especies de este género son generalmente las únicas bromelias que habitan las comunidades de frailejonal-pajonal propias de los páramos andinos (Varadarajan 1990).

Dentro de los estudios a nivel nacional e internacional donde referencian a especies de este género, se encuentran los siguientes:

Vadillo *et al.* (2004) evaluaron la viabilidad y germinación de las semillas de *Puya raimondii* bajo condiciones de laboratorio. Encontrando que la viabilidad depende de las condiciones en que estuvieron expuestas *in situ;* y la germinación, de las condiciones de luz y temperatura impuestas, ya que las semillas presentaron alto poder germinativo cuando eran expuestas a la luz (fotoblásticas positivas, requieren luz para germinar) y sometidas a temperaturas menores a 21 °C.

Salinas *et al.* (2007) evaluaron la importancia del néctar de las bromelias *Puya rainmondii* y *P. rauhii* como recurso para los picaflores altoandinos de la región de Ancash, Perú, determinando que estas especies de *Puya* proporcionan un importante recurso alimenticio para los picaflores presentes en este sitio, ya que el 80 % y el 31% de las cargas de polen obtenidas de estas aves, correspondían a las especies de *Puya* mencionadas, respectivamente.

González *et al.* (2010) evaluaron los patrones de la biología reproductiva de *Puya clava-herculis* y *Puya cryptantha* en dos áreas paramunas en el departamento de Nariño. Encontraron que el sistema reproductivo que prevalece en estas dos especies es la autocompatibilidad, lo cual está relacionado con su longevidad, así como con la cantidad de eventos reproductivos en su ciclo de vida.

García-Meneses & Ramsay (2012) examinaron el efecto del tamaño del parche y el contexto espacial de *Puya hamata,* sobre el éxito reproductivo (producción de flores, frutos y semillas y tasa de germinación) y la respuesta comportamental de los colibríes visitantes de esta especie de planta, en los pastizales de los páramos contiguos, El Ángel y Volcán Chiles, en la frontera Ecuador-Colombia. Determinando, que las inflorescencias aisladas de *P. hamata* fueron visitadas por una alta diversidad de colibríes ruteros, mientras que las plantas agregadas fueron visitadas exclusivamente por especies territoriales. Asimismo, encontraron que el contexto espacial no afectó el número de flores, frutos y semillas producidas, pero si la viabilidad y germinación de las semillas, lo que condujo a que el éxito reproductivo fuera más alto en plantas aisladas y en bordes, que en plantas en el centro de parches grandes.

Hornung-Leoni *et al*. (2013) estudiaron cinco especies de *Puya*, en los departamentos de Ancansh y Canchayllo, Perú *(Puya raimondii),* y en la de costa de Chile central y en Chile central (*Puya alpestris*, *Puya chilensis*, *Puya coerulea,* y *Puya venusta*), con el fin de determinar si había relación entre las aves visitantes con respecto a la morfología de la planta (tamaño de las flores, presencia de apéndice estéril) y las características del néctar (volumen, concentración y composición de azucares). Dichos autores encontraron diferencias entre las especies de *Puya*, definiendo tres grupos bien diferenciados. El primero consistió en aquellas especies que poseían el apéndice estéril y producen de grandes cantidades de néctar diluido (*P. chilensis* y *P. alpestris*) y que fueron visitadas principalmente por paseriformes; el segundo conformado por las especies que no tenían el

apéndice estéril y producían néctar concentrado (*P. coerulea* y *P. venusta*), visitadas principalmente por colibríes; y el tercero se encuentra solo a *P. raimondii* que produjo grandes cantidades de néctar concentrado y fue visitada por colibríes y paseriformes. Este estudio les permitió resaltar la importancia de la interacción entre los rasgos morfológicos, las características del néctar y los visitantes, y finalmente para explicar los sistemas de polinización especializados y generalizados.

Por otro lado, la cordillera Oriental Colombiana hace parte de uno de los centros de diversidad reconocidos para el género *Puya* (Varadarajan 1990). Para esta zona se han registrado ocho especies, seis de las cuales están en el P.N.N Chingaza (*Puya cryptantha, P. lineata, P. nitida, P. trianae, P. goudotiana* y *P. santosii*) (Betancur 2001). Entre algunas de las investigaciones realizadas en esta zona y especies se encuentran los efectuados por:

Chaparro & Mora (2003) evaluaron el aporte de la reproducción sexual y asexual en la dinámica de una población de rosetas de *Puya cryptantha* en el P.N.N Chingaza, afirmando que la reproducción clonal permite aumentar la probabilidad de supervivencia y longevidad del individuo genético, y la reproducción sexual permite un crecimiento poblacional elevado, especialmente en periodos de picos de floración y cuando las condiciones para la germinación y el establecimiento son adecuadas.

Chaparro (2005) determinó el sistema reproductivo, la fenología y el desarrollo floral de una población de *P. trianae* en el P.N.N Chingaza, encontrando, que el sistema reproductivo es autocompatible, el pico de floración ocurre durante la época húmeda y las flores son hermafroditas con protoginia incompleta, por lo que *P. trianae* presenta tanto polinización cruzada como autopolinización.

Lara & Bonilla (2006) trataron algunos aspectos sobre la biología reproductiva de una población de *Puya trianae,* en la reserva municipal de Cogua, Cundinamarca, encontrando una separación espacio-temporal de los órganos reproductivos (protoginia) en las flores a partir del inicio de la antesis, y un sistema reproductivo autocompatible, lo que permitió a las inflorescencias autopolinizarse y ser fecundadas con polen foráneo.

Mora *et al.* (2007) tuvieron en cuenta la dinámica de la germinación, la latencia de semillas enterradas y el reclutamiento a partir de semillas diseminadas en condiciones naturales en

dos poblaciones de *Puya cryptantha* y *P. trianae,* sugiriendo que la germinación está asociada a la llegada de la época de lluvias y a factores abióticos como la luz; que al cabo de un año parte de las semillas se encuentran en un estado de latencia impuesta, y finalmente que ambas especies tienen la capacidad de formar bancos de semillas persistentes.

En el caso de *Puya nitida,* esta es una especie endémica de Colombia, distribuida en el subpáramo y páramo de la cordillera oriental del departamento de Cundinamarca, presente en el P.N.N Chingaza generalmente en suelos bien drenados (Betancur 2001, obs. pers.), actualmente se encuentra dentro de la categoría de amenaza casi amenazada (NT) según el libro rojo de plantas de Colombia (García & Galeano 2006).

En la actualidad, solo existe un trabajo a nivel de comunidad donde se mencionan algunos aspectos de la ecología de dicha especie de planta. Este fue realizado por Gutiérrez (2005), quien estudió la organización espacial y temporal de la comunidad de colibríes y sus plantas en el bosque alto-andino y sub-páramo de la cordillera oriental colombiana en Torca (Cundinamarca). Allí, se refiere a la familia Bromeliaceae y especialmente a *Puya nitida* como una de las especies de plantas con una floración estacional importante para la dieta de por lo menos cinco especies de colibríes en la zona de sub-páramo.

# 5. Materiales y métodos

## 5.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el Parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca), específicamente en el sector de Piedras Gordas, en Jurisdicción del municipio de La Calera, cerca del camino que conduce a las lagunas de Buitrago, a 3400 m de elevación (Figura 5-1). Cartográficamente se encuentra ubicado entre los 04º 44’ 15,1” N y 73º 50’ 28,52” W. Posee una temperatura media anual entre los 7 y 10 º C y un régimen de precipitación unimodal, presentando las épocas de máxima precipitación entre junio y julio, y mínimas entre enero y febrero (Figura 5-2).

El sitio de muestreo tiene un área de 0,06 $km^2$, se encuentra localizado en zonas de ladera con una pendiente aproximada de 40º con respecto a la horizontal. La vegetación se caracteriza por la presencia de especies de la familia Hypericaceae como *Hypericum* sp., de la familia Ericaceae: *Macleania rupestris, Disterigma empetrifolium*, *Gaultheria anastomosans,* la familia Asteraceae: *Espeletia grandiflora,* entre otras especies como *Puya goudotiana*, *Calamagostris* sp. y *Aragoa corrugatifolia* pertenecientes a las familias Bromeliaceae, Poaceae, Rubiaceae, respectivamente.

**Figura 5-1:** Mapa del Parque Nacional Natural Chingaza, la estrella roja indica la ubicación del sitio de muestreo. (Tomado de Vargas & Pedraza 2003).

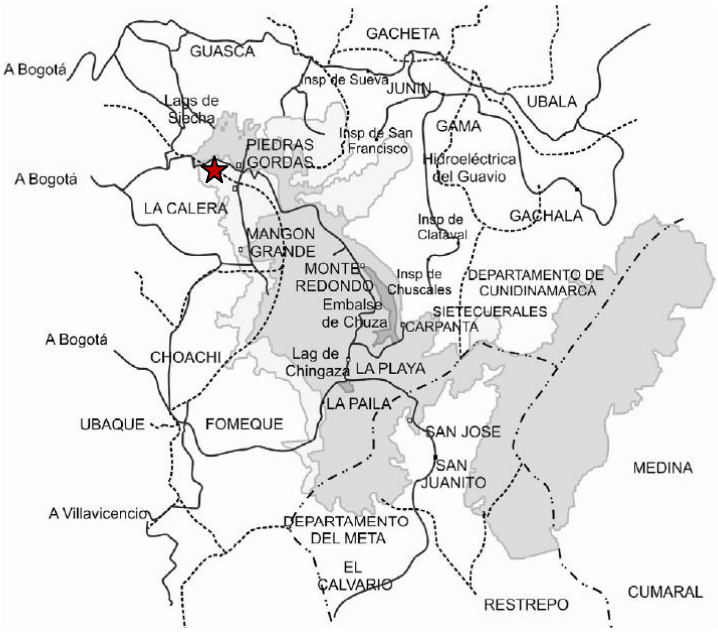
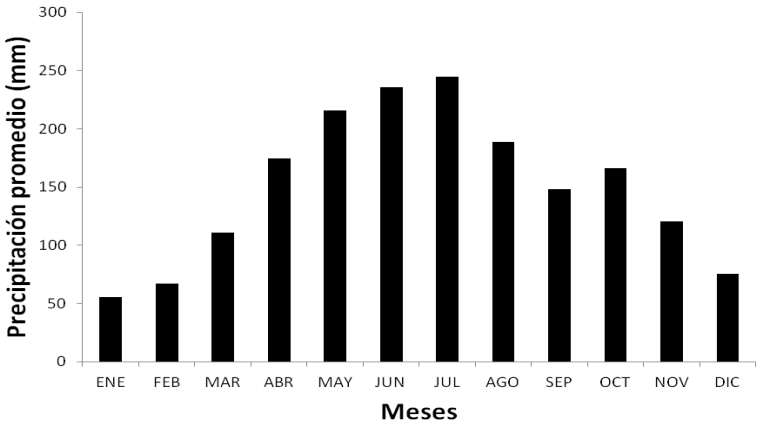



**Figura 5-2:** Promedio mensual multianual de precipitación para 43 años (1970-2013) de medición en la estación Palacio, la estación más cercana al sitio de muestreo, datos tomados del sistema de informacion hidrológica del campamento de Palacios (Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá, EAAB).




## 5.2 Especie de estudio

*Puya nitida* es una bromelia terrestre perteneciente a la submalia Pitcairnioideae, endémica de Colombia, distribuida en los páramos del departamento de Cundinamarca. Presenta reproducción clonal, produciendo un conjunto de módulos originados a partir de un genotipo parental. Posee plantas arrosetadas, con inflorescencias terminales que mueren

luego del proceso de fructificación y dispersión. Si bien, cada roseta es monocarpica, los clones le confieren un carácter policárpico al individuo genético.

*Puya nitida* presenta hojas organizadas en forma de roseta, lanceoladas, de aproximadamente 30 cm de largo, glabras, con margenes espinosos. Inflorescencia terminal de tipo racimo, con raquis, bracteas y caliz con alta densidad de pelos dendroides cafes. Flores hipóginas, zigomorfa, sépalos libres, extremadamente con indumento, pétalos de 5 a 6 cm de largo, de color verde amarillo a violeta. Filamentos libres de la corola, elongados, blancos, anteras color amarillo intenso a naranja. Estilo trífido. Fruto capsular, subgloboso, café oscuro a negro. Semillas aladas (Smith & Dawns 1974; Chaparro & Mora 2003; Pedraza-Peñalosa *et al.*2005).

## 5.3 Fase de campo

El trabajo de campo tuvo una duración de doce meses, entre febrero 2013 y febrero 2014. Se realizaron 17 salidas de campo, una por mes, excepto los meses de noviembre y diciembre en los cuales se hicieron cuatro y dos salidas respectivamente. Cada una de las salidas tuvo una duración entre tres a seis dias.

## 5.4 Caracterizacion de Parches

Al inicio del estudio (Febrero 2013) se hizo una caracterización a 46 parches seleccionados previamente. A cada uno de ellos se les midió el área aproximada en $m^2$ y se les registró el número de rosetas fértiles, rosetas infértiles y rosetas muertas por cada uno. Adicionalemente, se les realizó un mapa de la distribución, representando la ubicación de la roseta dentro del parche. Las rosetas infertiles se graficaron como circulos vacios, las rosetas fértiles círculos con un punto en el centro y las rosetas muertas producto de floraciones y fructificaciones pasadas, con un circulo y una equis (x) en el centro.

## 5.5 Biología Floral

### 5.5.1 Morfología floral

Con el fin de definir y caracterizar cada uno de los estados florales y estimar el grado de expresión sexual, es decir, si existía dicogamia o separación temporal de la fase masculina y femenina y hercogamia o separación espacial del androceo y gineceo, se seleccionaron 67 flores frescas en varias fases florales (botones, flores jóvenes, flores maduras, marchitas). A cada una de las flores se les tomaron medidas morfológicas como: longitud de la flor, longitud de los pétalos, ancho de la corola, longitud del estambre, longitud de la antera, longitud del estilo, distancia desde la antera al estigma, y finalmente el largo y ancho del ovario.

De igual forma, para cada uno de los estados florales, se tuvo en cuenta: 1) el desarrollo y crecimiento del androceo con respecto al gineceo, 2) si las anteras estaban o no maduras (presentando como signo de madurez la dehiscencia y liberación de polen de las mismas); y 3) si la flor producía o no néctar en el estado en particular.

### 5.5.2 Desarrollo Floral

Con el fin de seguir el desarrollo de la flor y definir la duración en cada una de los estados o etapas de la misma, a diez botones florales previamente marcados, se les realizaron observaciones diarias.

### 5.5.3 Receptividad estigmática

La receptividad del estigma se evaluó mediante pruebas de reacción a la peroxidasa con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), en cinco flores por cada uno de los cuatro primeros estados florales, siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez-Riaño & Dafni (2000). Se tuvo en cuenta el número de estigmas cuya superficie se tiñó de color purpura, considerando dicha tinción como signo de receptividad.

### 5.5.4 Producción de néctar

Con el fin de estimar la cantidad y calidad del néctar como recompensa floral para los visitantes florales, se midió el volumen y la concentración de néctar en 24 flores en antesis

seleccionadas aleatoriamente, mediante capilares calibrados a 5µl y un refractómetro de mano con rango de variación en grados Brix de 0 a 32%, respectivamente.

## 5.6 Registro fenológico

El registro fenológico se realizó mensualmente desde febrero del 2013 hasta febrero del 2014, en diferentes niveles de organización, tales como, a nivel de población, parche y roseta. En cada uno de estos niveles se describieron patrones basados en las definiciones dadas por Frankie *et al.,* (1994) como frecuencia, sincronia, duración y regularidad con que ocurrian estados fenológicos como la floración, la fructificación y la dispersión de semillas. Para describir dichos patrones, se marcaron con cinta fluorescente 71 rosetas fértiles en 46 parches. El parche se definió como el resultado de densas agrupaciones de rosetas fértiles, infértiles y/o muertas producto de la reproducción por clones.

### 5.6.1 Nivel de población

Mensualmente se estimó el número total de primordios florales, botones, flores, frutos inmaduros (frutos de color verde con pétalos persistentes que lo cubren), frutos maduros (frutos color café oscuro a negro, con línea de dehiscencia marcada en cada uno de los lóculos) y frutos dehiscentes. Para cada uno de estos estados fenológicos, se logró identificar patrones como: 1) **Frecuencia**, definida como el número de ciclos *"on"/"off"* del estado fenológico, por año. Esta puede clasificarse como continuo (p. ej. floración durante todo el año, con lapsos muy cortos y esporádicos sin floración), subanual (p. ej. periodos de floración con inicio y fin bien definidos, con dos o mas eventos por año), anual (sólo un periodo por año, con inicio y fin bien definidos), y supra-anual (p. ej. floraciones con lapsos de mas de un año entre eventos), 2) **Duración,** donde el estado fenológico puede ser clasificado como breve (< 1 mes), intermedio (2- 5 meses) o prolongado (> 5 meses) y 3) **Regularidad,** es decir, si el estado fenológico se presenta en el mismo lapso de tiempo (regular, irregular) (Figura 5-3).

### 5.6.2 Nivel de parche

Mensualmente se estimó el porcentaje de parches que se encontraban en un estado fenológico determinado (primordios de las inflorescencias, botones y flores, frutos inmaduros, frutos maduros y frutos dehiscentes).

### 5.6.3 Nivel de roseta

Se contó el número de botones, flores, frutos inmaduros, frutos maduros y frutos con semillas dispersadas por roseta. Se estimó el porcentaje mensual de rosetas que estaban en estado de frutos inmaduros, frutos maduros, frutos en dispersión de semillas y flores.

Por otro lado, a 69 rosetas fértiles, incluidas en 41 parches, se les calculó la longitud total y parcial de la inflorescencia, teniendo en cuenta la primera, como la longitud desde la parte del escapo que sobresale de la roseta, hasta el ápice de la porción reproductiva; y la segunda, como la longitud de la porción reproductiva de la inflorescencia. Además, se midió la longitud de la hoja más larga, como un estimativo del tamaño de la planta.

Adicionalmente, con el fin de hacer una estimación del número de semillas formadas a nivel de fruto y roseta, se calculó el número de semillas promedio a partir de quince frutos seleccionados de manera aleatoria.

**Figura 5-3:** Estados fenológicos de *Puya nitida*. A. Fruto inmaduro; B. Fruto maduro; C Fruto dehiscente.

## 5.7 Sistema de reproducción sexual en *Puya nitida*

El sistema reproductivo se evaluó mediante experimentos de polinización, en una muestra de 75 flores pertenecientes a diez parches y doce individuos. Se usaron botones florales próximos a la antesis, los cuales fueron marcados con cintas de colores (un color diferente para cada uno de los tratamientos) y aislados antes y después de efectuar las polinizaciones (en aquellos que se requería) con bolsas de tela tul, para evitar los visitantes florales y el ataque por herbivoría. En la Tabla 5-1 se describe cada tipo de tratamiento.

*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Tabla 5-1**: Descripción de los experimentos de polinización usados para determinar el sistema reproductivo de *Puya nitida* (modificado de Dafni 2001).

| TRATAMIENTO | TAMAÑO DE LA MUESTRA (n) | MÉTODO |
|---|---|---|
| **Autopolinización (AP)** | 19 | La fuente de polen se toma de la misma flor. Con embolsamiento. |
| **Geitonogamia (GT)** | 8 | La fuente de polen se toma de otra flor de la misma inflorescencia. Con emasculación y embolsamiento. |
| **Polinización cruzada manual (PCM)** | 18 | La fuente de polen se toma de otra roseta de más de 20 mt de distancia. Con emasculación y embolsamiento. |
| **Polinización cruzada natural (PCN)** | 10 | La flor se deja expuesta a los visitantes. Con emasculación y sin embolsamiento. |
| **Polinización natural (PN)** | 20 | Ensayo en condiciones naturales. Sin emasculación ni embolsamiento. |

Para valorar el éxito de cada uno de los experimentos, se estimó el número de los frutos formados (*Fruit -set*) y la calidad de estos, teniendo en cuenta variables como la altura, el ancho, y el peso. De igual forma, se consideró la tasa de autocompatibilidad mediante el índice propuesto por Zapata & Arroyo (1978) en Dafni (2001), donde:

$$\textbf{ISI} = \frac{\text{Frutos producidos por autopolinización}}{\text{Frutos producidos por polinización cruzada}}$$

Los valores del ISI indican:

> 1 = Autocompatible

> 0.2 < = Parcialmente autocompatible

< 0.2 = En su mayor parte autoincompatible

0 = Totalmente autoincompatible

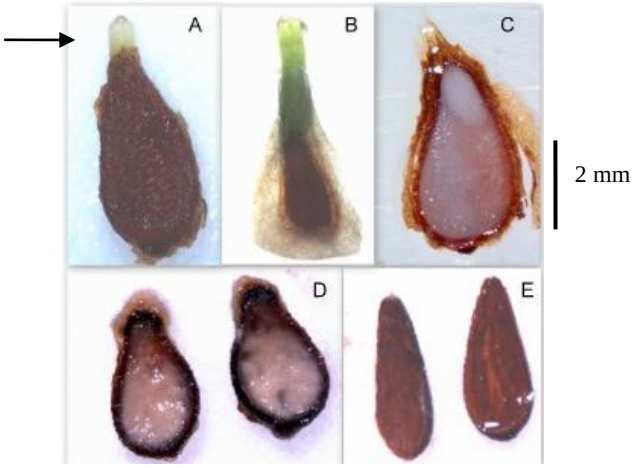
### 5.7.1 Tasa de germinación de semillas de *Puya nitida* bajo condiciones de laboratorio

Para evaluar el éxito de la polinización natural en la población de *P. nitida*, se calculó la tasa de germinación y viabilidad de sus semillas bajo condiciones de laboratorio, durante dos meses (siete semanas)**.**

A partir de 16 frutos, se tomaron de manera aleatoria 100 semillas por cada uno, las cuales fueron mezcladas y agrupadas en un solo lote de 1.600 semillas. Luego, estas se distribuyeron en 32 cajas de petri, cada una con grupos de 50 semillas, las cuales estuvieron bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura (temperatura promedio de 21º C y humedad relativa de 80% aproximadamente).

Por otro lado, con el fin de evidenciar los requerimientos básicos (luz) para la germinación de esta especie de planta, la mitad de las semillas (800 semillas- 16 cajas de petri) fueron sometidas a condiciones de luz, y la otra mitad a condiciones de oscuridad, cubriéndolas con papel aluminio. Semanalmente se revisó y contó el número de semillas germinadas (aparición de radícula) en cada uno de los tratamientos, aquellas semillas que no germinaron luego de siete semanas de observación, se cortaron transversalmente y se les revisó el estado del embrión, determinando si estas tenían el embrión en buen estado, si estaban vacías o dañadas (Figura 5-4). Aquellas semillas que tenían el embrión en buen estado aparente, se les realizó una prueba de viabilidad con el método de Tetrazolium al 1% durante 48 horas. Luego, los embriones que se tiñeron de color fucsia, fueron determinados como viables.

**Figura 5-4:** Estados del embrión de *Puya nitida*. A y B. Semilla germinada, la flecha señala la radícula; C. Semilla con embrión en buen estado; D. Embrión dañado; E. Semilla vacía.



# 5.8 Interacción planta-animal

## 5.8.1 Visitantes florales

Debido a que las aves son los principales visitantes florales de *P. nitida*, se realizaron siete jornadas de observaciones focales a individuos florecidos de esta especie de planta (un individuo por jornada), durante el pico de floración del año 2013, en los meses de noviembre y diciembre. Cada jornada tuvo una duración de cuatro horas, distribuidas en intervalos de 06:00h -10:00h, acumulando un total de 28 horas de observación. Para cada visitante de las inflorescencias, se registró la especie, la hora de llegada, la duración de la visita, número de flores visitadas y por último la forma de la visita.

De igual manera, se visitó el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, específicamente la colección de Ornitología, para tomar medidas morfológicas como longitud del culmen total, longitud del ala y longitud total, de ejemplares de especies de aves que fueron observadas en campo, y de esta manera poder comparar la morfología entre las especies y establecer una relación entre la morfología de las aves y el tamaño de las flores, con su forma de la visita.

## 5.8.2 Herbivoría

Para analizar la incidencia de la herbivoría sobre la reproducción sexual de *P. nitida*, se describió el tipo de herbivoría tanto de las estructuras vegetativas como reproductivas (primordios florales, flores, frutos y semillas) de esta especie de planta, y mensualmente se registró el número de frutos y de primordios de las inflorescencias con signos de depredación.

Adicionalmente, para el caso de los primordios, se definieron tres niveles de depredación de acuerdo al porcentaje de afectación en dicha estructura. Así, el nivel 1 incluyó aquellos que presentaron daños en el 100% o 3/3 partes del primordio, el nivel 2 en el 66% (2/3 partes) y el nivel 3 en el 33% (1/3). Posteriormente, se cuantificó, la proporción de primordios afectados en cada uno de los niveles de depredación.

Así mismo, para identificar los herbívoros que los estaban afectando, se recolectaron algunas de estas estructuras reproductivas. En el caso de los insectos adultos, estos fueron conservados en alcohol al 70%; con respecto a las larvas, estas se criaron en condiciones

de laboratorio, con el fin de que pudieran ser identificadas taxonómicamente en la fase adulta.

## 5.9 Tratamiento de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa R versión 3.0.1 (2013), con el cual se aplicó tanto estadística paramétrica como no paramétrica según el caso, usando, los paquetes: Nortest, Mtvnorm, Class, VGAM, Splines, Stats4, Lawstat, Car, Multcomp, Survival, E1071, Stats y Ltm (Anexo B).

Debido a que los datos presentaron distribución normal (Kolmogorov- Smirnov, Shapiro-Wilk $p > 0,05$) y homogeneidad de varianzas (Levene $P > 0,05$) se usó estadística paramétrica, en las siguientes situaciones:

1) Con el fin de observar si había diferencias significativas en el tamaño de las estructuras de la flor (corola, pétalos, estambre, antera, estilo, ovario), y verificar si existía variación en la separación espacial del androceo y gineceo (distancia estigma-estambre, hercogamia) a través del desarrollo de la flor, se realizó una ANOVA unifactorial.

2) Para determinar si habia diferencias significativas en la calidad de los frutos producidos a partir de los experimentos de polinización, se realizó una ANOVA unifactorial con las transformaciones de ln, $x^3$ y $1/x^2$ para las variables de peso, altura y ancho de los frutos, respectivamente.

3) Para observar si existia diferencias en cuanto a la duración de la visita, con respecto a las especies de aves observadas, se usó una ANOVA unifactorial con una transformacion de ln.

Por su parte, se usó estadística no paramétrica debido a que los datos no presentaron distribución normal (Kolmogorov- Smirnov, Shapiro- Wilk $p < 0,05$) y homogeneidad de varianzas (Levene $P < 0,05$) en las situaciones dadas a continuación:

1) Para evaluar el patrón fenológico a nivel de población se realizó una ANOVA de Friedman, especificamente, para analizar si hubo diferencias significativas entre el

número de frutos inmaduros, frutos maduros, frutos en dispersión de semillas, botones florales, y flores, en los meses de estudio.

2) Para evaluar si hubo diferencias en el número de frutos inmaduros, frutos maduros, frutos en dispersión de semillas, botones florales, y flores entre las rosetas analizadas, se hizo una Kruskal-Wallis.

3) Asimismo, con el fin de comparar la frecuencias de las visitas, el número de flores probadas y las medidas morfológicas entre las especies de aves registradas se realizó una Kruskal-Wallis.

4) Para analizar la incidencia de la herbivoria sobre la reproduccion sexual de *P. nitida* y observar si existia diferencias significativas en el número frutos y de primordios de las inflorescencias con signos de herbivoria, a través de los meses, se utilizó una ANOVA de Friedman, y una Kruskall-Wallis, para comparar el porcetaje de frutos depredados entre las rosetas.

5) Para determinar si habia diferencias significativas en el número de semillas germinadas por semana, en cada uno de los tratamientos aplicados (luz y oscuridad), se empleó una ANOVA de Friedman. Adicionalmente, se hizo una prueba de Wilcoxon como un test *postc hoc* entre pares de semanas, para observar entre cuales se presentaron diferencias significativas.

6) Con el proposito de comparar el número de semillas germinadas entre los tratamientos de germinación de semillas (luz y oscuridad), se empleó una prueba de U Mann-Whitney.

7) Asimismo, para estimar si hubo diferencias significativas entre el número de semillas germinadas, viables, vacias y dañadas, tanto para el tratamiento de luz como el de oscuridad, se empleó una prueba de Kruskall-Wallis, para cada uno de ellos.

8) Por otro lado, para analizar la relación entre el tamaño de las rosetas (longitud de la hoja mas larga) y de las inflorescencias, con el número de frutos, se realizó un coeficiente de correlación de Pearson.

9) Con el fin de comparar el número de frutos formados (*fruit set*) con respecto a los tratamientos de polinización se empleó una prueba de Chi-cuadrado, y como una prueba *Post hoc* una correccion de la Chi-cuadrado entre pares de tratamientos para definir entre cuales experimentos se presentaron diferencias significativas.

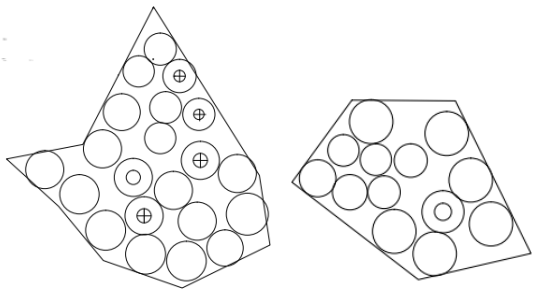
# 6. Resultados

## 6.1 Caracterización de parches

A nivel de parche, se encontraron densas agrupaciones o parches de rosetas bien diferenciados unos de los otros, a una distancia mínima de cinco metros. Así mismo, se evidenció que muchas de las rosetas allí presentes se originaron clonalmente a partir de los meristemos ubicados en las axilas de las hojas basales.

Se registró asincronía dentro y entre los parches, ya que presentaron al mismo tiempo rosetas en varias etapas de su clico de vida, registrándose rosetas fértiles, infértiles y rosetas muertas, producto de floraciones y fructificaciones pasadas (Figura 6-1).

**Figura 6-1:** A. Aspecto general de un parche y detalle de la formación de clones (flecha) de *Puya nitida*; B. Representación grafica de la distribución de las rosetas dentro de los parches de *Puya nitida*. Circulo vacio: roseta infértil, Doble circulo: roseta fértil, Circulo con cruz: roseta muerta.



**B**

En promedio los parches de *P. nitida* presentaron un área de 3,4 $m^2$± 2,175 (n=46), con alrededor de 29,1 ± 19,27 rosetas en total; 1,7 ± 1,55 rosetas fértiles (n= 46, Max=7, Min= 0), 24,8 ± 17,81 rosetas infértiles (n=46, Max= 103, Min=5), y 2,6 ± 2,14 rosetas muertas por parche (n=46, Max=10, Min=0).

## 6.2 Biología Floral

### 6.2.1 Morfología floral, desarrollo Floral y receptividad estigmática

Las flores de *Puya nitida* son perfectas, completas y zigomorfas, presentan simetría bilateral; están conformadas por cuatro verticilos; tienen un cáliz con alta densidad de indumento y persistente en los frutos inmaduros y maduros; la corola posee tres pétalos libres, persistente en frutos inmaduros formando una espiral en la punta. Según la tabla de colores de Munsell el color de los pétalos va desde amarillo pálido (5Y 8/4), rojo claro (10R 5/3) a rojo oscuro (10R 4/1). Dicha variación en la coloración, se da entre flores que están en el mismo estado de desarrollo, entre las diferentes inflorescencias que conforman la población; esto quiere decir, que se pueden encontrar en la misma población, inflorescencias con flores color amarillo pálido e inflorescencias con flores color rojo claro. El androceo tiene seis filamentos, anteras bitecadas, introrsas, basifijas, con polen color amarillo intenso, el gineceo es sincárpico, con ovario súpero y trilocular. Posee nectarios septales intraloculares, extendiéndose desde la base de los lóculos del ovario (Figura 6-2).

**Figura 6-2**: Registro de la variación en la coloración de las flores de *Puya nitida* en el sector Piedras Gordas, Parque Chingaza. A. Corola amarillo pálido (5Y 8/4), B. rojo claro (10R 5/3) y C. rojo oscuro (10R 4/1).

Teniendo en cuenta las características morfológicas, fisiológicas y del grado de expresión sexual (dicogamia, hercogamia) de las flores de *Puya nitida* a través de su desarrollo, se reconocieron ocho fases o etapas fenológicas.

*Estado 0: yema.* En esta etapa los sépalos convergen hacia el centro de la flor tocándose en el margen, en este momento cubren completamente los demás verticilos (pétalos, estambres y pistilo), por lo que no se pudieron apreciar las partes reproductivas de la flor. Los pétalos, los estambres y el estilo estaban poco desarrollados e inmaduros, con una longitud menor a la de los demás estados florales, mientras que las anteras, tuvieron un tamaño mayor que las otras fases, pero sin hacer dehiscencia (no han liberado polen) y tener contacto con el estigma (Anexo A, Figura 6-3A, Figura 6-4). También se evidenció que no hubo producción de néctar en esta fase. La duración promedio para esta etapa fue de 2,5 ± 0,70 días (n=10, Max=4, Min=2) desde que la yema se separó y abrió perpendicularmente de la parte central de la inflorescencia.

*Estado 1: botón.* Los sépalos apenas se separaban por el ápice y dejaban ver los pétalos sobrepasándolos entre 5 a 10 mm, no se observaron las partes reproductivas de la flor, ya que los pétalos permanecieron unidos. Tanto los pétalos, como los estambres y pistilo se alargaron ligeramente en comparación con el estado 0 (Anexo A) Las anteras permanecieron cerradas, sin liberar polen y sin entrar en contacto con el estigma. Al igual que en el estado 0, no hubo producción de néctar y el estigma permaneció receptivo, puesto que se observó tinción color purpura (n=5). (Figura 6-3B, Figura 6-4). La duración de esta etapa fue de 2,2 ± 0,42 días en promedio (n=10, Max=3, Min=2).

*Estado 2: botón con pétalos visibles.* Es un estado similar al pasado, puesto que no se observaron las partes reproductivas de las flor, liberación de polen, ni producción de néctar; además, las anteras no entraron en contacto con el estigma, sin embargo, se apreció un aumento en el tamaño de los estambres, estilo y pétalos, este último sobresaliendo en más de 15 mm de los sépalos. (Anexo A, Figura 6-3C, Figura 6-4). Esta etapa tuvo una duración promedio de 1,1 ± 0,3 días (n=10, Max=2, Min=1), durante el cual el estigma estuvo receptivo.

*Estado 3: inicio de la antesis.* Los pétalos, estambres y estilo crecieron notoriamente en comparación con los estados descritos anteriormente. Los pétalos comenzaron a separarse en la parte apical, presentando un orificio central en donde se alcanzó a observar el

estigma. Las anteras no hicieron dehiscencia, pero presentaron más movimientos, siendo más versátiles y separadas del estigma (Anexo A, Figura 6-3D, Figura 6-4). Durante esta etapa la flor inició la producción de néctar, lo cual puede estar asociado con la posibilidad de polinización cruzada por parte de visitantes florales. La presente fase duró alrededor de un día.

*Estado 4: flor no expandida*. Los sépalos se encontraron más separados, abriéndole paso a la antesis de la flor. Los pétalos también se observaron más separados en el ápice formando un orificio central y un tubo por el que se pudieron observar los estambres, el estigma y la base de la flor; las anteras fueron versátiles y liberaron polen, a raíz de esto, inicia la fase masculina. Las flores produjeron néctar (Anexo A, Figura 6-3E, Figura 6-4). Esta fase se mantuvo durante un día.

*Fase 5: Flor expandida.* Este fue el estadio más largo (4,4 ± 0,56 días, n=10, Max=5, Min= 3) y complejo de la flor; el orificio central de la flor alcanzó su mayor diámetro, permitiendo ver claramente el androceo y el gineceo. Los pétalos, estambre y pistilo detuvieron su crecimiento, y las anteras presentaron cambios en su morfología y contenido polínico, el cual se vio disminuido en cuanto a cantidad, probablemente por la afluencia de polinizadores (Anexo A, Figura 6-3F, Figura 6-4). La fase masculina y la femenina se encontraron sincronizadas en esta etapa; en algunas flores el estigma entraba en contacto con las anteras, pero en otras, por la versatilidad y la posición de la flor, las anteras sobresalían de esta y era la primera estructura con la que los polinizadores entraban en contacto (Figura 6-5). La producción de néctar en esta etapa fue perceptible.

*Fase 6: Inicio de la senescencia.* Los pétalos se unieron por él ápice, de manera que no permitieron ver el interior de la flor. Los pétalos y estructuras reproductivas perdieron turgencia y detuvieron su crecimiento (Anexo A Figura 6-3G, Figura 6-4). El estigma estaba receptivo y repleto de polen, las anteras disminuyeron de tamaño debido a que ya se había liberado y dispersado completamente. La duración de esta etapa fue de alrededor de 2 a 3 días (2,7 ± 0,67 días, Max= 4, Min= 2).

*Fase 7: flor senescente.* Los pétalos se observaron completamente unidos formado una rosca al igual que los estambres, los cuales se entorcharon alrededor del pistilo entrando en contacto con el estigma. De esta forma, dicha fase presentó diferencias significativas en la

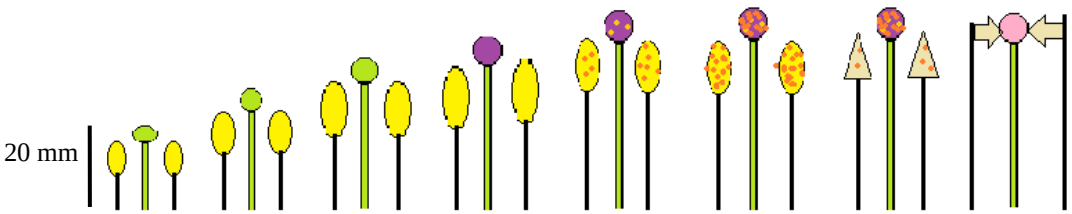
medida de la distancia del estigma a las anteras, con respecto a las otras fases (ANOVA, $F_{7, 59}$=3,61, p= 0.0026, Tukey, $p < 0,05$), puesto que en las primeras etapas de la flor, estas dos estructuras se separaban por algunos milímetros, y en la presente estaban al mismo nivel. Por otro lado, tanto los pétalos como las demás estructuras reproductivas perdieron turgencia, se observó que las anteras estaban vacías y que la producción de néctar se detuvo (Anexo A, Figura 6-3H, Figura 6-4). Esta fase tuvo una duración de alrededor cuatro días, continuando con la formación de los frutos.

A nivel general, a medida que las flores iban pasando de estado o fase floral, estas cambiaron el tamaño de cada una de las estructuras florales. Así, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la longitud de los pétalos (ANOVA, $F_{7,59}$= 96,71, $p < 0,001$), estambres (ANOVA, $F_{7,59}$=20,89, $p < 0,001$) y estilo (ANOVA, $F_{7,59}$=39,02, $p < 0,001$), los cuales iban creciendo a medida que la flor aumentaba de edad y pasaban de fase. Sin embargo, en las últimas tres etapas florales (fase 5, 6 y 7) no presentaron diferencias significativas entre estas variables, debido a que el crecimiento de la flor se suspendía (Tukey, $p > 0,05$). En el caso de la longitud de las anteras, estas también presentaron diferencias significativas entre los estados (ANOVA, $F_{7,59}$= 14,59, $p < 0,001$), pero en este caso se debía a una reducción en su tamaño. Las diferencias se dieron principalmente entre las primeras cuatro fases (fase 0, fase 1, fase 2, fase 3), donde las anteras estaban inmaduras y cargadas con polen, con respecto a las dos últimas fases (fase 6, fase 7) en las cuales este ya se había liberado (Tukey, $p < 0,001$).

De igual manera, se pudo apreciar mediante las pruebas de MTT, que desde la primera fase inicial (fase 0 o yema) los estigmas permanecieron receptivos y maduraron primero que las estructuras masculinas, mostrando un desfase temporal o protoginia entre las partes reproductivas de la flor.

**Figura 6-3:** Detalle de las características diagnosticas en los diferentes estados florales de *Puya nitida*: A. Estado 0 o yema; B. Estado 1 o botón; C. Estado 2 o botón con pétalos visibles; D. Estado 3 o inicio de la antesis; E. Estado 4 o Flor no expandida; F. Estado 5 o Flor expandida; G. Estado 6 o Inicio de la senescencia; H. Estado 7 o flor senescente**.**

**Figura 6-4:** Crecimiento del androceo y gineceo según los estados florales de *Puya nitida*. Se representa la posición del estigma en relación a las anteras y la duración de cada etapa. Las figuras con círculos amarillos son las anteras sin hacer dehiscencia, los círculos amarillos con puntos naranjas son las anteras liberando polen; los triángulos y flechas de color crema son las anteras vacías y en contacto con el estigma; la figura en forma de bastón color verde con circulo verde, es el estigma inmaduro; morado, estigma recibiendo polen; y rosado estigma maduro.




| E0 | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 | Estado floral |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 3 | < 3 | Duración (dias) |

*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Figura 6-5:** Posición de las anteras en el estado cinco, evidencia del contacto con *Eriocnemis vestita*.

### 6.2.2 Producción de néctar

La producción de néctar en *Puya nitida* inició a partir del estado tres o inicio de la antesis, hasta el estado seis o inicio de la senescencia. La concentración y el volumen de néctar promedio fue de 16,24 ± 5,51% (n=24) y de 41,5µl ± 31 (n=24), respectivamente.

## 6.3 Patrón fenológico

### 6.3.1 Nivel de población

Cada una de las fases fenológicas analizadas a nivel de población (frutos inmaduros, frutos maduros, frutos dehisentes, flores y botones), se presentaron de manera sincrónica, con intervalos de tiempo bien diferenciados, con una frecuencia anual y una duración intermedia (cuatro meses) a prolongada (> 6 meses).

Cuando se inició el registro fenológico (febrero 2013) de la población de *P. nitida*, se encontraron rosetas que estaban en la fase final de la floración que comenzó en el año 2012, y rosetas que estaban en la fase inicial de la maduración de los frutos (Figura 6-6, Figura 6-7).

El tiempo que transcurrió desde la etapa de frutos inmaduros a frutos maduros fue de siete meses aproximadamente, desde febrero del 2013 hasta septiembre del mismo año; no obstante, se apreció una disminución en el número de frutos inmaduros a través de los meses, debido a que estos fueron afectados por la depredación de varias especies de insectos, los cuales consumían y luego descomponían las partes del fruto. Así por ejemplo,

para el mes de febrero se registraron alrededor de 2500 frutos inmaduros, y para el mes de agosto este número disminuyó casi a la mitad con 1426 frutos (Figura 6-6).

Por otro lado, a partir de agosto del 2013, el número de frutos inmaduros disminuyó significativamente hasta el mes de noviembre del mismo año, debido a que por estos meses los frutos inmaduros comenzaron a cambiar de estado, convirtiéndose en frutos maduros. De esta manera, se encontraron diferencias significativas en el número de frutos inmaduros entre los meses evaluados (ANOVA Friedman = 483.503, df = 12, $p < 0,001$).

La etapa de frutos maduros se observó desde finales de agosto del 2013 hasta noviembre del 2013, para esta última fecha se dio inicio a la dispersión de semillas. Los frutos que comenzaron a liberar semillas permanecieron de esta forma por más de cinco meses, ya que estas se iban liberando paulatinamente. (Figura 6-6). El número de frutos maduros (ANOVA Friedman = 449.16, df = 12, $p < 0,001$) y con dispersión de semillas (ANOVA Friedman = 540.80, df = 12, $p < 0,001$) también presentaron diferencias significativas entre los meses de estudio.

La floración de *P. nitida* se dio a finales de octubre del 2013 hasta comienzos de febrero del 2014. No obstante, se registraron diferencias significativas en el número de botones (ANOVA Friedman = 113.50, df = 16, $p < 0,001$) y flores (ANOVA Friedman = 98.54, df = 16, $p < 0,001$) a través de los meses, debido a que esta no siempre fue igual de intensa. Así, durante el mes de noviembre se registró un pico claro en la floración, con alrededor de 108 flores y 156 botones (Figura 6-7). De igual forma, cabe resaltar, que el pico de floración de *P.nitida* coincidió con el periodo seco o de menor precipitación registrado en el P.N.N Chingaza (Figura 6-7).

*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Figura 6-6:** Variacion mensual en el número de frutos inmaduros, frutos maduros y frutos con semillas dispersadas de *Puya nitida.*

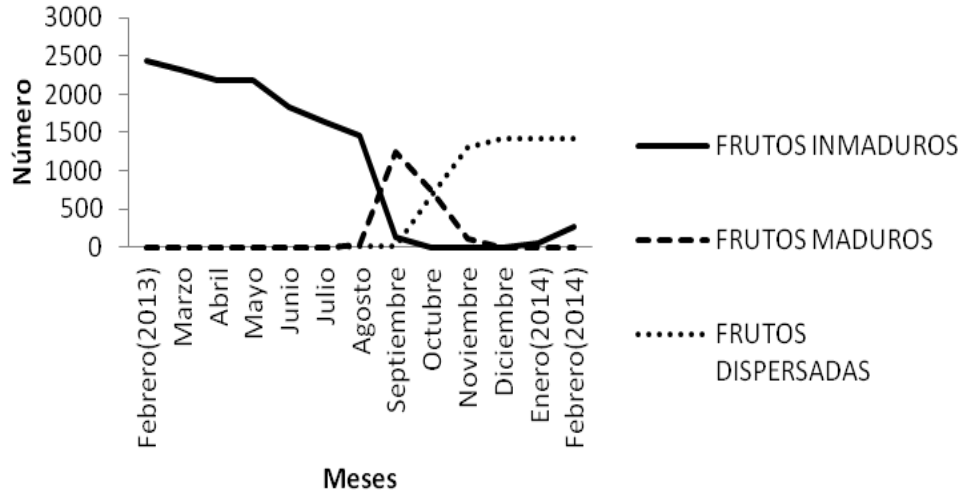
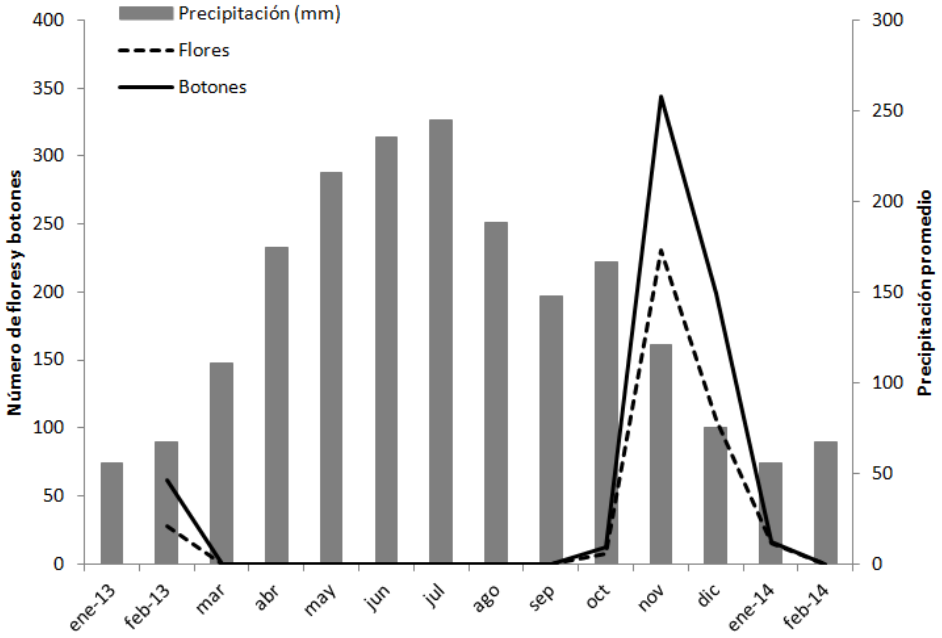



**Figura 6-7:** Variación mensual en el número de botones florales y flores en antesis de *Puya nitida* y precipitación mensual multianual (1927-2013) en el P.N.N Chingaza.




## 6.3.2 Nivel de parche

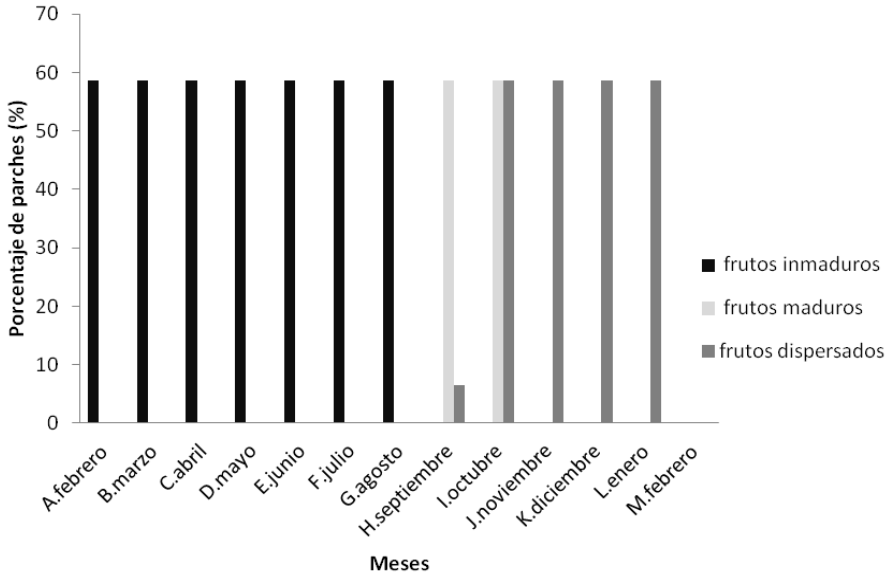
Entre los meses de febrero y agosto del 2013, el 58,7% de los parches se encontraron en frutos inmaduros. Este porcentaje se mantuvo, luego de que los frutos maduraran y

dispersarán sus semillas durante los meses de septiembre del 2013 a enero del 2014 (Figura 6-8).

Por otro lado, se pudo observar que a partir del mes de junio del 2013, los parches comenzaron a formar primordios de las inflorescencias, estado que se prolongó hasta el mes de diciembre del mismo año. No obstante, vale la pena resaltar que el mes de julio presentó el mayor porcentaje de parches en este estado, con un 43,5%, y que a partir de allí se experimentó una disminución debido al fuerte impacto de herbivoría por parte de larvas y adultos de varias especies de insectos (Figura 6-9).

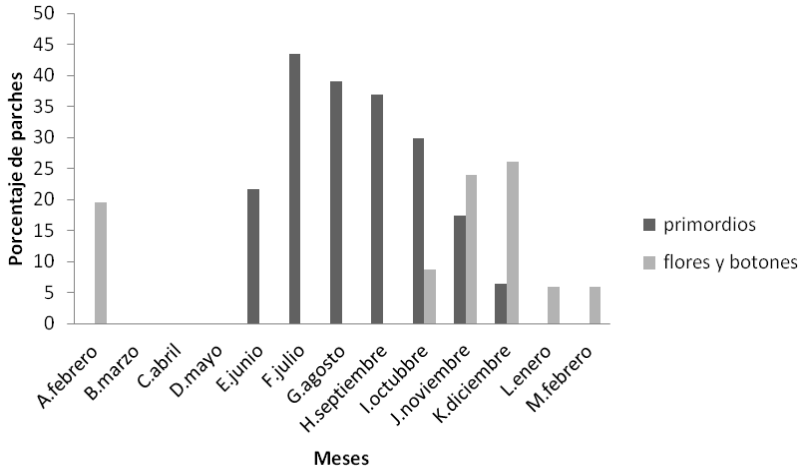
Adicionalmente, para el mes de octubre del 2013, el porcentaje de parches con primordios florales disminuyó casi a la mitad (29,9%), puesto que, por esta misma fecha se dio inicio a la maduración y floración de esta estructura. De esta forma, para los meses de noviembre y diciembre se encontró que el 23,9% y 26,19% de los parches estaban en periodo de floración (Figura 6-9).

**Figura 6-8:** Variación mensual en el porcentaje (%) de parches en estado fenológico de frutos inmaduros, frutos maduros y frutos con dispersión de semillas.



*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Figura 6-9:** Variación mensual del porcentaje (%) de parches con presencia de primordios florales, botones y flores.




## 6.3.3 Nivel de roseta

A nivel de roseta, las plantas de *P. nitida* presentaron una forma de floración tipo acrópeta (de abajo hacia arriba), por lo que fue posible encontrar en la misma inflorescencia varios estadios de la flor, mostrando una asincronía a este nivel. La floración en la inflorescencia duró alrededor de dos meses, desde que abrió la primera flor hasta la última.

En el caso de las rosetas fértiles, estas presentaron una longitud promedio de la hoja de 32,25 cm ± 7,05 (n =69); y específicamente sus partes reproductivas alcanzaron una longitud total de 134,68 ± 31,48 cm (n=69) y una longitud parcial de 52,14 ± 16,3 cm (n= 69). El número promedio de frutos maduros por roseta fue de 25,06 ± 16,27 (n=50) y el número promedio de semillas por fruto de 670,2 ± 206,3 (n= 15), lo cual indica que por roseta de *P. nitida* se pueden formar alrededor de 16.790 semillas.

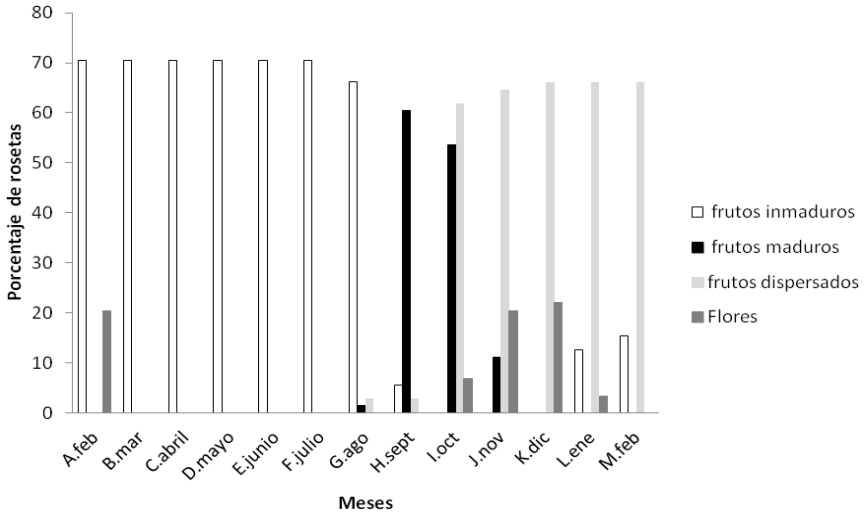
Por otro lado, se encontró una relación positiva entre el número de frutos y la longitud total (r=0.369, p= 0.008) y parcial de la inflorescencia (r= 0.49, $p$ <0.001); no obstante, cabe resaltar que en el primer caso (longitud total) dicha asociación no fue muy fuerte o intensa debido a su valor de (r). Por el contrario, no se encontró una relación entre el número de frutos y la longitud de la hoja más larga (r= 0.077, p =0.593).

Durante los primeros siete meses de investigación (febrero-agosto del 2013), más del 60% de las rosetas marcadas se encontraron en frutos inmaduros, las cuales luego maduraron y dispersaron semillas entre septiembre del 2013 y enero del 2014 (Figura 6-10).

De igual forma, para febrero del 2013, se registraron doce rosetas (20,3%) que presentaron en la parte apical, flores expandidas y senescentes, indicando que la población estaba culminando la etapa de floración que inició en el año 2012. No obstante, en octubre del 2013, se registraron otras nuevas rosetas que estaban iniciando con la etapa de floración de dicho año (2013). Para el mes de noviembre y diciembre del 2013 se observó el porcentaje más alto de rosetas en estado de flor, con el 20, 3% y el 22%, respectivamente (Figura 6-10).

Se encontraron diferencias significativas en el número de frutos inmaduros (ANOVA Kruskal-Wallis = 251.7, df = 48, p < 0,001) y con dispersión de semillas (ANOVA Kruskal-Wallis = 154.65, df = 45, $p$ < 0,001) entre las rosetas, a diferencia de los frutos maduros donde no se observaron diferencias (ANOVA Kruskal-Wallis = 251.70, df = 48, $p$ > 0,05).

**Figura 6-10:** Variación mensual del porcentaje de rosetas en estado fenológico de frutos inmaduros, frutos maduros, frutos con dispersión de semillas y flores.




## 6.4 Sistema de reproducción sexual en *Puya nitida*

El número de frutos formados en *Puya nitida* fue significativamente diferente en cada uno de los experimentos realizados (Chi-cuadrado = 16.886, df = 4, $p$ = 0.002). De esta manera, *P. nitida* formó un número mayor de frutos en el tratamiento de polinización cruzada manual (PCM) con el 66,6% (n=18), seguido por los experimentos de polinización natural (PN) (n=20) y polinización cruzada natural (n=10) (PCN), con el 50 % de los frutos formados cada uno, los cuales se diferenciaron significativamente del tratamiento por

autopolinización (AP), que tuvo el menor número de frutos formados con el 5,26 % (n=19) (Tabla 6-1, Figura 6-11).

No obstante, cabe resaltar que en los tratamientos de polinización realizados, una parte de los frutos que no se formaron tuvieron signos de herbivoría, por lo cual, no se pudo distinguir si la falta del desarrollo se debía a este evento o a que ciertamente no se hizo efectiva la polinización. De igual forma, hubo casos donde aparentemente (en la parte externa) se formaba el fruto, pero en el interior de estos las semillas no lo habían hecho, por lo tanto, estos frutos también se incluyeron dentro del grupo de frutos no formados. Así, los frutos considerados como no formados incluyeron tanto los que no se desarrollaron posiblemente por herbivoría o polinización efectiva, y por los que no desarrollaron semillas (Figura 6-12).

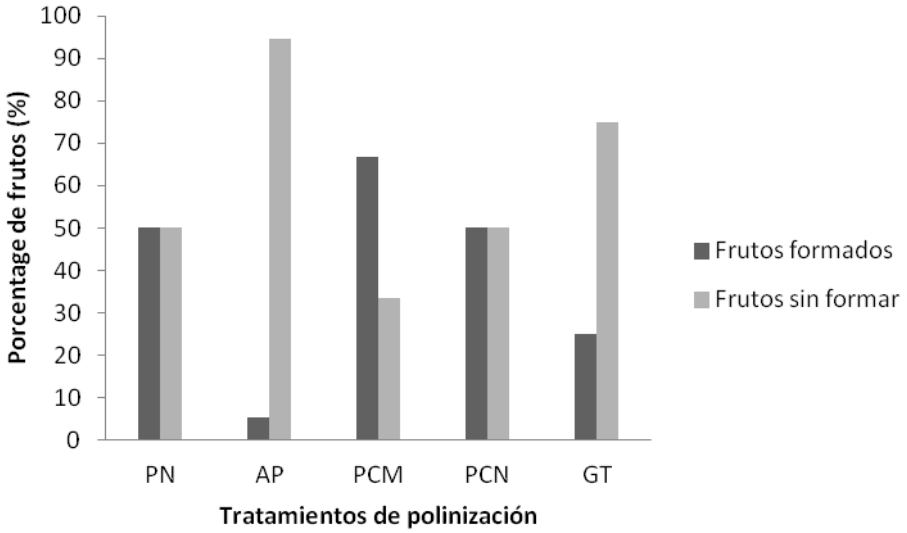
A pesar de esto, se pudo reconocer que hubo tratamientos en donde hubo mayor ataque por herbivoría, tal como ocurrió en el de AP, el cual presento diferencias significativas con respecto a los tratamientos de PN (Chi-cuadrado = 5.76, df = 1, $p$ = 0.016) y PCM (Chi-cuadrado = 4.65, df = 1, $p$ = 0.030).

Por otro lado, el índice de tasa de autoincompatibilidad (ISI) fue de 0,08, indicando que *Puya nitida* es su mayor parte es autoincompatible.

**Tabla 6-1:** Corrección de la Chi-cuadrado, para pares de experimentos de polinización, se muestran solo las diferencias significativas. AP (Autopolinización), GT (Geitonogamia), PCM (Polinización cruzada manual), PCN (Polinización cruzada natural), PN (Polinización natural).

| Experimentos | Estadístico: Corrección de la Chi-cuadrado |
|---|---|
| **PCM y AP** | Chi-cuadrado = 15.29, df = 1, $p$ < 0,001 |
| **PN y AP** | Chi-cuadrado = 9.63, df = 1, $p$ = 0.0019 |
| **PCN y AP** | Chi-cuadrado = 7.99, df = 1, $p$ = 0.004 |

**Figura 6-11:** Porcentaje de frutos formados y no formados por cada uno de los tratamientos de polinización, AP (Autopolinización), GT (Geitonogamia), PCM (Polinización cruzada manual), PCN (Polinización cruzada natural), PN (Polinización natural).




Así mismo, se encontraron diferencias significativas en las medidas tomadas en los frutos formados por tratamiento. En el caso del peso se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de autopolinización, con polinización cruzada manual (Tukey $p< 0,001$), polinización cruzada natural y polinización natural (Tukey $p<0,05$), siendo los frutos de la PCM y PCN mas pesados que el resto de los tratamientos. También, se encontraron diferencias significativas en la altura y el ancho de los frutos entre los experimentos de AP, con respecto a la PCN y la PCM, respectivamente (Tukey $p<0,05$), siendo de mayor tamaño aquellos frutos originados en la PCM y PCN (Figura 6-12, Figura 6-13, Tabla 6-2).

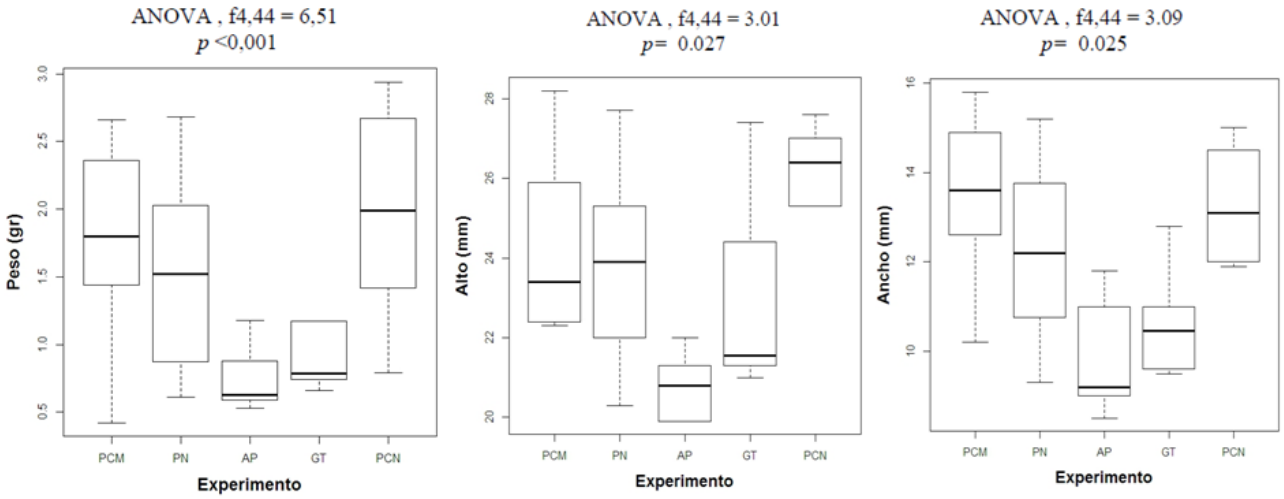
*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Figura 6-12:** Tipos de frutos formados a partir de los experimentos de polinización manual. A. Diferencias en los tamaños, B. Frutos con signos de herbivoría, C. Corte horizontal de los frutos, se muestra la falta de desarrollo de las semillas. D. Corte horizontal de los frutos, se muestra las semillas formadas.

**Tabla 6-2**. Características de los frutos formados en diferentes tratamientos de polinización aplicados a *P. nitida*. Las cantidades indican la media y la desviación estándar, el tamaño de la muestra se señala entre paréntesis. PN=Polinización Natural, AP=Autopolinización, PCM=Polinización Cruzada, PCN=Polinización cruzada natural y GT=Geitonogamia.

| Características de los frutos | PN | AP | PCM | PCN | GT | Prueba estadística |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nº de frutos formados** | 10 (20) | 1 (19) | 12 (18) | 5 (10) | 2 (8) | $X^2 = 0.002034$ |
| **Peso (gr)** | 1,49 ± 0,707 (15) | 0,71 ± 0,20 (10) | 1,80 ± 0,67 (13) | 1,96 ± 0,88 (5) | 1,045 ± 0,56 (4) | ANOVA , f4,44 = 6,51 *p* <0,001 |
| **Altura (mm)** | 23,30 ± 3,74 (15) | 19,59 ± 3,27 (10) | 23,07 ± 4,64 (13) | 24,96 ± 3,70 (5) | 22,86 ± 2,54 (4) | ANOVA , f4,44 = 3.01 *p*= 0.027 |
| **Ancho (mm)** | 12,74 ± 3,13 (15) | 10,64 ± 3,10 (10) | 14,03 ± 4,1 (13) | 34,72 ± 47,1 (5) | 10,6 ± 1,20 (4) | ANOVA , f4,44 = 3.09 *p*= 0.025 |

**Figura 6-13**. Características de los frutos formados en diferentes tratamientos/experimentos de polinización aplicados a *P. nitida*. PN=Polinización Natural, AP=Autopolinización, PCM=Polinización Cruzada, PCN=Polinización cruzada natural y GT=Geitonogamia.




## 6.4.1 Germinación de semillas de *Puya nitida* bajo condiciones de laboratorio

Las semillas de *Puya nitida* comenzaron a germinar a partir de la segunda semana (15 días) de registro para el tratamiento de luz, y en la tercera semana (24 días) para el tratamiento de oscuridad, a partir de allí, la tasa de germinación se dio de manera continua hasta la semana siete (56 días, ultima fecha de registro)

No obstante, durante la semana tres (24 días) y cuatro (32 días) se evidenció un pico claro de germinación con 239 y 200 semillas bajo condiciones de luz, y 28 y 41 semillas bajo condiciones de oscuridad. A partir del cual, hubo una disminución constante hasta la última semana de registro (semana 7, 56 días). A raíz de dicho pico de germinación, se observaron diferencias significativas en el número de semillas germinadas para cada uno de los tratamientos, con respecto a las semanas de registro, (ANOVA Friedman Luz = 55.41, df = 6, $p$ <0,001) y (ANOVA Friedman Oscuridad = 26.11, df = 6, $p$ = 0.0002) (Figura 6-14).

A pesar de que el comportamiento de germinación a través de las semanas fue similar en los tratamientos usados, el número de semillas germinadas fue significativamente mayor para aquellas que se sometieron a condiciones de luz que las de oscuridad (Wilcoxon =

9296, p <0,001), con un total de 637 (79,6%) semillas germinadas en luz y 102 (12,7%) en oscuridad (Figura 6-14).

A partir de las semillas que no germinaron y que posteriormente se les evaluó el estado del embrión, se encontró para el tratamiento de luz que el 13,5 % (108 semillas) correspondieron a semillas dañadas, el 3,6 % (29) a semillas viables y el 3,2% (26) a semillas vacías (Figura 6-15). Para el caso de las semillas sometidas a oscuridad, se encontró que el 43,9% (351) pertenecieron a semillas viables y el 39,5% (316) y 3,9 % (31) a semillas dañadas y vacías, respectivamente (Figura 6-15).

De esta forma, se encontraron diferencias significativas en el número de semillas germinadas dañadas, viables y vacías tanto para el tratamiento de luz (Chi-cuadrado = 47.7, df = 3, $p$ <0,001), como para el de oscuridad (Chi-cuadrado = 42.7, df = 3, $p$ < 0,001).

**Figura 6-14:** Número de semillas germinadas semanalmente, para el tratamiento de luz y oscuridad.

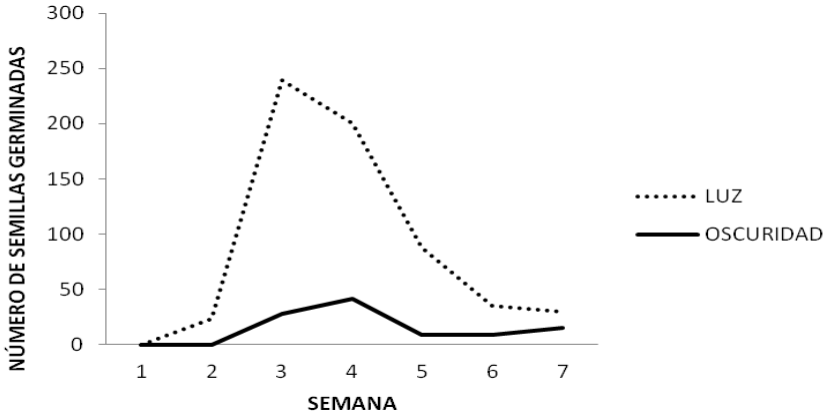
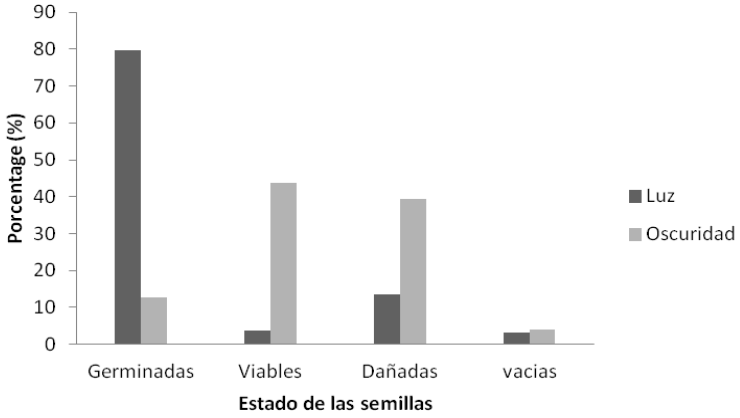


**Figura 6-15:** Porcentaje de semillas germinadas, viables, dañadas y vacías para el tratamiento de luz y oscuridad




# 6.5 Interacción planta-animal

## 6.5.1 Visitantes florales

Entre los meses de noviembre y diciembre del 2013, se registraron 42 visitas por parte de cuatro especies de colibríes (*Lesbia victoriae, Chalcostigma heteropogon, Eriocnemis vestita* y *Pterophanes cyanopterus*) y una especie de diglosa (*Diglossa humeralis*). El número total de las visitas a las flores de *Puya nitida*, correspondió principalmente a las aves que presentaron mayor número de registros, las cuales fueron *E. vestita, L.victoriae* y *C. heteropogon* con dieseis, once y nueve registros respectivamente, lo que corresponde al 85% total de las visitas; a diferencia de las demás especies (*P. cyanopterus, Diglossa humeralis*), que se observaron esporádicamente y de las cuales se obtuvieron entre uno a cinco registros (14,3%) (Figura 6-16). A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de estas (ANOVA Kruskal-Wallis = 2.68, df = 4, $p = 0.611$).

Con respecto al comportamiento al momento de realizar la visita, no se encontraron diferencias en el número de flores probadas entre las especies (ANOVA Kruskall-Wallis = 6.39, df = 4, $p = 0.1717$), las cuales, visitaron más de una flor en la misma inflorescencia, visitando en promedio seis flores (6,14 ± 4,68). Por el contrario, se observaron diferencias en la duración de las visitas (ANOVA, $f_{4,\ 34} = 3.34$, $p = 0.019$) ya que especies como *E. vestita* y *C. heteropogon* invirtieron más tiempo en la visita que el resto de las especies (> 1 minuto), y en las técnicas de forrajeo empleadas, lo cual a su vez, puede estar relacionado e influenciado por sus diferencias en morfología y tamaño.

De esta forma, se presentaron diferencias significativas en las estructuras morfológicas de los visitantes, que son importantes para definir particularidades ecológicas y del comportamiento en las aves, como son la longitud del culmen total (ANOVA Kruskal-Wallis = 61.03, df = 4, $p < 0{,}001$), longitud del ala (ANOVA Kruskal-Wallis = 49.84, df = 4, $p < 0{,}001$) y la longitud total (ANOVA Kruskal-Wallis = 41.86, df = 4, $p < 0{,}001$) (Tabla 6-3).

*E. vestita*, *L. victoriae* y *C. heteropogon* presentaron tallas y comportamientos similares al momento de realizar la visita. Al tener el pico recto y corto, estas aves se colgaron brevemente de las flores para libar y alcanzar el néctar, intercalándolo con momentos de percha en ramas aledañas de otras especies de plantas, o usando las flores que se encontraban más abajo de la que estaban libando, gastando más tiempo en la visitas que el resto de las especies. *C. heteropogon* presentó diferencias significativas en la duración de la visita con respecto a *P. cyanopterus* (Tukey $p = 0.019$), debido a que dispuso más tiempo visitando las flores de *P. nitida*. Todas las especies de aves mencionadas anteriormente, visitaron siempre de forma legítima, accediendo por la parte distal de la flor y entrando en contacto con las partes reproductivas de esta, cargando el polen en la cabeza del ave. Así mismo, visitaban periódicamente en intervalos de aproximadamente una hora, lo cual puede indicar que posiblemente se comportaban como "ruteros" (Figura 6-17).

Por el contrario, *Pterophanes cyanopterus* presentó una longitud mayor en cada una de las estructuras medidas, indicando que tiene una talla superior al resto de las especies registradas, y por consiguiente una forma diferente de realizar la visita. Esta especie visitó las flores de *Puya nitida* de forma legítima, entrando en contacto con las partes reproductivas de la flor, no obstante *P. cyanopterus* siempre uso visitas más rápidas y el vuelvo sostenido o (*hovering*) para libar las flores.

En el caso de la *Diglossa humeralis*, se registró una sola vez y realizó un tipo de visita típico de pinchaflores o ladrones de néctar, llegó a la planta y se agarró de las ramas o flores aledañas, comenzando a realizar agujeros en la base de la corola. Dicha visita no duro más de un minuto y durante esta permaneció siempre alerta.

**Figura 6-16:** Número de registros de las especies de aves visitantes de *Puya nitida* en el Parque Chingaza**.**

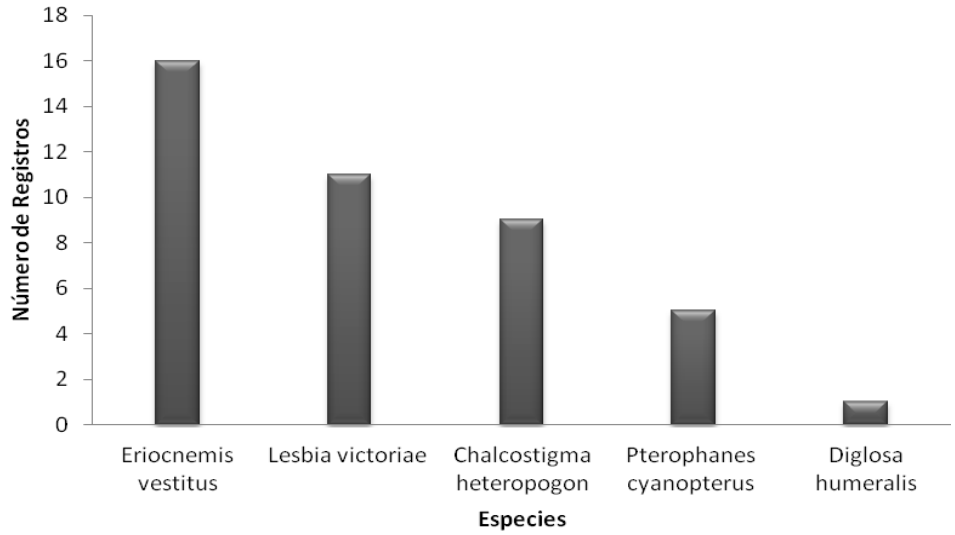



**Tabla 6-3:** Medidas morfológicas de los principales visitantes de *Puya nitida* en el Parque Chingaza. Las cantidades indican la media y la desviación estándar, el tamaño de la muestra se señala entre paréntesis.

| Especie | L. ala (mm) | L. culmen total (mm) | L. total (mm) |
|---|---|---|---|
| ***Lesbia victoriae*** | 17,96 ± 2,10 (6) | 57,8 ± 2,86 (6) | 216 ± 55,53(6) |
| ***Chalcostigma heteropogon*** | 16,31 ± 1,22 (17) | 65,98 ± 5,23 (17) | 114,81 ± 8,47 (17) |
| ***Eriocnemis vestita*** | 22,53 ± 1,29 (20) | 57,66 ± 2,45 (20) | 112,32 ± 12,36 (20) |
| ***Pterophanes cyanopterus*** | 35,35 ± 4,94 (7) | 98,61 ± 6,09 (7) | 171,4 ± 20,33 (7) |
| ***Diglossa humeralis*** | 13,58 ± 1,35 (20) | 65,93 ± 4,41 (20) | 125,99 ± 29,02 (20) |

*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Figura 6-17:** Visitantes florales más frecuentes de *Puya nitida* en el parque Chingaza, mostrando su forma de la visita. A *Chalcostigma heteropogon*, B. *Eriocnemis vestita* C. *Lesbia victoriae.*

## 6.5.2 Herbivoría

Tanto los frutos como los primordios de las inflorescencias y flores, fueron afectados por larvas y adultos de siete morfoespecies de insectos.

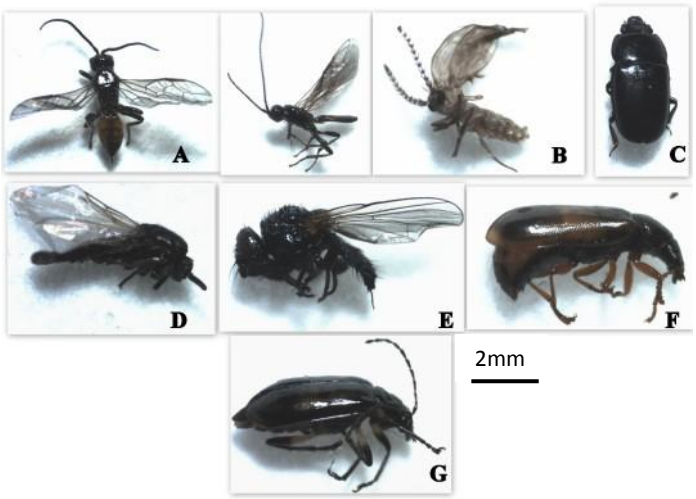
En el caso de los frutos y los primordios, fueron consumidos principalmente por larvas pertenecientes al orden Diptera (subfamilia Bibionidae, Psychodidae y Syrphidae) e Hymenoptera (subfamilia Opiinae, género *Opius*), y por adultos y larvas de Colepteros, pertenecientes a las subfamilias Staphylinidae y Nitidulidae (Figura 6-18). En un solo fruto se encontraron varios individuos de la misma especie junto con individuos de otras especies y familias.

Tanto los dípteros como los coleópteros adultos, copularon entre las brácteas que protegen las flores, los frutos, y el pedúnculo de la inflorescencia, luego de lo cual, colocaron sus huevos al interior de dichas estructuras. Las larvas resultantes de este proceso, depredaron el total de los frutos y el pedúnculo de la inflorescencia, descomponiéndolas un 100% y afectando totalmente el proceso de formación de flores y semillas. Las larvas de los

himenópteros que se encontraron en los frutos, estaban allí posiblemente como parasitoides de las de los dípteros (Figura 6-18).

Por su parte, las flores de *Puya nitida* presentaron signos de herbivoría en todos sus estados de desarrollo, excepto en aquellos donde la flor ya estaba senescente, allí, los insectos (larvas y adultos) afectaron estructuras reproductivas como las anteras, el estigma y los óvulos. Cuando la herbivoría iniciaba en los botones florales, ésta impedía que la flor se desarrollara completamente y promovía a que la textura y color de esta cambiara. En las flores se encontraron insectos del orden Coleoptera, principalmente dos morfoespecies de la familia Chrysomelidae (Figura 6-18, Figura 6-19).

**Figura 6-18:** Insectos encontrados en las estructuras reproductivas de *Puya nitida* en el parque Chingaza. A Hymenoptera: Braconidae, subfamilia Opiinae, Género *Opius*, macho y hembra; B. Diptera: Psychodidae; C. Coleoptera, Nitidulidae; D. Diptera, Bibionidae; E. Diptera, Syrphidae; F y G. Coleoptera, Chrysomelidae



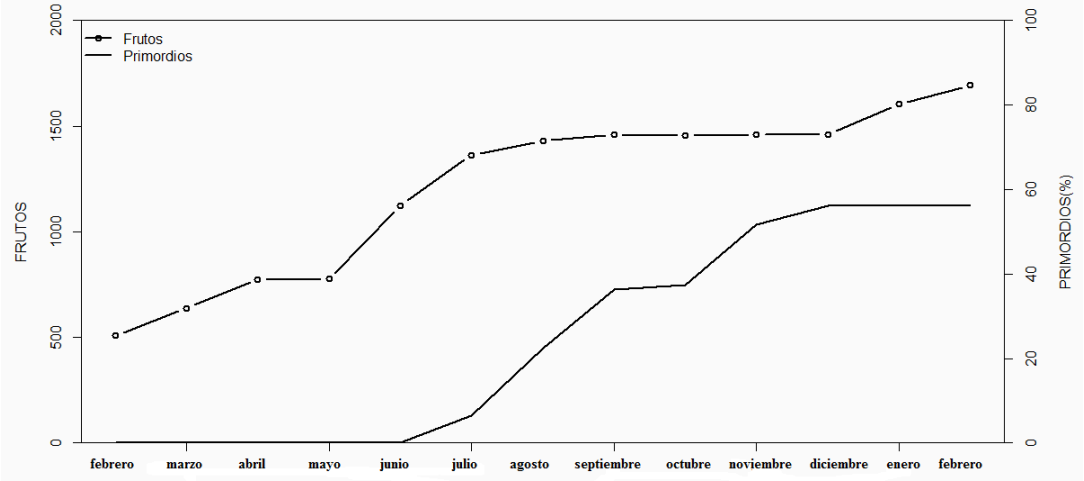
*Franco-Saldarriaga, A. 2014*

**Figura 6-19:** Estructuras reproductivas de *P. nitida*, afectadas por las diferentes especies de insectos encontrados en el parque Chingaza. A. Flor, se señala heces de insectos y estigma afectado; B Fruto afectado; C. Primordios de las inflorescencias

El número de frutos y el porcentaje de primordios afectados por herbivoría aumentaba mes a mes, de tal forma que se observaron diferencias significativas en dichas variables entre los meses (ANOVA Friedman = 447.36, df = 12, $p < 0{,}001$). Así mismo, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de frutos afectados entre las rosetas (ANOVA Kruskal-Wallis = 252.16, df = 48, $p < 0{,}001$) (Figura 6-20).

Finalmente, en el transcurso del estudio, todos los primordios e inflorescencias marcadas (n=34) presentaron signos de herbivoría, no obstante, el 52,9% de estos fueron consumidos totalmente (100%) por las larvas de dípteros y coleópteros, por lo que no se generaron botones florales, ni flores a partir de ellos. Así mismo, el 20,6 % correspondió a inflorescencias con presencia de herbivoría en más de las dos terceras partes de esta (66%), en las cuales abrían máximo tres flores simultáneamente por cada inflorescencia. Por consiguiente, el 26,5% restante, incluyó a aquellas inflorescencias que presentaron herbivoría en 1/3 o menos ($\leq$ 33,3%) de la parte reproductiva, las cuales formaron un número mayor de botones y flores.

**Figura 6-20:** Número de frutos y porcentaje de primordios de las inflorescencias de *P. nitida* afectados por herbivoría a través de los meses.



# 7. Discusión

## 7.1 Biología Floral

### 7.1.1 Morfología floral

El páramo de Chingaza se caracteriza por presentar un conjunto de condiciones ambientales extremas como: oscilaciones contrastantes en la temperatura diaria, días soleados con radiación intensa, y noches muy frías y húmedas. Esto hace que la actividad y la disponibilidad de los polinizadores se conviertan en un servicio limitado, aspecto que se ha interpretado como un "problema" que afecta considerablemente la reproducción sexual de muchas especies de plantas (Körner 2003; Chaparro 2005). *P. nitida* se distribuye en el páramo de Chingaza, no obstante, esta especie presentó cuatro componentes de su biología floral que indican que la polinización cruzada, aporta de manera contundente a la reproducción sexual de ésta planta de páramo.

En primer lugar, *P. nitida* presenta características florales relacionadas con el síndrome de ornitofilia (rasgos que las hacen atractivas para las aves) como, flores tubulares, de colores rosados, sin aroma, producción de néctar diluido, antesis diurna, distancia entre la cámara de néctar y los órganos sexuales de la flor, etc. (Faegri & van der Pijl 1979; Murcia 2002; Cronk & Ojeda 2008), lo cual se asemeja a lo encontrado en otras especies de la familia Bromeliaceae y del género *Puya* (Ferreira-Canela & Sazima 2003; Salinas *et al.* 2007; Scrok & Galarda 2011). Por otro lado, esto apoya la hipótesis donde se determinan los principales visitantes de la planta a partir de sus rasgos florales; debido a que existe un cierto grado de correspondencia entre la forma y el color de una flor, y el tipo de animal que la poliniza (Murcia 2002; Gómez 2002; Cronk & Ojeda 2008).

En segundo lugar, *P. nitida* presenta una corola amplia y una disposición de las anteras durante la antesis de la flor, que favorece que colibríes de pico largo y corto, accedan de

forma legítima al néctar, estableciendo contacto con las partes reproductivas de la flor, permitiendo así, que se deposite el polen en su cabeza y pico. En tercer lugar, *P. nitida* muestra tanto flores como estigmas receptivos por un amplio intervalo de tiempo (> 5 días); lo cual contribuye a que se aumenten las probabilidades de que se deposite gradualmente la cantidad de polen suficiente para fecundar los óvulos que posee.

En cuarto y último lugar, *P. nitida* presenta dos estrategias que ocurren simultáneamente en las flores durante su desarrollo, que promueve la polinización cruzada y reduce la incidencia de la autofecundación espontánea. Estas son la separación temporal (dicogamia) y espacial (hercogamia) de los órganos masculinos y femeninos; en donde el estigma madura y se expone primero a los vectores (Protógina), ubicandose más arriba que las anteras.

A pesar de lo anterior, cabe recordar que durante las etapas finales del desarrollo floral de *P. nitida*, las anteras se comenzaron a entorchar alrededor del estigma entrando en contacto con este. Esto puede conducir a un evento de autopolinización espontanea denominado "*Delayed selfing*" o autopolinización retrasada en especies con hercogamia, donde a partir de los movimientos de las estructuras florales durante la etapa de senescencia, se efectúa la autofecundación de flores que no hayan sido visitadas por polinizadores (Lloyd & Schoen 1992). Con el fin de tener certeza de que la autopolinización retrasada ocurre en esta especie de planta, se recomienda realizar pruebas de receptividad estigmática y viabilidad de polen durante la última etapa del desarrollo floral, ya que en la presente investigación no se lograron identificar.

De esta forma, se propone a manera de hipótesis, que la *Delayed selfing* puede conducir a que la fecundación de los óvulos que posee *P. nitida*, se complete con polen propio al final de su etapa de desarrollo, cuando el servicio de los polinizadores no ha sido suficiente para transportar todos los gametos masculinos necesarios. Lo cual les permite asegurar la fecundación en el único evento reproductivo que presenta.

El cambio de color en la corola de las flores, ha sido reportado en varias especies de angiospermas. Dichos cambios pueden estar asociados a la edad de las flores, al estado de desarrollo y floración, al estado de fecundidad (Brand-Prada 1994; Franco-Saldarriaga & Restrepo-Chica 2009) o a polimorfismos que han sido mantenidos y seleccionados por la acción de interacciones que se generan con los morfos (Galeto *et al*. 2002; Malerba &

Nattero 2012). La especie *P. nitida* mostró cambios en la coloración de las corolas de flores que estaban en el mismo estado de desarrollo entre las inflorescencias, por lo que dicha variación puede estar asociada probablemente a un polimorfismo en este carácter. Por lo tanto, es fundamental comprobar si efectivamente se trata de un polimorfismo.

Aunque en el presente estudio no se evaluó el efecto de la variación en la coloración de las flores sobre el comportamiento de los polinizadores, se reconoce que esta puede influir en las preferencias del polinizador y por ende en el éxito reproductivo de las plantas (Malerba & Nattero 2012). Melendez-Ackerman *et al.* (1997) evaluaron la influencia de la coloración de la corola de *Ipomopsis aggregate* y *I. tenuituba*, sobre las preferencias y movimientos de los colibríes polinizadores, *Selasphorus platycerus* y *Selasphorus rufus*, encontrando que el morfo rojo tuvo una mayor frecuencia de visitas que el morfo blanco, lo cual pudo estar relacionado con que los colibríes asociaban el color de la flor con la calidad de la recompensa.

### 7.1.2 Producción de néctar

Los requerimientos energéticos de las poblaciones de los colibríes son particularmente elevados en condiciones de alta montaña y por lo general dependen casi exclusivamente del néctar floral (Stiles 1978; Gutiérrez *et al.* 2005; Franco-Saldarriaga & Restrepo-Chica 2009). El néctar de *P. nitida* presentó una concentración promedio de 16,2% ± 5,51 (n=24) y un volumen de 41,5µl ± 31 (n=24). Estos valores han sido descritos como valores bajos – medios, de 10 – 20% y 10 – 20µL o más (Gutierrez 2005), y se asemejan a los encontrados por Gutiérrez (2005) en la misma especie de estudio en el bosque altoandino de Torca (Cundinamarca), en donde registró una concentración promedio de 13,8% y un volumen de 52,9µl ± 37,2.

La concentración y volumen del néctar de *P. nitida* se asocia con los valores registrados en flores de otras especies de plantas de la familia Bromeliaceae y del genero *Puya,* documentadas como una de las principales fuentes de néctar para colibríes en zonas de alta montaña, subpáramo y páramo (Ferreira-Canela & Sazima 2003; Gutiérrez 2005; Salinas *et al.* 2007; Scrock & Galarda 2011; Marin *et al.* 2012; Hornung-Leoli *et al.* 2013).

Este fenómeno tiene dos implicaciones en los animales que las visitan, por un lado, mantener estos valores, implica que los polinizadores visiten mayor número de flores para

obtener la ración de energía necesaria, ya que una oferta excesiva de néctar puede saciarlo y ocasionar que se reduzca la capacidad de dispersión del polen (Murcia 2002). Por otro lado, la baja concentración del néctar, también llamado néctar diluido, restringe la visita de ladrones de néctar que no contribuyen a la polinización (Gutierrez & Rojas 2001; Cairampoma & Martel 2012).

## 7.2 Registro Fenológico

Teniendo en cuenta los términos usados por Newstrom *et al.*, (1994) para describir patrones fenológicos, *P. nitida* presentó una frecuencia anual a nivel poblacional en cada uno de los estados (frutos inmaduros, frutos maduros, frutos-dispersión de semillas, primordios de inflorescencias, botones, flores), bien diferenciado y marcado a través del año.

El patrón observado puede estar asociado a dos aspectos principales. El primero tiene que ver con el régimen de lluvias de la zona, puesto que el periodo de formación y maduración de los frutos se dio en la época de mayor precipitación, mientras que la floración comenzó junto con la época seca o de menor precipitación. Esto concuerda con lo planteado por Sakai (2001), donde expone que a diferencia de las zonas templadas, los cambios periódicos en las lluvias juegan un papel importante en la fenología de las plantas tropicales, y soporta la relación encontrada en varios trabajos, entre la floración y el régimen de lluvias, en los cuales reconocen que después de la época de máxima precipitación se aumenta la producción de flores durante la época seca (Gutiérrez 2005; Prada 2006; Quevedo 2006).

La coincidencia de la época de lluvias con la maduración de los frutos y semillas puede deberse a que estas son semillas pequeñas y ortodoxas que requieren hidratarse para posteriormente germinar (Mora *et al.* 2007); y la época seca con la floración de *P. nitida* puede estar relacionada con efectos positivos de la polinización cruzada, debido a que este favorece el vuelo y la actividad de forrajeo de los visitantes florales (Prada 2006).

El segundo aspecto asociado con el patrón encontrado en *P. nitida,* está relacionado con una respuesta a la competencia por polinizadores e interferencia entre especies en el pasado, que resulta en un posible desplazamiento de fenologías entre especies simpátricas,

que maximiza la utilización de recursos y evita la transferencia de polen interespecífico y la formación de híbridos (Fenner 1998; Chaparro 2005).

De esta forma, se evidenció una clara separación en los picos de floración entre las cuatro especies de *Puya* encontradas en el área de estudio. *P. cryptantha* y *P. trianae* presentaron su pico de floración a mediados de la época húmeda, la primera entre los meses julio a agosto, y la segunda, entre finales de septiembre a octubre; mientras que *P. nitida* y *P. goudotiana* presentaron su pico durante la época seca, presentándose la primera entre los meses de noviembre a febrero, y la segunda de febrero a finales de mayo (Franco-Saldarriaga, datos no publicados).

Continuando con el sistema de clasificación planteado por Newstrom *et al.*, (1994), *P. nitida* presentó una duración intermedia (4 meses) para la floración, y prolongada (> 5 meses) para los frutos inmaduros, los cuales tardaron alrededor de seis meses para estar maduros y siete para dispersar semillas. El tiempo de maduración de los frutos se asemeja al reportado para *P. trianae* y se diferencia al de *P. clava-herculis y P. hamata* en las cuales este proceso dura tres meses (Chaparro 2005). La duración prolongada en la maduración de los frutos puede deberse a que los individuos requieran acumular nutrientes necesarios para el desarrollo de sus frutos, o a que son frutos con semillas pequeñas que generalmente maduran durante todo el año, a diferencia de los de semillas grandes que se producen de manera estacional (Williams-Linera & Meave 2002).

A través del estudio, se pudo observar que la población de *P. nitida* tiene un ciclo de floración regulado anualmente: al comienzo del registro fenológico (febrero 2013) se observaron individuos que estaban finalizando su etapa de floración, presentando flores en senescencia en el ápice de la inflorescencia, y al año siguiente (febrero 2014) había otros individuos que también finalizaban la floración.

No obstante, cabe resaltar que a pesar de que la floración es regular, se encontró que la intensidad de esta varió significativamente entre el 2013 y el 2014 (Kolmogorov-Smirnov =0.24, $P$= 0.44), ya que en el primer año (2013) se registraron un mayor número de rosetas fértiles a nivel poblacional y de parche que en el segundo (2014). Esta variabilidad en la intensidad de la floración entre los años ha sido reportada también para *P. cryptantha*, y se ha planteado como un mecanismo para contrarrestar el efecto que tiene la depredación sobre la dinámica poblacional de esta especie (Chaparro 2005). Así, la reproducción en

masa permite saciar rápidamente al depredador, razón por la cual una mayor proporción de propágulos escapa de este (Fenner 1998; Sakai 2001; Chaparro 2005).

De esta forma y teniendo en cuenta los datos de la intensidad de la floración entre el 2013 y 2014 que presentó *P. nitida*, se puede corroborar que esta presentó un mecanismo para contrarrestar la herbivoría, mediante el saciado de los depredadores; pues precisamente para el año en que hubo mayor producción de inflorescencias (2013), fue donde la herbivoría actuó con menor severidad.

Al momento de describir los patrones fenológicos, también es importante tener en cuenta y hacer la salvedad del nivel jerárquico o escala a la que se está refiriendo, ya que estos pueden ser heterogéneos y variar de un nivel a otro (flor, inflorescencia, rama, población, etc.) (Newstrom *et al.*, 1994).

En plantas que tienen reproducción clonal se suma la importancia de tener en cuenta los patrones fenológicos a nivel de *genet* y *ramet*, y las implicaciones del tamaño, la arquitectura y el arreglo espacial del clon; ya que pueden tener consecuencias sobre el éxito reproductivo de las plantas. Así, un aumento en el tamaño del clon y un arreglo espacial agregado contribuye a que se aumente la probabilidad de que los gametos pertenezcan al mismo *genet*, y se generen varios niveles de geitonogamia (entre flores del mismo *ramet* y entre flores de diferentes *ramets*) (Vallejo-Marín *et al.* 2010).

*Puya nitida* presentó densas agrupaciones de rosetas como resultado de la formación de clones (tipo falange). Dichas agrupaciones o parches, como se les denominó, presentan asincronía en sus estados fenológicos puesto que se pueden encontrar rosetas de diferentes edades y estados; tales como rosetas infértiles, fértiles (flores y/o frutos) y muertas. Las rosetas muertas, producto de floraciones de años pasados, indican que los *genets* se han reproducido sexualmente más de dos veces.

Por otro lado, los parches presentaron en promedio dos rosetas fértiles en la época de floración, debido a su desarrollo acrópeto se registraron flores en varios estadios de desarrollo, lo que muestra una asincronía también a este nivel. La apertura asincrónica de las flores dentro de las inflorescencias permite a las especies visitantes tener una oferta floral constante durante un período de tiempo más prolongado (2 meses) (Prada 2006). No obstante, debido a su despliegue floral, lo más probable es que exista un flujo de polen

limitado, que conduce a que haya geitonogamia entre las flores de la misma roseta y entre las flores del otro *ramet.*

El número de flores y de frutos por inflorescencia puede estar determinado por el tamaño, la edad, y otros aspectos de los rasgos de la historia de vida. En general, se ha reportado que puede existir una relación alométrica entre el tamaño corporal y la fecundidad de un individuo (Roff 1992, Stearns 1992 en Mora *et al.* 2005). Estas relaciones han sido encontradas en varias especies del género *Puya.* En el caso de *P.cryptantha* por ejemplo, el tamaño de la roseta estuvo relacionado con variables asociadas a la reproducción: como la longitud de las inflorescencias, la longitud de la porción reproductiva, y el número de frutos y semillas totales (Chaparro & Mora 2003; Mora *et al.* 2005). Con respecto a *P. nitida* se encontró una situación similar debido a que hubo una relación positiva entre el número de frutos y la longitud de la inflorescencia y la porción reproductiva de la misma; pero a diferencia de las otras especies, no se registró una relación entre el tamaño de la roseta (longitud de la hoja) y el número de frutos.

No obstante, cabe resaltar que el número de frutos desarrollados por inflorescencia, no solo depende de las relaciones alométricas de la planta, sino también de la efectividad de los polinizadores y/o de un sistema reproductivo autocompatible exitoso que conduce a una mayor tasa de producción de frutos (Chaparro & Mora 2003, Chaparro 2005). Esto también fue reportado para *P. clava-herculis*, donde la efectividad de los polinizadores jugó un papel fundamental y la alometría no explicaba por sí sola la relación entre la fecundidad y el tamaño de las inflorescencias (Miller 1987 en Chaparro & Mora 2003).

## 7.3 Sistema de reproducción sexual en *Puya nitida*

Existen varios parámetros para medir el éxito de las estrategias reproductivas en las plantas, tales como el crecimiento de tubos polínicos, formación de frutos ("*fruit set*"), número y/o peso de semillas por fruto, y viabilidad de semillas (germinación o de tinción con *tetrazolium)* (Dafni 2001). Cada uno de estos métodos posee ciertas ventajas y desventajas, y pueden ser usados dependiendo de las condiciones ambientales, de la historia de vida de la planta, etc.

De esta forma, el sistema de reproducción de *P. nitida* se midió a partir del número de frutos formados o *fruit set* en cada uno de los tratamientos de polinización manual

utilizados, puesto que dicho método se consideró como un nivel intermedio entre las limitaciones o barreras precigóticas y postcigóticas que se pueden generar a partir del crecimiento de los tubos polínicos y la germinación de semillas, respectivamente.

A pesar de lo anterior, se reconocieron varias condiciones que contribuyeron que el éxito de los experimentos fuera vulnerable, entre ellos, la lluvia, los vientos fuertes, el intervalo de tiempo prolongado para la maduración de los frutos (7 meses) y la intensidad del ataque por herbivoría, el cual afectó cerca del 41,3% de los experimentos realizados. Debido a ello y con el fin de evitar dichos riesgos, se recomienda realizar junto con el método de *fruit set*, el método de crecimiento de tubos polínicos, que consta de un procedimiento sencillo y que supera algunas de las condiciones mencionadas anteriormente (perdida de frutos por ataque de herbivoría u hongos), además, dicho método se ha considerado como una de las mejores aproximaciones para evaluar el éxito reproductivo y caracterizar la fase de polinización sin confundirla con la fase de formación de semillas, etapa que no solo depende del éxito de la polinización, sino también de la disponibilidad de recursos (Alonso *et al.* 2012).

Por otro lado, a pesar de que los experimentos de polinización manual, son el método más ampliamente usado para evaluar los sistemas de reproducción y la limitación de polen en las plantas, se han planteado una serie de aspectos que no deberían ser descuidados, puesto que pueden afectar el éxito de estos y alterar los resultados observados. Entre los que se pueden destacar están 1) la recolecta efectiva y correcta aplicación del polen en la superficie de los estigmas, 2) se requiere un conocimiento amplio de la biología floral, teniendo en cuenta aspectos como la receptividad estigmática y viabilidad del polen, 3) la cantidad y calidad del polen utilizado para hacer las polinizaciones, 4) los efectos de la emasculación sobre el desarrollo de la flor y posterior formación de frutos y semillas, 5) alcanzar una aplicación similar en cada uno de los tratamientos utilizados y 6) el uso de experimentos control (Hedhly *et al*. 2009; Alonso *et al.* 2012).

En el caso particular de los experimentos de polinización realizados para *P. nitida,* se trataron botones florales próximos a la antesis, específicamente en estado de desarrollo tres, donde el estigma esta receptivo y sus propias anteras no han liberado polen, y adicionalmente, para efectuar las polinizaciones cruzadas, polen de anteras dehiscentes, lo cual garantizaba en parte la efectividad de los cruces. Sin embargo, para estos no se tuvo en cuenta la cantidad de polen usado, es decir que no se estandarizaron las cargas de polen.

Dicha situación, puede influir sobre el número de óvulos fecundados, puesto que hay especies que necesitan al menos el doble de granos de polen con respecto al número de óvulos para que estos puedan fecundarse. Así, el exceso de polen no es inocuo para algunas especies, pues a largo plazo puede tener efectos positivos, ya que favorece la competencia gametofítica y esto podría resultar en una progenie más vigorosa, con un mayor número de frutos, de semillas e influir en rasgos relacionados con la germinación y biomasa de las plántulas (Mulcahy & Mulcahy 1987 en Murcia 2002; Chaúta-Mellizo *et al*. 2012); no obstante, la carga excesiva y repentina de polen, durante los experimentos manuales de polinización, podría tener efectos negativos para otras especies, puesto que este puede colapsar los estigmas y conducir a falsas conclusiones del sistema reproductivo o del fenómeno de limitación de polen (Murcia 2002; Ashman *et al.* 2004).

De igual forma, no se tuvo en cuenta los efectos de la emasculación sobre el éxito de los experimentos, y aunque es un procedimiento primordial para llevar a cabo las polinizaciones controladas, se ha evidenciado que este puede interferir en el desarrollo floral deteniendo el crecimiento de los pistilos, la fecundación de semillas, la formación de frutos y el crecimiento de los tubos polínicos (Hedhly *et al*. 2009).

De igual manera, para los experimentos de *P. nitida*, se uso la polinización natural como el único tratamiento control debido a que este no recibe ninguna manipulación, sin embargo, en otros estudios por lo general se ha usado también la agamospermia o apomixis, el cual es un modo de reproducción asexual común reportado en más de 300 especies de 40 familias de angiospermas, donde se forman semillas en ausencia de fertilización (Whitton *et al.* 2008). De esta forma, dicho tratamiento se convierte en un aspecto primordial para el estudio de sistemas reproductivos en plantas, puesto que además de demostrar que existe reproducción asexual, evita realizar estimaciones erróneas del *fruit set* inferido solo a partir de autopolinizaciones (Raduski *et al.* 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior y adicionalmente que este modo de reproducción ha sido reportado para *Puya trianae* y *P. cryptantha*, especies del mismo género y sitio de estudio, con una formación del 100 % de los frutos a partir de este tratamiento (Chaparro y Mora 2003, Chaparro 2005), sería fundamental incluir dicho aspecto en investigaciones futuras que se realicen en *P. nitida.*

Asimismo, fue imposible mantener el mismo tamaño de la muestra para cada uno de los experimentos, debido a la asincronía en la floración entre los individuos de *P. nitida* y a que en la misma inflorescencia se encontraron flores en varios estadios de desarrollo, lo cual hacia complicado encontrar polen maduro para los cruces y flores en el estado de desarrollo apropiado.

De acuerdo a los resultados encontrados para el *fruit set* y el índice de tasa de autoincompatibilidad (ISI) (ISI=0,08), *P. nitida* es en su mayor parte autoincompatible, puesto que la formación de frutos fue mayor para los experimentos de PCM, AP y PCN (≥ 50 %), lo cual indica que requiere de vectores de polen para producir un mayor número de frutos y por ende aumentar el éxito reproductivo de la planta.

A pesar de esto, los resultados encontrados se diferencian de los reportados por Chaparro (2005) para *P. trianae,* donde señala que esta es una especie altamente autocompatible, porque todas las flores con autopolinización inducida se transformaron en frutos (100%); asimismo, González *et al.* (2010) encontraron que según el ISI, *P. crytantha* y *P. clava-herculis* son autocompatibles; y Restrepo-Chica (2014) para *P. nitida* en otra población del P.N.N Chingaza, registró un ISI = 0,61, indicando que dicha población es parcialmente autocompatible.

Cabe resaltar que actualmente hay un creciente descontento con la medición del sistema reproductivo en plantas, mediante el índice de autoincompatibilidad (ISI), ya que clasifica dichos sistemas de forma discreta y a menudo binaria (autocompatible- autoincompatible), y también porque no tiene la capacidad de captar estados intermedios y la enorme variedad de estos. El aumento en la popularidad de este punto de vista, se debe a que varios estudios reportan que los sistemas de reproducción pueden variar entre las poblaciones e incluso entre los individuos (Raduski *et al.* 2011) y a su vez, que dicha variación puede ser el resultado de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, edad de la flor, condiciones internas del estilo, disponibilidad de vectores, limitación de polen, etc.) y /o genéticas (mutaciones o polimorfismos en locus multialélico S) (Lloyd & Schoen 1992; Vogler *et al*. 1998; Travers *et al.* 2004; Raduski *et al.* 2011).

De esta forma, existen diversos agentes potenciales de selección que pueden promover que los sistemas de reproducción mixtos sean un estado evolutivo estable (Busch *et al*. 2010; Raduski *et al.* 2011). Ashman *et al*. (2004) describe que la limitación de polen (LP) tiene

diferentes causas y consecuencias ecológicas y evolutivas, con implicaciones por ejemplo, en las historias de vida y los sistemas de apareamiento de las plantas. Así los caracteres reproductivos pueden evolucionar en mecanismos de aseguramiento de apareamiento en respuesta a la LP.

Una posible respuesta a la LP en algunas especies de plantas, es el "*delayed selfing"* o autopolinización retrasada, el cual es un modo de autopolinización que ocurre al final del desarrollo floral, donde a partir de los movimientos de las estructuras florales durante la etapa de senescencia se efectúa la autofecundación de flores que no hayan sido visitadas por polinizadores, garantizando de este modo la reproducción (Lloyd & Schoen 1992; Vogler *et al*. 1998; Travers *et al.* 2004; Busch *et al.* 2010; de vos *et al.* 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos para el *fruit set*, el ISI, la comparación con otras especies del mismo género y de la misma especie en otra población, y la descripción obtenida de biología floral para *P. nitida,* en donde se evidencia el contacto de la anteras con el estigma al final de desarrollo floral, se puede proponer a manera de hipótesis, que esta especie presenta un sistema reproductivo mixto, evolutivamente estable, que garantiza que la reproducción se efectué ya sea por polinización cruzada en etapas tempranas del desarrollo de la flor y cuando hay condiciones favorables de la misma, o por autopolinización autónoma en las últimas etapas de flor (comienzo de la senescencia) cuando los polinizadores son limitados.

Por otro lado, se encontraron diferencias en las variables de calidad de los frutos tenidas en cuenta (peso, alto y ancho), siendo los frutos de PCM y PCN más pesados y de mayor tamaño respecto a los otros tratamientos, lo cual puede indicar que la polinización cruzada y por ende la presencia de polinizadores, pueden conducir no solo a una mayor cantidad de los frutos, sino a que la calidad de los mismos se vea mejorada.

Este aspecto también ha sido reportado en otras especies de plantas, tales como *Media sativa, Eriobotrya japonica, Passiflora edulis* y *Physalis peruviana*, las cuales son especies autocompatibles, pero que con la presencia de polinizadores mejoran la calidad de los frutos, los cuales aumentan significativamente en peso, diámetro, número de semillas, etc. (Celedon-Neghme *et al.* 2007, Freihat *et al*. 2008, Angel-coca *et al.* 2011, Chautá-Mellizo *et al.* 2012).

Estas interacciones son relevantes en sistemas de agricultura, donde una reducción en la polinización puede disminuir la producción de valor comercial de frutos de mayor tamaño, etc. Así por ejemplo en *Physalis peruviana (uchuva)* se encontraron diferencias entre la autopolinización y la polinización mediada por abejas, encontrando un aumento en el *fruit set*, número de semillas y tasas de germinación, lo cual soporta la hipótesis que la eficiencia (calidad- cantidad de polen depositado) de la polinización aumenta el éxito reproductivo de las plantas (Chautá-Mellizo *et al.* 2012).

### 7.3.1 Germinación de semillas de *Puya nitida* bajo condiciones de laboratorio

Mediante las pruebas de germinación bajo condiciones de laboratorio, se logró evidenciar algunos aspectos que describen los patrones y requerimientos para la germinación de las semillas de *P. nitida* en este medio, como son: las condiciones de luz y temperatura, la viabilidad de las semillas y el tiempo que transcurre para que se dé inicio y el pico de germinación; las cuales permitieron a su vez, hacer inferencias acerca de los requerimientos básicos para la propagación natural y de las condiciones o limitantes que definen las características de los micrositios de establecimiento en esta especie de planta.

A nivel general, *P. nitida* presentó un porcentaje de germinación de semillas significativamente mayor para las condiciones de luz que de oscuridad, con valores del 79,6% y 12,7%, respectivamente, lo cual se asemeja a lo encontrado en otras especies de Bromelias como *Pitcairnia albiflos* (Pereira *et al.* 2010) y *Vriesea gigantea* (Giménez *et al.* 2005) y de Puyas como *P. raimondii* (Vadillo *et al.* 2004), *P. trianae* y *P. santosii* (Rodríguez 2012).

El alto porcentaje de germinación de semillas de *P. nitida* bajo condiciones de luz, permite incluirlas dentro de la clasificación de semillas fotoblasticas positivas, lo cual indica que las semillas de esta planta dependen de esta condición ambiental para poder germinar (Tenorio-Galindo *et al.*2008). Este aspecto pudo ser corroborado a su vez, al momento de examinar y hacer las pruebas de viabilidad de aquellas semillas que no germinaron luego de siete semanas (56 días) en el tratamiento de oscuridad, donde el 43,87 % correspondía a semillas viables según la prueba de tetrazolium y que no germinaron probablemente debido a la falta de luz, lo cual sugiere también, que *P. nitida* posee valores altos de viabilidad de semillas independientemente del tratamiento que se esté analizando.

De igual forma, *P. nitida* presentó un intervalo de tiempo menor para el inicio y el pico de la germinación de las semillas bajo condiciones de luz (15 días para el inicio y 14 días para el pico), que para las de oscuridad (24 días para el inicio y 34 días para el pico). La diferencia de tiempo en el inicio de la germinación entre los tratamientos fue de aproximadamente diez días. Lo anterior indica que la falta de luz conduce a que el proceso de germinación sea más lento, y concuerda con lo encontrado para *P. trianae* y *P. santosii* por Rodríguez (2012), quien reporta mayores velocidades de germinación en aquellos tratamientos donde había presencia de luz (12h luz/12h oscuridad y condiciones del laboratorio), especialmente en el de condiciones ambientales de laboratorio; y por Vadillo *et al*. (2004) para *P. raimondii*, quien encontró diferencias altamente significativas, al comparar los tratamientos de luz y oscuridad (tanto en condiciones naturales como controladas) con respecto al índice de velocidad de germinación usado, encontrando que los tratamientos de oscuridad presentaron los menores valores de dicho índice.

Aunque no se realizaron tratamientos de germinación teniendo en cuenta diferentes intervalos de temperatura, se evidenció que la temperatura a la cuales estuvieron sometidas las semillas (≈ 20º C) no las afectó notoriamente y por consiguiente, se podría sugerir que esta y las demás condiciones de laboratorio son suficientes para hacer pruebas de este estilo en la especie de estudio. De hecho, otras investigaciones de germinación de semillas de plantas de páramo, han probado que las condiciones de laboratorio no controladas, presentan mayores porcentajes de germinación que en condiciones de campo, esto debido probablemente a que factores ambientales, como las heladas nocturnas conducen a la dormancia y restricción en la germinación de las semillas (Guariguata & Azocar 1988; Rodríguez 2012).

Dadas las características anteriores, se puede manifestar que al igual que muchas otras especies de Bromelias, la temperatura y principalmente la luz son requerimientos indispensables en la regulación de la germinación de las semillas de *P. nitida* por lo que esto también puede considerarse como un patrón filogenético, y que a su vez, indica que la germinación y el establecimiento de las semillas de esta especie puede ser limitada por micrositios con condiciones de luz específicas.

# 7.4 Interacción planta-animal

## 7.4.1 Visitantes florales

Las visitas a las flores de *Puya nitida* estuvieron dominadas por aves nectarívoras principalmente por colibríes, los cuales representaron el 97,6 % del total de las visitas, estos resultados soportan lo encontrado en varios estudios donde se resalta la importancia de las plantas de la familia bromeliaceae (*Aechmea pectinata, Aechmea distichantha, Anana ananassoides*) (Ferreira & Sazima 2003, Scrok & Galarda 2011, Marin *et al.* 2012), y especialmente de las puyas *(P. nitida, P. raimondii, P. rauhii, P. alpestris, P. chilensis, P. coerulea, P. venusta)* (Gutiérrez 2005, Salinas *et al.* 2007, Hornung-Leoni *et al.* 2013) como una de las principales fuentes de néctar disponibles para los colibríes, importantes polinizadores de estas plantas.

Por ejemplo, Salinas *et al*. (2007) evaluaron la importancia del néctar de las bromelias *Puya rainmondii* y *Puya rauhii* como recurso para los picaflores altoandinos de la región de Ancash, Perú, determinando que estas especies de plantas proporcionan un importante recurso alimenticio para los picaflores presentes en este sitio, ya que estos fueron los visitantes observados con más frecuencia y cuyas cargas de polen constaban el 80 % y el 31% de *P. rainmondii* y *P. rauhii*, respectivamente. De igual forma, Gutiérrez (2005) encontró que en el sub-páramo de Torca (Cundinamarca), la familia Bromeliaceae y especialmente *Puya nitida* era una de las especies de plantas con una floración estacional importante para la dieta de por lo menos cinco especies de colibríes en la zona.

Por otro lado, se confirmó la hipótesis dada a partir de los rasgos de la biología floral descritos para *P. nitida*, donde se esperaba que de acuerdo al color de la corola, las características de la producción de néctar, el tiempo de la antesis, distancia entre la cámara de néctar y los órganos sexuales, etc. fueran visitados por aves, principalmente por colibríes, lo cual a su vez está relacionado con la propuesta de los síndromes de polinización, descritos por Faegri & van der Pijl (1979), donde señalan que las características específicas de la morfología floral, están asociadas con la atracción y el uso de un grupo especifico de animales para la polinización (Cronk & Ojeda 2008).

Sin embargo, vale la pena resaltar que se evidenciaron varios aspectos que indican que las interacciones de esta planta con sus visitantes no son ultra-especializadas o de evolución

reciproca, sino que más bien se trata de interacciones asimétricas con un grado intermedio de especialización, lo cual podría ser evolutivamente más ventajoso, ya que se puede optimizar la eficiencia de la polinización y a su vez mantener opciones abiertas con otro tipo de visitantes o fuentes de recursos simultáneos (Murcia 2002), especialmente, en ambientes paramunos donde las oportunidades de polinización, en muchas ocasiones son limitadas (Chaparro 2005).

Algunos de los aspectos que indicaron que *P.nitida* y sus visitantes no tuvieron interacciones ultraespecializadas fueron: 1) la planta fue visitada por varias especies de colibríes y una *Diglossa*, 2) Se observaron que las aves visitaban plantas de otras familias, principalmente Ericaceas, 3) la interacción entre los colibríes y *P. nitida* fue de corta duración, ya que la longitud de la época de floración fue de tres meses aproximadamente, y 4) hubo variación en la frecuencia y forma de realizar la visita de cada uno de los visitantes registrados.

La efectividad de los polinizadores se refiere en sentido estricto a la contribución total al éxito reproductivo de las plantas por animales que polinizan sus flores, la cual puede estimarse en términos de la eficiencia de los polinizadores y su frecuencia en las visitas (Fumero-Cabán & Melendez-Ackerman 2007). De esta forma, la eficiencia de la polinización se puede medir teniendo en cuenta la cantidad y la calidad de los granos de polen compatibles depositados en el estigma luego de ser visitados (Fumero-Cabán & Melendez-Ackerman 2007). No obstante, tanto la calidad como la cantidad del polen que transporta un vector, puede depender de acuerdo al uso del hábitat, la presencia de polen de otras especies, el tamaño del cuerpo, la longitud del pico, el grado de contacto que haya tenido con las partes reproductivas de la flor, entre otras (Murcia 2002, Rocca & Sazima 2013).

Aunque en el presente estudio no se estimó las cargas de polen (debido a las condiciones climáticas), la cantidad y la calidad de polen depositado en los estigmas de *P. nitida* por cada uno de los visitantes florales, y por ende su contribución al *fitness* de la planta, se pudieron observar diferencias significativas entre ellos, tanto en el comportamiento al momento de realizar la visita como en su morfología, permitiendo inferir cuáles de ellos contribuyeron más a la polinización o fueron los más eficientes.

De esta forma, *Eriocnemis vestita, Lesbia victoriae* y *Chalcostigma heteropogon* fueron especies más eficientes, en comparación con *Pterophanes cyanopterus* y *Diglossa humeralis*, debido a que las tres primeras fueron avistadas más frecuentemente (> 9 registros), duraron más tiempo en la visitas y tuvieron técnicas de forrajeo similares como consecuencia posiblemente también, de las semejanzas en su morfología (tamaño, longitud del ala, longitud del culmen total).

Asimismo, estas especies visitaron siempre a *P. nitida* de forma legítima, sosteniéndose de la flor que estaban visitando o de otras que estaban más abajo, entrando en contacto con las partes reproductivas de la flor y depositando el polen en las plumas de su cabeza. Este comportamiento puede favorecer la polinización, ya que en el percheo el ave destina más tiempo y aumenta la probabilidad de que se deposite más polen sobre el estigma. Tal como lo reporta Prada (2006) en *Plutarchia guascensis* (Ericaceae), donde argumenta que el modo de forrajeo por percha usado por *Metallura tyrianthina*, les permite extraer todo el néctar de la flor con un menor consumo energético y favorecer la polinización de esta. Por otro lado, las visitas por *E. vestita*, *L. victoriae* y *C. heteropogon en P.nitida*, también se caracterizaron por intercalarlas con "descansos" en perchas de plantas vecinas o en la copa de la misma inflorescencia de la planta de estudio.

Prada (2006), también reportó a *Eriocnenis vestita* como uno de los polinizadores más eficientes de *Plutarchia guascensis,* puesto que presentó el mayor número de visitas legitimas, transportó el mayor numero de granos de polen y además tuvo un éxito del 77, 7 % en la formación de frutos de esta planta. No obstante, Restrepo- Chica (2014) observó a *Eriocenis vestita,* comportándose como un ladrón secundario de *P. nitida* en otra región de P.N.N Chingaza, haciendo uso de los agujeros que se encontraban en la base de las corolas y que realizaban aves como Diglossas. Esto demuestra que los comportamientos de las aves visitantes y polinizadoras pueden estar influenciados por factores tales como: la morfología del visitante, la disponibilidad y la calidad de la recompensa, la abundancia espaciotemporal de las flores, ladrones y polinizadores; y que la clasificación de visitantes florales como ladrones y polinizadores puede ser reduccionista, ya que algunos ladrones pueden actuar como polinizadores (Stiles *et al*. 1992) y viceversa (Arizmendi *et al.* 1996; Navarro 1999, 2001).

Por otro lado, se reconoció también que las aves visitantes podían contribuir a la geitonogamia en las inflorescencias y entre las inflorescencias (En caso de que hubiera ≥ 2

inflorescencias) de esta planta, pues visitaban en un solo recorrido todas las flores que había disponibles en el parche. Loyd & Schoen (1992) y Vallejo-Marín *et al*. (2010) reconocen que la geitonogamia está determinada en gran parte por el arreglo espacial de las flores, y en plantas clonales por el tamaño y la arquitectura de clon; además, describen que hay una cierta cantidad de geitonogamia que es inevitable en plantas autocompatibles que producen varias flores en antesis al mismo tiempo, porque el comportamiento de los polinizadores independientemente del grupo animal, muestran movimientos que ocurren entre inflorescencias cercanas, siguiendo una distribución leptocurtica.

Contrario a lo encontrado en las especies de colibríes mencionadas anteriormente, *P. cyanopterus* se registró como un polinizador de baja eficiencia, porque a pesar de presentar visitas legitimas entrando en contacto con las partes reproductivas de la flor, mostró visitas esporádicas, menos frecuentes, más rápidas y con una forma de forrajeo tipo *"hovering",* donde las aves colectan el néctar revoloteando sin aterrizar en la planta (Cronk & Ojeda 2008).

Roca & Sazima (2013) también reportaron diferencias en la efectividad de la polinización de *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae), por los colibríes *Thalurania glaucopis* y *Ramphodon naevius* a partir de la frecuencia de la visita y el contacto de las estructuras reproductivas de la planta con el cuerpo de las aves. Encontrando que *T. glaucopis* fue el polinizador más eficiente, porque 1) presentaba una longitud de pico menor, que le permitía recibir el polen en su cabeza, y a su vez depositarlo en el centro del estigma, y 2) porque tuvo una mayor frecuencia en las visitas probando también un número mayor de flores.

Finalmente, a pesar de que *Diglossa humeralis* fue observada solo en una ocasión, esta no entró en contacto con las partes reproductivas de la flor, y por el contrario perforó la base de la corola para acceder al néctar; No obstante, no se encontraron flores con daños en los óvulos y no se conoció el efecto que puede tener este fenómeno en la polinización y reproducción de *P. nitida*.

Este tipo de visitas ha sido reportado en otras especies de plantas y es considerado típico de las aves de este género, ya que poseen una morfología especial del pico (forma de gancho) que les permite extraer el néctar de manera "ilegítima", sin efectuar la polinización

(Navarro 1999; Arizmendi *et al.*1996; Rojas 2005); lo cual puede conducir a varias consecuencias, ya que "los ladrones de néctar" pueden disminuir la producción y modificar la concentración de este recurso, y a su vez, afectar significativamente la distribución de la recompensa para los polinizadores legítimos (Irwin & Brody 1998).

No obstantes, se ha manifestado que este mecanismo (robar néctar) puede tener efectos negativos y/o positivos sobre las plantas polinizadas por colibríes; así, las plantas se pueden ver beneficiadas por los ladrones si estos actúan como polinizadores de baja eficiencia, y perjudicados si los ladrones intervienen directa e indirectamente con los polinizadores a través de agresiones y competencia al explotar el mismo recurso (Irwin 2003).

### 7.4.2 Herbivoría

*Puya nitida* no presentó herbivoría en la parte vegetativa de las rosetas, al igual que lo reportado para *P. cryptantha* (Chaparro & Mora 2003), debido probablemente a que este género presenta mecanismos que pueden evitarla, tales como la presencia de hojas coriáceas y espinas. No obstante, las estructuras reproductivas fueron muy vulnerables al ataque y a la interacción con varias especies antagonistas, los cuales propiciaban el consumo de los primordios florales, flores y depredación pre-dispersión de semillas.

En *Puya nitida* se observaron signos de herbivoría en diferentes etapas del desarrollo de las inflorescencias y de las flores individuales; como primera medida se reconoció depredación en los primordios de las inflorescencias, los cuales presentaron daños más evidentes y fáciles de cuantificar. De esta manera, en dicha estructura se lograron identificar tres niveles de depredación que pueden tener a su vez, diferentes implicaciones en el éxito reproductivo de la planta.

El primer nivel incluyó el 52,9% de los primordios registrados, en donde se evidenció que la estructura fue afectada totalmente por el consumo y la descomposición de larvas de varias especies de dípteros y coleópteros, impidiendo que el desarrollo de las flores culminara y eliminando por completo cualquier probabilidad de producir frutos y semillas. Por otro lado, el 20,58% de los primordios registrados correspondió al segundo nivel, en donde las estructuras presentaban daños parciales en 2/3 partes o en ≈ 66% de estas, lo cual

permitía que entre 3-5 flores se desarrollaran, abrieran simultáneamente y llegado el caso fueran visitadas por animales. Finalmente, el tercer nivel perteneció al 26,5% restante de los primordios, los cuales presentaron herbivoría en 1/3 o menos (≤ 33,3%) de la parte reproductiva y pudieron formar un número mayor de botones y flores.

Teniendo en cuenta lo anterior, el número de botones y flores disponibles para realizar experimentos, mediciones y observaciones de los otros ítems del presente trabajo (experimentos de polinización, seguimiento del desarrollo floral, medición de néctar, observación de visitantes, etc.) se vio reducido significativamente, ya que se perdieron cerca del 73,5% de los primordios marcados, pudiendo trabajar solo con nueve de estos.

Asimismo, el daño correspondiente al nivel uno y dos, afectaron directamente la totalidad o gran parte de la fecundidad de la roseta y por ende el éxito reproductivo de la misma, debido a que no se produjeron gametos, impidiendo que dichos individuos más adelante aportaran a la reproducción mediante la formación de semillas.

Lo anterior, podría tener efectos sobre la dinámica poblacional de la especie, ya que se ha reportado que este aspecto puede ser sensible a cambios en los diferentes estados de las historias de vida de las especies de plantas, y más aun si se tiene en cuenta que las plantas monocárpicas-perennes dependen del éxito de la producción de semillas viables, por lo que un daño en los tejidos florales se podría traducir en cambios de las tasas demográficas (Chaparro & Mora 2003).

No obstante, vale la pena resaltar que durante el estudio se encontraron diferencias significativas, en el número de rosetas fértiles que produjeron flores y frutos posteriormente, en los parches y a nivel de población entre el año 2012 y 2013, siendo superior para el primer periodo; Por lo que se podría pensar que la floración en masa durante ciertos años, es un mecanismo que posiblemente está empleando *P. nitida* para contrarrestar el efecto que tiene la depredación sobre la dinámica poblacional, permitiéndole saciar rápidamente al depredador, y que una mayor proporción de propágulos escape de estos.

Dicho mecanismo ha sido reportado también para *P. cryptantha*, en donde reconocieron una alta variabilidad en la intensidad de la floración entre los años, lo cual puede minimizar el efecto negativo que tiene la depredación sobre la dinámica poblacional de esta especie de planta (Chaparro & Mora 2003). Por consiguiente, se fortalece la idea de que las consecuencias demográficas a causa de la depredación de los primordios y otras interacciones biológicas, pueden depender últimamente de la historia de vida de la planta, de la variación espacial y temporal del ataque, y del estado demográfico actual de la población.

Por otro lado, aunque no se midieron los efectos indirectos de los niveles de depredación de primordios uno y dos sobre el éxito reproductivo de *P. nitida*, se cree que las bajas tasas de visitas por parte de los polinizadores se debieron posiblemente a la reducción de atrayentes florales como flores y néctar, y porque hubo un cambio evidente en la distribución espacial de los individuos, haciendo que estos se encontraran más distanciados y con menos densidad. Esto ha sido descrito por varios autores, los cuales señalan que los cambios en la oferta floral, la distancia entre las inflorescencias, pueden tener efectos sobre el número de visitas y composición de los polinizadores, y por consiguiente, en la cantidad y calidad de polen depositado, los sistemas reproductivos de las plantas, el número de frutos producidos, etc. (Strauss 1997, Krupnick & Weiss 1999, García-Robledo *et al*. 2005, Penet *et al*. 2009).

*Puya nitida* también presentó herbivoría por parte de adultos y larvas de insectos en estructuras florales como pétalos, estambres, pistilos, polen y óvulos, aunque no se cuantificó ni estimó el efecto sobre el éxito femenino y masculino, y por ende la fecundidad de las plantas, se pudo describir el tipo de herbivoría, reconocer las estructuras afectadas y la o las etapas de cuando esta ocurre, temas que son primordiales para poder comprender este aspecto (Krupnick & Weis 1999, McCall & Irwin 2006, Penet *et al.* 2009).

De esta forma, la florivoría no fue fácil de detectar, puesto que podía comenzar desde etapas tempranas del desarrollo de la flor (botones), afectando gradualmente cada una de las estructuras inmaduras que se encontraban en el interior (anteras y pistilo) e impidiendo en muchas ocasiones que la flor culminara con su desarrollo. Asimismo se evidenció

florivoría en fases del desarrollo más avanzadas, pero en ningún caso en flores senescentes. Lo anterior puede estar relacionado con la calidad del recurso que consumen los insectos, pues botones y flores jóvenes poseen mayor cantidad y calidad de polen y néctar, y tejidos más suaves para su alimento (Alves-Silva *et al.* 2013); y puede ser de considerable interés para las tasas reproductivas de la planta, ya que la herbivoría en botones florales, esta negativamente relacionado con la producción de frutos más adelante (Alves-Silva *et al*. 2013).

Finalmente, *P. nitida* también presentó depredación pre-dispersión de semillas, que se caracteriza por el consumo de frutos y semillas cuando estas no están completamente maduras y aín no se han dispersado (Ramírez & Traveset 2010). Al igual que los otros tipos de depredación, esta puede tener efectos sobre el éxito reproductivo de las plantas, y más aún si se tiene en cuenta que el daño a las semillas puede ser más costoso que el daño a estructuras florales, puesto que probablemente los óvulos fertilizados son más valiosos que aquellos que están sin fertilizar (McCall & Irwin 2006).

Existen diferentes tipos de depredación pre-dispersión los cuales dependen de 1) el estado en el cual se encuentra el insecto, es decir, si es una larva o un adulto, 2) de la manera en que explotan el recurso, 3) si dentro del fruto se desarrolla una o más de una larva y 3) si la larva consume una o más semillas. Estas particularidades pueden influir en el nivel de especialización del insecto en el uso del recurso (Ramirez & Traveset 2010).

De esta manera, en las brácteas de la parte superior del escapo y de los frutos de *P. nitida,* dipteros y coleópteros adultos copularon y depositaron huevos que luego mediante el desarrollo de larvas, depredaron las semillas de esta especie de planta. En general se identificaron varios tipos de herbivoría, el primero ocurrió cuando las semillas en estado maduro (color café) fueron consumidas totalmente, excepto el área del ala por larvas de una especie desconocida, posiblemente de un coleóptero; el segundo se caracterizó porque larvas de un escarabajo de la familia Nitidulidae, comenzaron a consumir las semillas dentro del fruto, cuando este estaba en un estado de desarrollo temprano y sus semillas tenían tejidos suaves de color blanco; y finalmente el tercero, se observó luego de que el fruto y las semillas se encontraran en un estado más avanzado de herbivoría, hallando varias larvas de diferentes especies que podían simultáneamente alimentarse de las

semillas y de los desechos orgánicos producidos por ellas mismas, de ahí que se encontraran frutos e infrutescencias en alto grado de descomposición.

Estas clases de herbivoría se diferenciaron de las reportadas por Chaparro & Mora (2003), puesto que mencionan que los frutos y las semillas de *P. cryptantha* fueron afectados principalmente por larvas de mosca y larvas de polilla; las primeras consumían la parte de la medula del eje de la inflorescencia, inhibiendo el desarrollo de los frutos, y las ultimas se caracterizaron porque una única larva afectaba las semillas de un único lóculo por fruto, antes de que este hiciera dehiscencia.

De acuerdo a todas las interacciones descritas anteriormente, se puede afirmar que *P.nitida* es un recurso importante no solo para sus polinizadores, sino también para una gran variedad de formas de vida, incluyendo insectos adultos y larvas, que encuentran en esta planta refugio y alimento (Anexo C); además se confirma que en torno a una sola especie se pueden establecer distintos eventos y mutualismos producto de actividades ecológicas. (Franco-Saldarriaga & Restrepo-Chica 2009).

# 8. Conclusiones

Cuatro componentes de la biología floral de *Puya nitida* indican que la polinización cruzada aporta de manera contundente a la reproducción sexual de esta especie: 1) presenta rasgos florales relacionados con el síndrome de ornitofilia, como flores tubulares de colores rojos, sin aroma, antesis diurna, producción de néctar diluido, etc. 2) presenta una corola amplia y una disposición de las anteras que favorece que colibríes de pico corto y largo accedan de manera legitima al néctar y entren en contacto con las partes reproductivas de la flor, 3) muestra flores y estigmas receptivos por un amplio intervalo de tiempo ( > 5 días), y 4) presenta separación temporal (dicogamia) y espacial (hercogamia) de los órganos masculinos y femeninos.

El posible evento de autopolinización retrasada durante las últimas etapas del desarrollo floral de *P. nitida,* permite que la fecundación de los óvulos se complete con polen propio cuando el servicio del polinizador ha sido insuficiente. Esto les permite asegurar la fecundación en el único evento reproductivo que estas plantas presentan.

El hecho de que la floración se presente en la época de menos precipitación, presenta ventajas en la polinización de las flores *P. nitida*, debido a que este clima favorece el vuelo y la actividad de los colibríes polinizadores.

De acuerdo al índice de autoincompatibilidad (ISI) *P. nitida* presenta un sistema de reproducción en su mayor parte autoincompatible. Sin embargo, se evidencia la posibilidad de mantener un sistema mixto (autogamia-xenogamia), que asegura de cualquier forma, el éxito de la reproducción sexual.

El mayor número y mejor calidad de los frutos generados a partir de los experimentos de polinización cruzada manual y polinización natural sugiere que *P. nitida* requiere de vectores de polen para aumentar el éxito reproductivo de la planta.

El alto número de semillas y la alta tasa de germinación y viabilidad de las mismas, es una estrategia que beneficia la reproducción sexual de *P. nitida*. No obstante, en condiciones naturales la germinación y el establecimiento de éstas puede estar determinado por las condiciones de luz que presentan los micrositios, debido a que son semillas fotoblásticas positivas.

De acuerdo a la morfología, frecuencia y duración de las visitas, y técnica de forrajeo mediante el uso de la percha, *Eriocnemis vestita*, *Lesbia victoriae* y *Chalcostigma heteropogon* son los polinizadores con mayor eficiencia de *P. nitida.*

Larvas e insectos de los ordenes Diptera (subfamilia Bibionidae, Psychodidae y Syrphidae), Hymenoptera (subfamilia Opiinae, género Opius) y Coleoptera (subfamilia Staphylinidae y Nitidulidae) afectan negativamente el éxito reproductivo de *P. nitida*, cuando consumen estructuras reproductivas como los primordios de las inflorescencia, flores, frutos y semillas.

El presente estudio contribuye a la comprensión de los procesos evolutivos y de la selección de los sistemas de reproducción sexual de las plantas, en ecosistemas de alta montaña y páramo, y aporta información para el diseño de estrategias de conservación y restauración enfocadas en recuperar no solo la estructura, sino la dinámica de dichos ecosistemas.

# 9. Recomendaciones

Evaluar más de un año el patrón fenológico de *P. nitida*, puesto que puede existir variación en la intensidad de los estados fenológicos de un año a otro y adicionalmente, para comprobar si efectivamente existen mecanismos que permiten la saciación de los depredadores.

Estudiar el aporte tanto de la reproducción clonal, como de la reproducción sexual a la dinámica de la población de *P. nitida.*

Evaluar en detalle el efecto que tiene la arquitectura del clon sobre la reproducción sexual de la especie de estudio.

Aumentar el tamaño de la muestra para realizar los experimentos de polinización manual, y evaluar el éxito de cada uno de ellos a partir del numero de semillas germinadas y del crecimiento de tubos polínicos debido a las condiciones encontradas en el paramo.

Evaluar si verdaderamente existe limitación de polen en la población, mediante experimentos de suplementación de polen.

Realizar experimentos de apomixis ya que otras especies de *Puya* lo han presentado y además con el fin de evitar hacer estimaciones erróneas del *fruit set* inferido solo a partir de la autopolinización.

Evaluar el sistema reproductivo en varias poblaciones de *P. nitida* ya que pueden existir diferencias.

Aumentar el esfuerzo de muestreo para la observación de visitantes florales, teniendo registros a lo largo del día y comprarlos con la producción diaria de néctar.

Realizar capturas con redes de niebla, cargas de polen y experimentos de polinización con los visitantes florales, y definir así más detalladamente la eficiencia de estos.

# 10. Bibliografía

ÁNGEL-COCA, C., NATES-PARRA, G., OSPINA-TORRES, R., MELO ORTIZ, C. D. & AMAYA-MARQUEZ, M. 2011. Biología floral y reproductiva de la gulupa P*assiflora edulis* sims f. *edulis. Caldasia* 33, 433-45.1.

ALONSO, C., HERRERA, C. M. & ASHMAN, T. 2012. A piece of the puzzle: a method for comparing pollination quality and quantity across multiple species and reproductive events. *New Phytologist* 193, 532–542.

ALVES-SILVA, E., MARUYAMA, P.K., CAVALLERI, A & DEL-CLARO, K. 2013. Flower stage and host plant preference by floral herbivore thrips (Insecta: Thysanoptera: Frankliniella) in a Brazilian savanna**.** *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 1, 2-7.

ASHMAN, T., KNIGHT, T.M., STEETS, J. A., AMARASEKARE, P., BURD, M., CAMPBELL,D.R., DUDASH, M.R., MARK O., JOHNSTON, M.O., MAZER,S.J., MITCHELL, R.J., MORGAN, M.T. & G. WILSON, W.G.2004. Pollen Limitation of Plant Reproduction: Ecological and Evolutionary Causes and Consequences Ecology, 85, 2408-2421.

ARIZMENDI, M. DOMINGUEZ, C & DIRZO, R. 1996. The role of an avian nectar robber and of hummingbird pollinators in the reproduction of two plant species. *Functional Ecology*. 10, 119-127.

AYRE, D.J., FIELD, D., AYRE, D. & WHELAN, R. 2005. The effect of local plant density on pollinator behavior and the breeding system of *Persoonia bargoensis* (Proteaceae). *International journal of plant sciences*. 166, 969- 977.

BARRETT, S.C.H. & HARDER, L.D. (1996). Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 73–79.

BARRETT, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3, 274-28.

_____ 2010. Understanding plant reproductive diversity. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365, 99–109.

BETANCUR, J. L. 2001.Guia ilustrada de las bromelias de Bogotá y sus alrededores. Departamento técnico administrativo (DAMA). Impresol ediciones Ltda. Bogotá. Colombia.

BRAND – PRADA, M. 1994. Interacciones entre los colibríes y la ericáceas *Macleania rupestris y Bejaria resinosa* en un páramo de Colombia. En: Luis Eduardo Mora-Osejo & Helmut Sturn (eds.) Estudios ecológicos del páramo y del bosque altoandino Cordillera Oriental de Colombia. Tomo II, *Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* Colección Jorge Álvarez Lleras; Nº 6. Santa fe de Bogotá.

BUSCH, J. W., HERLIHY, C.R., GUNN, L. & WERNER, W.J. 2010. Mixed mating in a recently derived self-compatible population of *Leavenworthia alabamica* (BRASSICACEAE). *American Journal of Botany* 97, 1005–1013.

CAIRAMPOMA. L & MARTEL. C. 2012. Notas sobre los visitadores florales de *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanstein (Gesneriaceae). *Rev. Peru. Biol*. 19, 11-19.

CARIVEAU, D., IRWIN, R. E., BRODY, A.K., GARCIA-MAYEYA, L.S. & VON DER OHE. A. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104, 15–26.

CASWELL, H. 1985. The evolutionary demography of clonal reproduction. pp. 187-224. In: J. B. C. Jackson, L. W. Buss and R. E. Cook (eds.) Population Biology and Evolution of Clonal Organisms. Yale Univ. Press.

CELEDÓN-NEGHME, C.,WILFREDO L. GONZÁLES, C.W. & GIANOLI. E. 2007. Cost and benefits of attractive floral traits in the annual species *Madia sativa* (Asteraceae). *Evol Ecol* 21, 247–257.

CHAPARRO, H. A & MORA. F. 2003. Aporte de la reproducción sexual y asexual en la dinámica de una población de rosetas de *Puya cryptantha*. En el P.N.N Chingaza. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.

CHAPARRO, H. A. 2005. Biología reproductiva de la bromelia terrestre *Puya trianae* en el parque Chingaza. En: Bonilla, M. A (ed) Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera Oriental de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

CHAUTÁ-MELLIZO, A., CAMPBELL, S. A., BONILLA, M. A., THALER, J.S. & KATJA POVEDA, K. 2012. Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and Applied Ecology* 13,524–532.

CRONK, Q. & OJEDA, I. 2008. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany* 59,715–727.

DAFNI, A. 2001. Field methods in pollination ecology. Institute of evolution University of Haifa, Haifa, Irsael. 103p.

DE VOS, J. M., KELLER, B., ISHAM, S.T., KELSO, S.& CONTI, E. 2012. Reproductive implications of herkogamy in homostylous primroses: variation during anthesis and reproductive assurance in alpine environments.*Functional Ecology* 2012, 26, 854–865.

ELLIOT, S & IRWIN, R. 2009. Effects of flowering plant density on pollinator visitation, pollen receipt, and seed production in *Delphinium barbeyi* (Ranunculaceae). *American Journal of Bonaty*. 96,912-919.

FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. 1979. The principles of pollination ecology. Third edition. Pergamon Press. Oxford, England. 244p.

FENNER. M. 1998. The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1, 78–91.

FERREIRA-CANELA, M. B. & SAZIMA, M. 2003. *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with incospicuous flower from the rainforest in south- eastern Brazil. *Annals of Botany* 92, 731- 737.

FRANCO-SALDARRIAGA, A. & RESTREPO-CHICA, M. 2009. Biologia floral y visitantes florales de *Cavendishia nitida* (Kunth) A.C. Smith. (ERICACEAE), en La Reserva Natural La Montaña, Salento, Quindío. Trabajo de pregrado. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias básicas. Programa de Biología. Armenia- Quindío.

FRANK, J. H & LOUNIBOS, L. P. 2009. Insects and allies associated with bromeliads: a review. *Terr Arthropod Rev*. 1, 125–153.

FREIHAT, N. M., AL-GHZAWI, A. A., ZAITOUN,S. & ALQUDAH, A. 2008. Fruit set and quality of loquats (*Eriobotrya japonica*) as effected by pollinations under sub-humid Mediterranean. *Scientia Horticulturae* 117, 58–62.

FUMERO-CABÁNN, J. J. & MELÉNDEZ-ACKERMAN, E.J.2007. Relative pollination effectiveness of floral visitors of Pitcairnia angustifolia (Bromeliaceae) *American Journal of Botany* 94, 419–424.

GALETO, L., FIONI, A. & CALVIÑO, A. 2002. Éxito reproductivo y calidad de los frutos en poblaciones del extremo sur de la distribución de *Ipomoea porpurea* (CONVOLVULACEAE). Darwiniana 40, 25-32.

GARCÍA-MENESES, P. M & RAMSAY, P.M. 2012. Pollinator response to within-patch spatial context determines reproductive output of a giant rosette plant. *Basic and Applied Ecology* 13,516–523.

GARCÍA-ROBLEDO, C., KATTAN, G., MURCIA, C. & QUINTERO-MARÍN, P. 2005. Equal and Opposite Effects of Floral Offer and Spatial Distribution on Fruit Production and Predispersal Seed Predation in *Xanthosoma daguense* (Araceae). Biotropica, 37, 373-380.

GARCÍA, N & GALEANO, G. 2006. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Volumen 3: Las bromelias, las labiadas y las pasifloras. Serie libros rojos de especies amenazadas de Colombia. Bogotá. Instituto Alexander von Humboldt- Instituto de ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia- Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo.

GIMÉNEZ-BENAVIDES, L., ESCUDERO, A. & PÉREZ-GARCÍA. F. 2005. Seed germination of high mountain Mediterranean species: altitudinal, interpopulation and interannual variability. *Ecol Res* 20, 433–444.

GÓMEZ, J. M. 2002. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista Chilena de historia natural* 75, 105-116.

GÓMEZ, J & PERFECTTI, F. 2009. Diversidad de polinizadores, generalización ecológica y conservación de plantas. En: Ecología y evolución de interacciones planta-animal. Editorial Universitaria, S.A. ISBN 62- 77p.

GONZÁLEZ, M.S., URBANO, S.M. & PIANDA. M. 2010. Patrones de biología reproductiva de *Puya clava-herculis* y *Puya cryptantha* en ambientes paramunos contrastantes en el departamento de Nariño. *Rev. Asoc. Col. Cienc*. 22, 132-146.

GUARIGUATA, M.R. & AZOCAR, A. 1998. Seed Bank Dynamics and Germination Ecology in Espeletia timotensis (Compositae), an Andean Giant Rosette. *Biotropica* 20, 54-59.

GUISANDE. C., VAAMONDE. A. & BARREIRO.A. 2011. Tratamiento de datos con R, STATISTICA y SPSS.Ediciones Díaz de Santos. España. ISBN 975p.

GUTIÉRREZ, A. & ROJAS, S. 2001. Dinámica anual de la interacción colibrí – flor en ecosistemas alto–andinos del Volcán galeras, Sur de Colombia. Tesis de grado. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia.

GUTIÉRREZ, A. 2005. Ecología de la interacción entre colibríes (Aves: Trochilidae) y plantas que polinizan en el bosque Alto – andino de Torca. Bogotá. Tesis de postgrado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencia, Departamento de Biología.

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I & HERRERO, M. 2009. Flower emasculation accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry. *Scientia Horticulturae* 119, 455–457.

HORNUNG-LEONI, C.T., GONZÁLEZ-GÓMEZ, P.L. & TRONCOSO, A. J. 2013. Morphology, nectar characteristics and avian pollinators in five Andean Puya species (Bromeliaceae). *Acta Oecologica* 51, 54- 61.

IRWIN, R & BRODY, A. 1998. Nectar robbing in *Ipomopsis aggregate*: effects on pollinator behavior in plant fitness. *Oecología*.116, 519 – 527.

IRWIN, R. 2003. Impact of nectar robbing on estimates of pollen flow: conceptual predictions and empirical outcomes. *Ecology* 84, 485-495.

IRWIN, R. 2009. Realized tolerance to nectar robbing: compensation to floral enemies in *Ipomopsis aggregata. Annals of Botany* 103, 1425–1433.

KARRON, J.D., IVEY, C. T., MITCHELL, R. J., WHITEHEAD, M. R., PEAKALL. R & CASE, A. L. 2012. New perspectives on the evolution of plant mating systems. *Annals of Botany* 109, 493–503.

KÖRNER. C. 2003. Alpine plant life. Functional plant ecology of high mountain ecosystems. Segunda edición. Springer. New York. 349 p.

KRUPNICK, G. A. & WEIS, A. E.1999. The Effect of Floral Herbivory on Male and Female Reproductive Success in *Isomeris arborea*. *Ecology* 80,135-149.

LARA, K. & BONILLA, M.A. 2006. Aspectos de la biología reproductiva de una población de Puya trianae Baker, en la reserva municipal de Cogua. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1)

LLOYD, D.G & SCHOEN, D. J. 1992. Self and cross fertilization in plants. I.functional dimensions. *International journal of plant sciences* 153, 358-369.

MALERBA, R. & NATTERO, J. 2012. Pollinator response to flower color polymorphism and floral display in a plant with a single-locus floral color polymorphism: consequences for plant reproduction. *Ecological Research* 27, 377–385.

MANDUJANO, M.C., MONTAÑA. C., MENDEZ. I. & GOLUBOV. J. 1998.The relative contributions of sexual reproduction and clonal propagation in *Opuntia rastrera* from two habitats in the Chihuahuan Desert. *Journal of Ecology*. 86, 911-921.

ROCCA. M & SAZIMA. M. 2013. Quantity versus quality: identifying the most effective pollinators of the hummingbird-pollinated *Vriesea rodigasiana* (Bromeliaceae).*Plant Syst Evol* 299, 97–105.

MARIN, J,. NEPI, M., GALETTO, L., GUIMARAES, E. & RODRIGUES, S. 2012. Functional aspects of floral nectar secretion of *Ananas ananassoides*, an ornithophilous bromeliad from the Brazilian savanna. *Annals of Botany* 109, 1243–1252.

MCCALL, A & IRWIN, R. 2006. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology Letters* 9, 1351–1365.

MELÉNDEZ-ACKERMAN. E., CAMPBELL, D. R & WASER, N. M. 1997. Hummingbird Behavior and Mechanisms of Selection on Flower Color in Ipomopsis. *Ecology* 78, 2532-2541.

MENDOZA, A & FRANCO, M. 1998. Sexual reproduction and clonal growth in *Reinhardtia gracilis* (Palmae), an understory tropical palm. *American Journal of Botany* 85, 521–527.

MORA, F., CHAPARRO, H.A., VARGAS, O. & BONILLA, M. A. 2007. Dinámica de la germinación, latencia de semillas y Reclutamiento de plántulas en *Puya cryptantha* y *P. Trianae*, dos rosetas gigantes de los páramos colombiano. *Ecotropicos* 20, 31-40.

MURCIA, C. 2002. Ecología de la Polinización. En: GUARIGUATA, M., Y G. KATTAN (comp). Ecología y Conservación de bosques neotropicales. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica. ISBN. 493 – 530p.

NAVARRO, L. 1999. Pollination ecology and effect of nectar removal in *Macleania bullata* (Ericaceae). Biotropica 31, 618-625.

_____ 2001. Reproductive biology and effect of nectar robbing on fruit production in *Macleania bullata*. *Plant Ecology* 152, 59-65.

NEWSTROM, L. E., FRANKIE, G. W. & BAKER, H. G.1994. Source A New Classification for Plant Phenology Based on Flowering Patterns in Lowland Tropical Rain Forest Trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*, 26,141-159.

OLLERTON, J., ALARCON, R., WASER, N., PRICE, M., WATTS, S., CRANMER, L., HINGSTON, A., PETER, C & ROTENBERRY, J. 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103, 1471–1480.

PEDRAZA-PEÑALOSA, P., BETANCUR, J. & FRANCO-ROSSELLI, P. 2005. Chisacá, un recorrido por los páramos andinos. Segunda edición. Instituto de ciencias naturales e Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia, 340 p.

PENET, L., COLLIN, C.L. & ASHMAN,T. L. 2009. Florivory increases selfing: an experimental study in the wild strawberry, *Fragaria virginiana*. *Plant Biology* 11:38–45.

PEREIRA, A.R., ANDRADE, A.C.S., PEREIRA, T.S., FORZZA, R.C. & RODRIGUES, A.S. 2010. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae).*Seed Sci. & Technol* 38, 79-87.

PRADA, A. 2006. Biología floral y polinización de *Plutarchia guascensis* (Cuatrec*)* A.C. Sm. (Ericaceae) en una zona de subpáramo en el Parque Municipal Ranchería. Paipa Boyacá Colombia. Trabajo de pregrado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Ciencias Biológicas. Tunja.

QUEVEDO, Y. 2006. Biología de la polinización de *Gaulteria rigida* Kunth (Ericaceae) en el Parque Natural Municipal Ranchería. Paipa Boyacá Colombia. Trabajo de pregrado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Ciencias Biológicas. Tunja.

RADUSKI, A. R., HANEY, E.B. & IGÍC. B. 2011. The expression of self -incompatibility in angiosperms is bimodal. *Evolution 66,*1275–1283.

RAMIREZ, N. 2002. Reproductive phenology, life-forms, and habitats of The Venezuelan Central Plain. *American Journal of Botany* 89, 836–842.

RAMIREZ, N. & TRAVESET, A. 2010. Predispersal seed-predation by insects in the Venezuelan Central Plain:Overall patterns and traits that influence its biology and taxonomic groups. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 12 193–209.

RESTREPO- CHICA, M. 2014. Mecanismos de la reproducción sexual relacionados con la coexistencia de *Puya nitida* y *Puya trianae* (Bromeliaceae: Pitcairnioidae) en el parque nacional natural Chingaza. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Facultad de ciencias. Programa de biología. Bogotá.

RODRÍGUEZ, N. A. 2012. Patrones de germinación de semillas de plantas de paramo en condiciones de laboratorio. Trabajo de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Facultad de ciencias, programa de Biología. Bogotá.

RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI. 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sex plan reprod*. 12, 241-244.

ROJAS, S. 2005. Ecología de la comunidad de pinchaflores (Aves: *Diglossa y Diglossopis*) en un bosque alto andino. Tesis de maestría en Biología, línea Ecología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.

SAKAI, S. 2001. Phenological diversity in tropical forests. *Popul Ecol* 43,77–86.

SALINAS, L., ARANA, C & SUNI, M. 2007. El néctar de especies de *Puya* como recurso para picaflores Altoandinos de Ancash, Perú. *Rev. peru. biol.* 14, 129- 134.

SCROK, G.J. & GALARDA, I. 2011. Reproductive biology and pollination of *Aechmea distichantha* Lem. (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica* 25, 571-576.

SMITH, L. B. & DOWNS, R. J. 1974. Flora Neotropica Monograph No. 14 (Pitcairnioideae) (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14,1-647.

STILES, G., AYALA, A. & GIRON, M. 1992. Polinización de las flores de *Brachyotum* (Melastomataceae) por dos especies de *Diglossa* (Emberizidae). *Caldasia* 17, 47-54.

STRAUSS, S.Y. 1997. Floral Characters Link Herbivores, Pollinators, and Plant Fitness. *Ecology* 78, 1640-1645.

TENORIO-GALINDO, G., RODRÍGUEZ-TREJO, D.A. & LÓPEZ-RÍOS, G. 2008. Efecto del tamaño y color de la semilla en la germinación de *Cecropia obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae) *Agrociencia* 42, 585-593.

TRAVERS, S. E., MENA-ALI. J & STEPHENSON, A. G. 2004. Plasticity in the self-incompatibility system of *Solanum carolinense. Plant Species Biology* 19, 127–135.

VADILLO, G., SUNI, M. & CANO, A. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Rev. peru. biol.* 11, 71- 78.

VALLEJO-MARIN, M., DORKEN, M. E. & BARRET, S.C.H. 2010. The Ecological and Evolutionary Consequences of Clonality for Plant Mating. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst* 41,193–213.

VARADARAJAN, G.S. 1990. Patterns of geographic distribution and their implications on the phylogeny of puya ( Bromeliaceae). J. Arnols. Arb. 71: 527-552.

VARGAS, O. & PEDRAZA, P. 2003.Capitulo 2. Localización y ambiente físico del parque nacional natural Chingaza. pp.25. En: El Parque Nacional Natural Chingaza. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Departamento de Biología. Bogotá. 226 p.

VASQUEZ, D & AIZEN, M. 2004. Asymmetric specialization: a pervasive feature of plant pollinator interactions. *Ecology*, 85,1251-1257.

VOGLER, D. W., DAS. C. & STEPHENSON, A. G. 1998. Phenotypic plasticity in the expression of self-incompatibility in Campanula rapunculoides. *Heredity* 81, 546–555.

WILLIAMS, G & ADAM, P. 2000. A review of rainforest pollination and plant-pollinator interactions with particular reference to Australian subtropical rainforests. *Australian Zoologist* 29, 177-212.

WILLIAMS, G. & J. MEAVE. 2002. Patrones fenológicos. En: Guariguata, M., y G. Kattan (comp). *Ecología y Conservación de bosques neotropicales*. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica. 407 – 431p.

WHITTON, J., SEARS, C.J., BAACK, E.J. & OTTOY, S.P. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 169,169–182.

YANWEN, Z. YONG, W & YOUHAO, G. 2007. Effects of nectar-robbing on plant reproduction and evolution. *Frontiers of Biology in China*. 2, 443–449.

ZHU. L & LOU. A. 2010.Mating system and pollination biology of a high-mountain perennial plant, Rhodiola dumulosa (Crassulaceae).*Journal of Plant Ecology* 3, 219–227.

# 11. Anexos

**Anexo A:** Medidas morfológicas de las estructuras florales en cada una de las fases fenológicas de Puya nítida. En rojo se encuentran las medidas que presentaron diferencias significativas (ANOVA P <0,05) entre las fases florales. La primera cifra indica el número promedio seguido de la desviación estándar y entre paréntesis el tamaño de la muestra.

| Medida | E0 | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | E7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L.flor | 36,13 ± 6,25 (8) | 42,71 ± 2,53 (10) | 52,2 ± 3,75 (8) | 57,5 ± 7,85 (7) | 63,6 ± 4,74 (5) | 67,45 ± 4,2 (17) | 65,76 ± 8,41 (5) | 62,01 ± 6,02 (7) |
| A. Corola | 8,625 ± 2,18 (8) | 7,08 ± 3,38 (10) | 8,25 ± 1,88 (8) | 10,9 ± 2,05 (7) | 13,9 ± 2,43 (5) | 16,1 ± 1,33 (17) | 13,26 ± 2,46 (5) | 8,42 ± 0,74 (7) |
| L.petalos | 25,68 ± 1,26 (8) | 33,27 ± 2,97 (10) | 41,425 ± 3,57 (8) | 46,1 ± 8,10 (7) | 54 ± 2,24 (5) | 53,8 ± 4,2 (17) | 61,3 ± 5,14 (5) | 53,34 ± 8,26 (7) |
| L.estambre | 20,32 ± 2,46 (8) | 26,75± 5,16 (10) | 32,95 ± 6,57 (8) | 41,7 ± 6,06 (7) | 43,88 ±8.27 (5) | 45,7 ± 6,13 (17) | 47,6± 2,46 (5) | 41,35 ± 7,39 (7) |
| L.antera | 15,31± 1,61 (8) | 16,91 ± 2,99 (10) | 16,01 ± 2,8 (8) | 17,2 ± 1,24 (7) | 13,3 ± 8.27 (5) | 9,47 ± 3,40 (17) | 7,42 ± 0,47 (5) | 10,11 ± 3,30 (7) |
| L.estilo | 12,32 ± 1,61 (8) | 20,83 ± 4,59 (10) | 29,06 ± 5,9 (8) | 30,6 ± 8,54 (7) | 37,22 ±6,25 (5) | 42,2 ± 3,48 (17) | 40,08 ± 3,18 (5) | 37,08 ± 5,27 (7) |
| Dista. Est- ant | 2,11 ± 1,75 (8) | 3,38 ± 2,44 (10) | 6,77 ± 2,92 (8) | 7,24 ± 3,83 (7) | 6 ± 4,18 (5) | 3,23 ± 3,38 (17) | 3,88 ± 5,66 (5) | 0,77 ± 2,04 (7) |
| L.ovario | 11,52 ± 1,78 (8) | 11,17 ± 1,11 (10) | 12,6 ± 1,31 (8) | 11,6 ± 0,51 (7) | 12,4±0,70 (5) | 12,1 ± 2,00 (17) | 12,2 ± 0,97 (5) | 13,35 ± 1,30 (7) |
| A.ovario | 5,63±1,17 (8) | 5,63 ± 1,17 (10) | 5,8 ± 0,44 (8) | 5,88 ± 0,40 (7) | 5,76 ±0,33 (5) | 6,09 ± 0,35 (17) | 5,92 ± 0,44 (5) | 5,75 ± 0,47 (7) |

## Anexo B: Paquetes usados en R

**Nortest:** Juergen Gross & bug fixes by Uwe Ligges. (2012). nortest: Tests for Normality. R package version 1.0-2. http://CRAN.R-project.org/package=nortest.

**Mvtnorm:** Alan Genz, Frank Bretz, Tetsuhisa Miwa, Xuefei Mi, Friedrich Leisch, Fabian Scheipl, Torsten Hothorn (2013). mvtnorm: Multivariate Normal and t Distributions. http://CRAN.R-project.org/package=mvtnorm.

**Class:** Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0

**VGAM:** Thomas W. Yee & C. J. Wild (1996). Vector Generalized Additive Models. Journal of Royal Statistical Society, Series B, 58(3), 481-493.

**Splines:** R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

**Stats4:** R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
URL http://www.R-project.org/.

**Lawstat:** Joseph L. Gastwirth; Yulia R. Gel <ygl@math.uwaterloo.ca>; W. L. Wallace Hui <wlwhui@uwaterloo.ca>; Vyacheslav Lyubchich <vlyubchich@uwaterloo.ca>; Weiwen Miao <miao@macalester.edu>; Kimihiro Noguchi <kinoguchi@ucdavis.edu> (2013). lawstat: An R package for biostatistics, public policy, and law. R package version 2.4. http://CRAN.R-project.org/package=lawstat.

**Car:** John Fox and Sanford Weisberg (2011). An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion.

**Multcomp:** Torsten Hothorn, Frank Bretz and Peter Westfall (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. Biometrical Journal 50(3), 346--363.

**Survival:** Therneau T (2013). A Package for Survival Analysis in S_. R package version 2.37-4, <URL: http://CRAN.R-project.org/package=survival>.

**E1071:** David Meyer, Evgenia Dimitriadou, Kurt Hornik, Andreas Weingessel and Friedrich Leisch (2012). e1071: Misc Functions of the Department of Statistics (e1071), TU Wien. R package version 1.6-1 http://CRAN.R-project.org/package=e1071

**Stats:** R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

**Ltm:** Dimitris Rizopoulos (2006). ltm: An R package for Latent Variable Modelling and Item Response Theory Analyses, Journal of Statistical Software, 17 (5), 1-25. URL http://www.jstatsoft.org/v17/i05