



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

**EFFECTOS INDIRECTOS DE LA HORMIGA CORTADORA DE
HOJAS *A. LOBICORNIS* SOBRE LA ADECUACIÓN DE PLANTAS
POLINIZADAS POR INSECTOS**



Trabajo de tesis para optar el título de Doctora en Biología

Anahí R. Fernandez

Director: Alejandro G. Farji-Brener

Co-directora: Mariana Tadey

2019

Resumen

Los disturbios a pequeña escala, al incrementar la disponibilidad de recursos, pueden afectar directamente la adecuación de las plantas aumentando la producción de flores y semillas, o indirectamente modificando la manera como las plantas se relacionan con sus mutualistas. Específicamente, los incrementos en los niveles de nutrientes del sustrato donde crecen pueden modificar los rasgos florales como el tamaño y la producción de las flores mejorando su atractivo para los polinizadores y, en consecuencia, mejorar la adecuación reproductiva de las plantas. Dado que la producción de semillas está frecuentemente limitada por la cantidad/calidad de polen que reciben las flores, poseer flores más atractivas aumentaría las probabilidades de polinización. Asimismo, los nutrientes edáficos también pueden afectar la adecuación masculina, ya que los granos de polen producidos por plantas sobre suelos fértiles tienen mejor desempeño en las flores femeninas y engendran mayor número de semillas. Por lo tanto, aquellos organismos capaces de alterar los niveles de nutrientes del suelo cumplen un papel fundamental sobre la adecuación de las plantas y en cómo éstas interactúan con sus polinizadores. Las hormigas cortadoras de hojas son uno de los organismos modificadores del suelo más importantes de América. Estas hormigas incrementan la fertilidad del suelo por la acumulación de materia orgánica en sus basureros, concentrando una mayor cantidad de nutrientes con respecto a los suelos adyacentes. Los basureros pueden beneficiar directamente la reproducción de las plantas que allí crecen aportando nutrientes para la formación de flores, frutos y semillas. Además, podrían favorecer el número de semillas engendradas mediante el aumento del vigor del polen. Por otra parte, también podrían incrementar la adecuación de la vegetación cercana de manera indirecta, si las plantas asignan ese aumento de nutrientes a mejorar el atractivo floral, favoreciendo la visita de los polinizadores y, en consecuencia, disminuyendo el grado de limitación polínica. El foco principal de esta tesis fue evaluar el efecto *indirecto* de los nutrientes aportados por los basureros sobre el atractivo floral y, en consecuencia, el éxito reproductivo de las plantas que crecen cercanas a ellos. Para evaluar esto usé dos aproximaciones, una experimental bajo condiciones controladas en el invernadero, utilizando como una especie herbácea exótica como planta modelo. Y, otra observacional midiendo a campo distintas características florales en especies nativas creciendo sobre basureros y sobre suelo desnudo. Para esto último, trabajé en la eco-región del Monte austral, un sitio árido con suelos pobres en materia orgánica, donde las colonias de hormigas cortadoras *Acromyrmex lobicornis* son abundantes y es frecuente encontrar arbustos nativos creciendo sobre sus basureros. Trabajé con cuatro especies de plantas polinizadas por insectos. En la aproximación experimental de invernadero, trabajé con *Eschscholzia californica*, una hierba anual, que permitía la manipulación de las flores para las correspondientes mediciones. Mientras que para las condiciones naturales utilicé como especies modelo a las más frecuentes del área, *Larrea divaricata*, *Monttea aphylla* y *Grindelia chiloensis*, tres arbustos nativos perenes. En el **capítulo 2**, estudié el sistema reproductivo, grado de dependencia de polinizadores y los niveles de limitación polínica de *L. divaricata* en el sitio de estudio, para entender mejor la importancia de los efectos del basurero sobre su adecuación. Además, comparé el vigor del polen producido por plantas creciendo sobre los basureros y sobre suelo desnudo control. En el **capítulo 3**, evalué el efecto de los basureros sobre los rasgos florales (forma, tamaño y producción de flores, entre otros) tanto bajo condiciones controladas de invernadero como bajo condiciones naturales a campo. También, en el campo evalué la tasa de visitas de los polinizadores y la

1 producción de semillas. Por último, en el **capítulo 4** realicé un análisis de vías en el que
2 evalué la importancia relativa de los efectos directos e indirectos de los nutrientes del
3 sustrato sobre la producción de semillas en dos de las especies estudiadas a campo. Los
4 resultados mostraron que *L. divaricata* depende de los polinizadores para mejorar la
5 producción de semillas, aunque no pude determinar correctamente el grado de limitación
6 polínica por dificultades técnicas. El vigor de polen estimado a partir de la germinación
7 estuvo apenas favorecido por los basureros, pero el número de semillas engendradas no se
8 vio afectada. Observé cambios en los rasgos florales asociados a los basureros bajo
9 condiciones de invernadero. Sin embargo, en observaciones a campo encontré que la
10 presencia de basureros no afectó los rasgos florales, ni la tasa de visita de polinizadores y
11 sólo afectó la producción de semillas por fruto en una de las especies estudiadas. Los
12 resultados del análisis de vías no revelan un efecto positivo directo ni indirecto de la
13 disponibilidad de nutrientes sobre la producción de semillas. Los resultados contrastantes
14 entre invernadero y campo pueden deberse tanto a diferencias en las condiciones
15 ambientales como a características propias de las especies. Por un lado, las escasas
16 precipitaciones que caracterizan el Monte austral podrían limitar la movilización de
17 nutrientes de los basureros, impidiendo que estén disponibles para la vegetación. Por otro
18 lado, en el caso que los nutrientes estén disponibles, el aumento de herbivoría en plantas
19 mejor nutridas podría contrarrestar los efectos beneficiosos sobre la polinización. Con
20 respecto a las características de las especies, *E. californica* es una hierba exótica anual, las
21 cuales suelen aprovechar mejor los recursos e invertir mayor parte de ellos en la
22 reproducción que especies arbustivas, perennes y nativas como lo son *L. divaricata*, *M.*
23 *aphylla* y *G. chiloensis*. Estas características podrían explicar los diferentes resultados
24 obtenidos en *E. californica* y el resto de las especies. En este trabajo se evaluó por primera
25 vez cómo los nutrientes del suelo pueden afectar la forma de las flores. Los resultados en
26 invernadero apoyan el uso potencial de los basureros como fertilizantes en cultivos
27 orgánicos, floricultura y prácticas de restauración vegetal bajo condiciones controladas.
28 Finalmente, este trabajo amplía el conocimiento del papel de las hormigas cortadoras de
29 hojas como ingenieros ecosistémicos en ambientes naturales, enfatiza la importancia de los
30 efectos indirectos de los organismos que modifican los niveles de nutrientes en el suelo
31 sobre las interacciones planta-insecto, y resalta la necesidad de complementar los estudios
32 de invernadero con trabajos a campo.

33
34
35
36
37

1 **Summary**

2 Small scale disturbances could affect plants fitness directly increasing flowers and
3 seed production and indirectly enhancing plant-mutualism interactions by increasing
4 resource availability. For instance, increased soil fertility could modify floral traits
5 expression (e.g., flower size and production) increasing pollinator' attraction and thus plant
6 fitness. Floral attraction may modify pollination services potentially increasing the pollen
7 quantity/quality that a flower receives; through increasing pollinator visitation frequency,
8 among others. Additionally, soil nutrients availability may also affect male fitness. Pollen
9 produced by plants growing on fertile soils has a better performance in female flowers and
10 engender greater seed number than pollen from plants growing on poor nutrients soils.
11 Thus, organisms that modify soil properties play a very important role on plant fitness and
12 in the way they interact with pollinators. Leaf cutting ants are one of the most important
13 soil modifiers known of America. These ants enhance soil fertility by accumulating organic
14 material on refuse dumps which have greater nutrients concentration than adjacent soils.
15 Refuse dumps directly benefit plant reproduction by providing the nutrients to produce
16 more flowers, fruits and seeds. Moreover, refuse dumps could also enhance seed number by
17 increasing pollen vigor. However, refuse dumps may also *indirectly* increase plant fitness,
18 through the allocation of nutrients for floral attractiveness, to enhance pollinators attraction.
19 The aim of this thesis was to evaluate the potential *indirect* effect of ant refuse dumps as
20 nutrient source on flower attractiveness and plant reproductive success. To test this idea, I
21 used two approaches, on experimental with controlled conditions at greenhouse, using an
22 exotic herb as model species and another approach, observational, measuring variables of
23 floral attraction and plant fitness under natural conditions. I worked in Patagonian Monte
24 Desert, which is characterized by poor soils but with abundant presence of the leaf cutting
25 ant *Acromyrmex lobicornis* colonies. In this area, is frequent to find native shrubs growing
26 on the refuse dumps of these ants. I selected three native plant species that are animal-
27 pollinated, *Larrea divaricata*, *Monttea aphylla* and *Grindelia chilensis* all abundant in the
28 study site. For the experimental approach, I used *Eschscholzia californica* an annual, exotic
29 forb, with fast growth rate and large flowers that enables the measuring of some flower
30 characteristics. In **chapter 2**, I evaluated the reproductive system, pollinators dependency
31 and pollen limitation levels of *L. divaricata* to better understand the importance of refuse
32 dump effects on *L. divaricata* fitness. Additionally, to test whether refuse dumps provide
33 nutrients for increasing male fitness I compared pollen vigor produced by plants growing
34 on refuse dumps and control bare soil. In **chapter 3**, I evaluated the effect of refuse dumps
35 on floral traits (size, shape, flower production, etc.) under controlled and field conditions.
36 Also, in the field I evaluated pollination rate and seed production. Finally, in **chapter 4**, I
37 evaluated the relative importance of direct and indirect effects of soil nutrients on seed
38 production in *L. divaricata* and *G. chilensis*. My results showed that *L. divaricata*
39 depended on pollinators to improve seed production despite I could not properly measure
40 pollen limitation due to technical difficulties. Refuse dumps did not affect pollen vigor,
41 estimated as germination and engendered seeds. Floral traits were affected by refuse dumps
42 only under greenhouse conditions. Under field conditions refuse dumps did not affect any
43 floral trait, pollination visits nor seed production on almost any species. Path analysis
44 results did not detect positive direct or indirect effects of soil nutrients availability on seed
45 production. These contradictory results between the experimental and the observational
46 approach may be due to different environmental conditions and differences among intrinsic
47 species characteristics. The typical low precipitation level in Monte Desert may limit

1 nutrient mobilization, making them unavailable for plants. Additionally, even when
2 nutrients were available, herbivory increments on more nutritious leaves could counteract
3 the positive effect of refuse dumps on pollination visitation rate. Finally, annual exotic
4 forbs, as *E. californica*, usually have better resource exploitation strategies and invest larger
5 quantity of them on reproduction than native perennial shrubs as *L. divaricata*, *M. aphylla*
6 and *G. chilensis*. This work evaluated for the first time the effects of soil nutrients on
7 flowers shape. In addition, greenhouse results support the potential use of refuse dumps as
8 organic fertilizer in crops, floriculture and in vegetal restoration. Finally, this work
9 contributes to the knowledge of leaf cutting ants as ecosystem engineers in natural
10 environments, highlight the importance of disturbance indirect effects on plant-insect
11 interaction, and emphasize the need of complementing greenhouse assays with field
12 observations.

13

14

15

1	Resumen	
2	Summary	
3	Índice	
4		
5	Capítulo 1: Introducción general	8
6	Introducción general.....	9
7	Sistema de estudio.....	15
8		
9	Capítulo 2: Efecto de los basureros de <i>A. lobicornis</i> sobre las funciones	
10	reproductivas femenina y masculina del arbusto nativo <i>L. divaricata</i>	19
11	Resumen.....	20
12	Introducción.....	21
13	Materiales y métodos	28
14	Resultados.....	33
15	Discusión.....	40
16	Apéndices.....	45
17		
18	Capítulo 3: Efectos indirectos de los basureros de <i>A. lobicornis</i> sobre la adecuación	
19	de plantas polinizadas por insectos: consecuencias sobre el atractivo floral.....	48
20	Resumen.....	49
21	Introducción.....	51
22	Materiales y métodos.....	54
23	Resultados.....	68
24	Discusión.....	79
25	Apéndices.....	87
26		
27	Capítulo 4: Efectos directos e indirectos del aumento de nutrientes edáficos	
28	generados por las hormigas cortadoras sobre la adecuación de plantas polinizadas por	
29	insectos.....	90
30	Resumen.....	91
31	Introducción.....	92

1	Materiales y métodos	94
2	Resultados.....	95
3	Discusión.....	98
4		
5	Agradecimientos.....	103
6	Bibliografía.....	105
7	Trabajo de respaldo	

CAPÍTULO 1

Introducción general



1 **Introducción general**

2

3 Los disturbios a pequeña y gran escala afectan la estructura de las comunidades
4 naturales y generan nuevas oportunidades para las especies que la componen. Al eliminar
5 biomasa y modificar la disponibilidad de recursos, los disturbios pueden favorecer o
6 desfavorecer la germinación, crecimiento y reproducción de ciertas especies de plantas
7 (Denslow 1980). Por ejemplo, después de un incendio la cobertura vegetal original se
8 reduce dejando sitios disponibles para el reclutamiento de nuevos individuos (Sousa 1984).
9 Los disturbios pueden ser causados por factores abióticos como el viento, tormentas o
10 fuego, o ser generados por organismos vivos (White 1979). Los ingenieros ecosistémicos
11 son aquellos organismos que generan cambios físicos en el ambiente y mediante su
12 actividad modifican directa o indirectamente la disponibilidad de recursos para el resto de
13 los organismos y muchas veces pueden ser generadores de disturbios (Jones *et al.* 1994;
14 Jones *et al.* 1997). Por ejemplo, los animales que construyen madrigueras o cuevas
15 subterráneas alteran las propiedades del suelo por la redistribución y acumulación de
16 materia orgánica (Reichman & Seabloom 2002; Miranda *et al.* 2018). Estos disturbios a
17 pequeña escala pueden afectar directamente a ciertos individuos, pero también la forma en
18 que los individuos se relacionan unos con otros (Yoshihara *et al.* 2010).

19 Los cambios generados por los ingenieros ecosistémicos pueden alterar la dinámica
20 de las interacciones inter-específicas, y la magnitud de su efecto depende de los recursos
21 limitantes de un ambiente determinado (Crain & Bertness 2006). Por ejemplo, los
22 montículos generados por las marmotas siberianas favorecen el establecimiento de especies
23 vegetales con flores en praderas típicamente dominadas por gramíneas, y este cambio en la
24 diversidad beneficia indirectamente la abundancia de polinizadores a través del incremento
25 de la disponibilidad de alimento. A la vez, el aumento de polinizadores beneficia a las
26 plantas sobre los montículos ya que son visitadas con mayor frecuencia que las plantas
27 alejadas (Yoshihara *et al.* 2010). Otro ejemplo de beneficios indirectos, es el incremento de
28 la abundancia de hongos endofíticos en ambientes desérticos asociados a las madrigueras
29 de los tuco-tucos, *Ctenomys* sp, que favorece el establecimiento de plantas micorrícicas
30 muy comunes en este tipo de ambiente (Miranda *et al.* 2018). En resumen, la adecuación de
31 la vegetación puede estar afectada directamente por cambios en la disponibilidad de

1 recursos generados por los disturbios a pequeña escala, pero también indirectamente a
2 través de cambios en las interacciones entre especies (Wootton 1994).

3 La reproducción sexual, de la gran mayoría de las plantas, requiere de un vector
4 externo para la movilización del polen, portador de las gametas masculinas, desde las
5 anteras al estigma, órgano femenino receptor. Esto puede ocurrir dentro de una misma flor,
6 individuo y/o entre individuos. Cuando ocurre lo último, es decir que el polen se transporta
7 de un individuo a otro, favorece el intercambio genético entre individuos (i.e.,
8 entrecruzamiento). Los vectores que transportan el polen pueden ser bióticos, es decir,
9 mediado por animales o abióticos, mediados por el viento o el agua. Dentro del primer
10 grupo, los representantes más importantes son los insectos, aves y mamíferos (i.e.,
11 murciélagos) (Kearns *et al.* 1998; Barrett 2010). La característica más distintiva de las
12 plantas que son polinizadas por animales es el desarrollo de estructuras florales cuya
13 morfología y función están asociadas a la atracción de sus polinizadores (Stanton *et al.*
14 1986; Rosas-Guerrero *et al.* 2010). Los rasgos de las flores como la forma, el tamaño o el
15 color funcionan como señales para los polinizadores que se acercan a ellas en búsqueda de
16 recompensas alimenticias que les proveen las plantas a cambio de su servicio de
17 polinización y por eso se dice que la relación es mutualista, porque ambas partes
18 interactuantes salen beneficiadas. Las recompensas más comunes ofrecidas por las plantas
19 son néctar, polen o aceites (Schiestl & Johnson 2013).

20 Los nutrientes disponibles en el ambiente pueden afectar la expresión de los rasgos
21 florales y alterar la manera en que las plantas se relacionan con sus polinizadores. En
22 particular, las plantas que crecen en sustratos con alta disponibilidad de nutrientes suelen
23 desarrollar rasgos florales más atractivos, ser más visitadas por polinizadores y en
24 consecuencia, producir mayor cantidad de semillas (Muñoz *et al.* 2005; Burkle & Irwin
25 2009). Sin embargo, una de las limitaciones más frecuentes en la reproducción vegetal es la
26 cantidad o calidad de polen que reciben las flores (i.e., limitación polínica), ya que cuando
27 el mismo no es suficiente disminuye la producción de semillas (Haig & Westoby 1988;
28 Knight *et al.* 2005). La limitación polínica puede ser causada por la baja disponibilidad de
29 polen en una población o por la baja actividad forrajera de los polinizadores, generando
30 bajo flujo polínico entre plantas (Olivieri *et al.* 1994; Thomson 2001). En este contexto,
31 aquellas plantas que posean flores más atractivas podrían aumentar las probabilidades de

1 ser visitadas y polinizadas (Haig & Westoby 1988). En resumen, una mayor disponibilidad
2 de nutrientes del suelo puede favorecer la producción de semillas *indirectamente* a través
3 del aumento del atractivo foral y de la disminución de limitación polínica.

4 Los nutrientes del suelo pueden también afectar la adecuación masculina, a través
5 del mejoramiento del desempeño del polen. Los granos de polen adquieren de la planta que
6 los produce, los recursos necesarios para madurar, crecer y germinar en el estilo de la flor
7 receptora. Estudios previos muestran que los granos de polen producidos en plantas
8 creciendo en suelos fértiles son más vigorosos y capaces de engendrar mayor número de
9 semillas que los producidos en suelos pobres (Lau & Stephenson 1994; Poulton *et al.*
10 2001). Por lo tanto, la fertilidad del suelo donde crece la planta productora puede mejorar el
11 desempeño de los granos de polen en los estigmas florales receptores y así aumentar el
12 número de semillas engendradas.

13 El efecto de la disponibilidad de nutrientes del suelo sobre el éxito reproductivo de
14 las plantas puede entonces dividirse en dos vías que convergen en el aumento de la
15 adecuación. Una vía *directa*, a través de la cual las plantas aprovechan los recursos
16 disponibles para formar más frutos y semillas. Y otra vía mediante la cual *indirectamente*
17 aumenta el número de semillas producidas o engendradas, a través del incremento del
18 atractivo floral y del vigor de los granos de polen (Fig. 1). Estas vías *directa* e *indirecta*, se
19 relacionan con los principales dos limitantes de la reproducción de las plantas que son la
20 limitación por recursos y, la limitación polínica (Haig & Westoby 1988; Campbell &
21 Halama 1993; Knight *et al.* 2005). Por lo tanto, la fertilidad del suelo es un factor muy
22 importante en la reproducción vegetal, ya que las plantas que poseen alta disponibilidad de
23 nutrientes pueden asignar parte de esos recursos a la formación de flores, frutos y semillas,
24 pero también a realzar el atractivo floral que influye directamente en la frecuencia de visita
25 de polinizadores y por ende, en la cantidad de polen recibido. En este sentido, los
26 organismos que alteran las propiedades físicas y químicas del suelo pueden generar nuevas
27 oportunidades para las plantas frente a la limitación por recursos y la limitación polínica.

28 Dentro de los organismos que modifican el suelo y aumentan la disponibilidad de
29 nutrientes edáficos, las hormigas cortadoras de hojas son consideradas como uno de las más
30 importantes en América (Farji-Brener & Werenkraut 2015). Estos insectos son reconocidos
31 como ingenieros ecosistémicos por el impacto que tienen sobre la vegetación a través de la

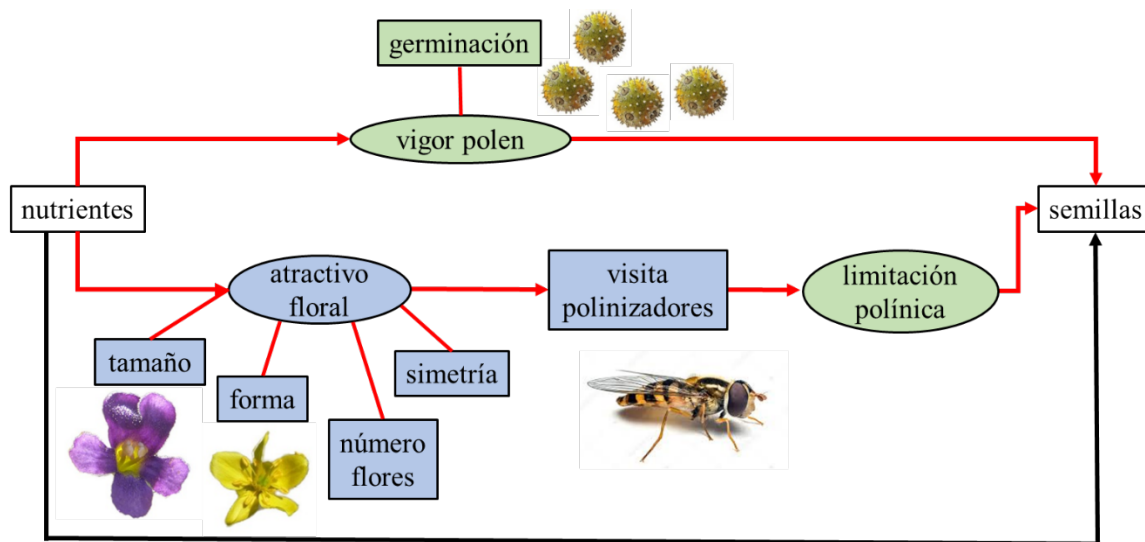
1 modificación del hábitat (Corrêa *et al.* 2010; Meyer *et al.* 2011). Las hormigas cortadoras
2 de hojas (de aquí en más, HCH) alteran las propiedades físicas y químicas del suelo,
3 principalmente por la remoción de grandes volúmenes de tierra durante la construcción de
4 sus nidos, la erosión del suelo por la formación de senderos de forrajeo y por la
5 acumulación de materia orgánica (Sousa-Souto *et al.* 2008). La característica más distintiva
6 de este grupo es que cosechan hojas que sirven de sustrato para el cultivo de un hongo que
7 crece en el interior de sus nidos, cuyas hifas son el principal alimento de las larvas.
8 Producto de la descomposición de las hojas, en el jardín de cultivo se generan grandes
9 cantidades de materia orgánica que las hormigas recolectan y depositan en “basureros”
10 junto con heces y cadáveres de hormigas. Dependiendo de la especie de HCH, los basureros
11 pueden estar ubicados en cámaras subterráneas, internas del nido o estar dispuestos
12 externamente sobre la superficie del suelo (Bot *et al.* 2001). Por su constitución tan
13 particular, mayoritariamente compuesto de material vegetal degradado, estos basureros son
14 muy similares a un compost, ya que generan un medio óptimo para la actividad de los
15 microorganismos descomponedores por su alto contenido de materia orgánica y capacidad
16 de retención de agua (Farji-Brener & Ghermandi 2004; Sousa-souto *et al.* 2011; Fernandez
17 *et al.* 2014). Estos basureros son considerados parches de fertilidad edáficos, dado que la
18 concentración de nutrientes en los mismos supera ampliamente a la de los suelos
19 adyacentes (Farji-Brener & Werenkraut 2015). Por ejemplo, los basureros de *Acromyrmex*
20 *lobicornis*, una especie de hormiga cortadora de ambientes templados, poseen una
21 concentración de nitrógeno, fósforo y carbono entre 6-10 veces mayor que el suelo desnudo
22 (Farji-Brener & Ghermandi 2008).

23 Existen evidencias de que las plantas pueden acceder a estos nutrientes y beneficiarse de
24 ellos. A través del uso de marcadores de isótopos estables, se pudo detectar que las plantas
25 pueden asimilar el nitrógeno acumulado en los basureros y aprovecharlo para producir
26 estructuras vegetativas y reproductivas (i.e., hojas, tallos e inflorescencias) (Lescano *et al.*
27 2012). Los basureros pueden mejorar la tasa de crecimiento, el establecimiento y la
28 reproducción de la vegetación que los circunda (Farji-Brener & Ghermandi 2004; Farji-
29 Brener & Tadey 2009). Los nidos de las hormigas cortadoras tienen un efecto positivo
30 directo sobre la reproducción de las plantas que crecen cercanos a ellos, a través del aporte
31 de nutrientes para la formación de flores, frutos y semillas. Por ejemplo, individuos de las

1 especies herbáceas *Carduus nutans* y *Onopordum acanthium* sobre los basureros de *A.*
2 *lobicornis* produjeron entre 2 y 3 veces más inflorescencias y más del doble de semillas que
3 plantas creciendo sobre suelo desnudo (Farji-Brener & Ghermandi 2008). Sin embargo, la
4 adecuación de las plantas cercanas a los basureros también podría estar beneficiada a través
5 de la vía indirecta que involucra la interacción de las plantas con sus polinizadores.

6 El papel directo de las hormigas cortadoras de hojas sobre la adecuación de las
7 plantas como agentes de fertilización del suelo ha sido muy estudiado (Farji-Brener &
8 Ghermandi 2008; Lescano *et al.* 2012). No obstante, en esta tesis propongo estudiar una vía
9 alternativa menos conocida por la cual los basureros de las hormigas cortadoras podrían
10 favorecer la adecuación de las plantas que crecen asociadas a ellos. Por un lado, el
11 enriquecimiento del suelo podría favorecer indirectamente la producción de semillas a
12 través del aumento del atractivo floral, favoreciendo la visita de los polinizadores y, en
13 consecuencia, disminuir el grado de limitación polínica. A través de esta vía, las hormigas
14 cortadoras de hojas tendrían un efecto indirecto sobre las especies vegetales, ya que
15 involucra la modificación de la interacción con una tercer especie o grupo de especies, que
16 en este caso serían los polinizadores (Wootton 1994). Por otro lado, podría favorecer el
17 número de semillas engendradas por las gametas masculinas, aumentando el vigor del
18 polen y favoreciendo su desempeño en las flores femeninas (Fig. 1). Para poner a prueba
19 estas hipótesis realicé dos aproximaciones una experimental en el invernadero, con una
20 especie modelo que me permitió la manipulación de las flores y otra aproximación
21 observacional midiendo rasgos florales a campo, en especies nativas comparando
22 individuos creciendo naturalmente sobre basurero e individuos creciendo en suelo desnudo.
23 En la parte de campo, trabajé en la eco-región del Monte austral donde las colonias de
24 hormigas cortadoras *Acromyrmex lobicornis* son bastante abundantes (~100 nidos/ha) y es
25 frecuente encontrar arbustos nativos creciendo sobre sus basureros (Farji-Brener & Tadey
26 2016) (Fig. 2a).

27



1

2

3 **Figura 1:** Diagrama conceptual de las posibles vías a través de las cuales la calidad del suelo

4 (nutrientes) afecta el éxito reproductivo de las plantas, medido como el número de semillas

5 producidas o engendradas. Las flechas rojas representan las vías evaluadas en esta tesis, los

6 rectángulos las variables medidas y los óvalos las estimadas. Las variables pintadas en verde serán

7 tratadas en el **capítulo 2** y las violetas en el **capítulo 3**.

8

9 Para estudiar el efecto de los basureros de *A. lobicornis* sobre el grado de limitación

10 polínica y vigor del polen elegí una especie de planta nativa arbustiva muy abundante en el

11 Monte, *Larrea divaricata*. Este tema lo abordé en el **capítulo 2** de esta tesis. *Larrea*

12 *divaricata*, es una especie polinizada por un amplio rango de grupos de insectos, desde

13 abejas solitarias hasta lepidópteros (Tadey *et al.* 2009). El sistema reproductivo de *L.*

14 *divaricata* se presume auto-compatible (Rossi *et al.* 1999), sin embargo, no ha sido

15 estudiado en detalle por lo que en esta sección evalué también su sistema reproductivo y el

16 grado de dependencia de polinizadores de esta especie. Elegí esta especie para evaluar estos

17 objetivos, justamente porque el grado de dependencia de polinizadores nunca había sido

18 evaluada en este sitio. A diferencia de *Monttea aphylla* y *Grindelia chiloensis*, que ya se

19 conoce que en el sitio son auto-incompatibles (Tadey *et al.* 2009; Tadey 2011), por lo que

20 dependen completamente de polinizadores para la fecundación. Realicé un trabajo de

21 campo en el cual apliqué cinco tratamientos de polinización controlada en arbustos

22 creciendo sobre y fuera los basureros. Para cada tratamiento evalué la producción de

23 semillas y el número de granos de polen depositados y germinados en las flores tratadas.

1 El efecto de los basureros sobre los rasgos florales y la respuesta de los
2 polinizadores hacia ellos es el tema desarrollado en el **capítulo 3**. Este objetivo lo abordé
3 de manera experimental en el invernadero con una especie modelo (*Eschscholzia*
4 *californica*) bajo condiciones controladas. El experimento en invernadero consistió en
5 cultivar plantas de *Eschscholzia californica*, una hierba anual, aplicando dos tipos de
6 sustratos, suelo y basurero de hormigas. Durante la temporada de floración medí
7 características de sus flores (i.e., forma, tamaño, cantidad) y de su floración (i.e.,
8 fenología). Por otro lado, estudié a campo especies nativas del Monte, midiendo sus
9 características florales en plantas creciendo sobre y lejos de los basureros de *A. lobicornis*.
10 En el campo, medí los mismos rasgos florales (i.e., tamaño, forma, cantidad, fenología
11 floral), la tasa de visita de polinizadores y la producción de semillas de tres especies de
12 arbustos nativos (*Larrea divaricata*, *Monttea aphylla* y *Grindelia chiloensis*), creciendo
13 sobre y fuera de los basureros. Por último, en el **capítulo 4** presento un análisis de vías en
14 el que evalué simultáneamente, los efectos directos e indirectos de los basureros sobre la
15 adecuación de las plantas polinizadas por animales.

16

17 **Sistema de estudio**

18

19 *Sitio de estudio*

20 El trabajo de campo lo realicé en el norte de la eco-región del Monte austral,
21 específicamente en la provincia de Neuquén entre las localidades de Arroyito (39° 5' S, 68°
22 35' O) y Villa El Chocón (39° 17' S, 68° 55' O). Esta región posee clima templado-árido y
23 escasas precipitaciones, la temperatura media anual varía entre 10-14°C (Burkart *et al.*
24 1999) y las precipitaciones entre 150- 250 mm (Tadey 2006; Roig *et al.* 2009). La
25 vegetación es escasa y predominan *Larrea spp.*, *Monttea aphylla*, *Bougainvillea spinosa*,
26 *Cassia aphylla*, *Cercidium praecox*, *Chuquiraga erinacea* y *Prosopis alpataco* (Cabrera
27 1976). Los suelos son principalmente aridisoles, salinos y pedregosos (Burkart *et al.* 1999).
28 Típicamente, en las regiones áridas los suelos poseen bajo ingreso de materia orgánica y
29 baja fertilidad (Dregne 1977) además, la distribución de los nutrientes es heterogénea y está
30 asociada a los parches de vegetación (Aguiar & Sala, 1999).

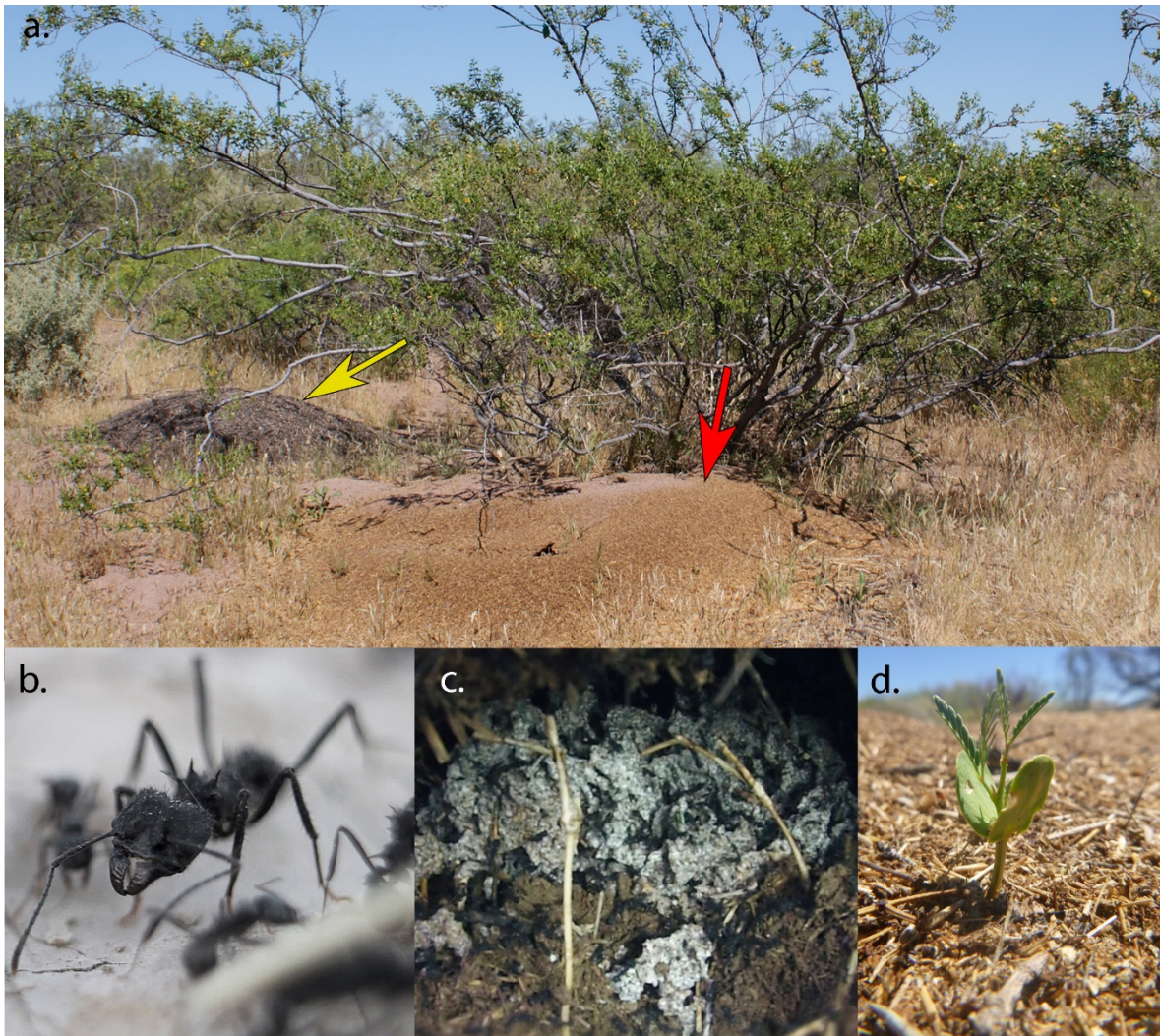
31

1 *Especie de hormiga cortadora*

2 *Acromyrmex lobicornis* es la única especie de hormiga cortadora en la Patagonia
3 (Farji-brener & Ruggiero, 1994), y es abundante en áreas disturbadas como los costados de
4 ruta o campos ganaderos (Farji-Brener, 2000; Tadey & Farji-Brener, 2007). Como el resto
5 de las HCH, cosechan material vegetal para cultivar un hongo simbiote, principal alimento
6 de las larvas. Sus nidos pueden tener hasta 1 m de profundidad y sobre la superficie del
7 suelo las hormigas construyen un domo que alcanza hasta 1 m de ancho y alto. Dentro del
8 domo cultivan el hongo y la deposición de los desechos orgánicos que este origina se
9 realiza en montículos externos sobre la superficie del suelo, quedando accesibles para la
10 vegetación cercana (Fig. 2) (Farji-brener & Ghermandi 2000). Estos basureros tienen
11 mayor capacidad de retención de agua (Farji-Brener & Ghermandi 2004) y mayor
12 concentración de N, P y C que el suelo adyacente (Farji-Brener & Tadey 2009).

13

14



1

2 **Figura 2:** Colonia de la hormiga cortadora *Acromyrmex lobicornis*, en la eco-región del Monte
3 austral, a) nido o domo (flecha amarilla) y basurero externo (flecha roja) en la base de un arbusto de
4 *Larrea divaricata*, b) hormiga obrera, c) jardín de cultivo en el interior del nido y d) plántula de
5 *Prosopis alpataco* creciendo sobre el basurero.

6

7 *Especies de plantas*

8 Las especies vegetales (*L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chilensis*) con las cuales
9 realicé el trabajo de campo crecen naturalmente sobre los basureros en el sitio de estudio.
10 La elección de estas especies se debió a que fueron las que con mayor frecuencia encontré
11 creciendo sobre basureros, requisito indispensable para realizar las comparaciones
12 correspondientes. Por otra parte, la especie modelo seleccionada para realizar el
13 experimento en el invernadero (*E. californica*) la elegí porque es una hierba que crece fácil

1 y rápidamente en condiciones de invernadero, y posee flores grandes que permiten su
2 manipulación. Si bien es una especie exótica, está bien adaptada a las condiciones de aridez
3 de la estepa, creciendo perfectamente en los suelos pobres y disturbados como los costados
4 de caminos, donde comúnmente se encuentran también los nidos de *A. lobicornis* en esta
5 región Patagónica. Además, es frecuente encontrar esta hierba creciendo en los basureros
6 de las hormigas. En la sección de “Materiales y métodos” de los **capítulos 2 y 3** se
7 encuentra una descripción más detallada de cada una de las especies vegetales empleadas.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

CAPÍTULO 2

Efecto de los basureros de *A. lobicornis* sobre las funciones reproductivas femenina y masculina del arbusto nativo *L. divaricata*.



1 **Resumen**

2

3 Los basureros generados por las hormigas cortadoras podrían beneficiar directa e
4 indirectamente la reproducción de las plantas que crecen asociadas a ellos. Los nutrientes
5 presentes en los basureros podrían incrementar la adecuación femenina y masculina,
6 disminuyendo la limitación polínica indirectamente a través del incremento del atractivo
7 floral e incrementando el vigor del polen. El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto
8 de los basureros de la hormiga cortadora *A. lobicornis* sobre la limitación polínica y la
9 germinación de polen en plantas de *L. divaricata*, un arbusto nativo del Monte austral
10 polinizado por insectos. Además, evalué el sistema reproductivo de esta especie y su grado
11 de dependencia de polinizadores. En el campo, marqué plantas creciendo sobre dos
12 sustratos, basureros y sobre suelo desnudo (control). En cada individuo marcado apliqué
13 cinco tratamientos de polinización manual, con polen producido por el propio individuo y
14 por otros individuos creciendo sobre y lejos de los basureros. Luego colecté los estilos de
15 las flores tratadas y conté el número de granos de polen depositados y los tubos polínicos
16 desarrollados. Durante la producción de frutos estimé la producción de semillas por fruto en
17 los cinco tratamientos de polinización. Encontré que, en coincidencia con trabajos previos,
18 esta especie es parcialmente auto-compatible y posee auto-polinización autónoma, aunque
19 la polinización cruzada mejora significativamente la producción de semillas. Por otro lado,
20 el porcentaje de germinación del polen producido por plantas sobre basureros fue
21 levemente mayor que el de polen producido por plantas sobre suelo desnudo, pero el
22 número de semillas engendradas fue similar. En general, la producción de semillas fue
23 bastante baja para plantas creciendo sobre ambos sustratos y la limitación polínica no puede
24 descartarse como factor limitante de la reproducción. Contrariamente a lo esperado, las
25 plantas asociadas a los basureros no mostraron ventaja reproductiva con respecto a las
26 plantas sobre suelo control. Estos resultados aportan nueva información sobre la
27 reproducción de *L. divaricata*, y sugieren que las plantas que crecen sobre los basureros de
28 las hormigas no incrementan su adecuación femenina y la masculina apenas se ve
29 favorecida, ilustrando cómo el aprovechamiento de micro-parches ricos en nutrientes puede
30 estar limitado por otras condiciones, como por ejemplo la aridez.

1 **Introducción**

2

3 El éxito reproductivo de la mayoría de las angiospermas depende en gran parte de la
4 cantidad y calidad de polen que reciben sus flores (Knight *et al.* 2005; Aizen & Harder
5 2007). Es frecuente que al menos en un momento de sus vidas, las plantas se encuentren
6 limitadas por la disponibilidad de polen en el ambiente (Bierzychudek 1981; Haig &
7 Westoby 1988). El grado de limitación polínica de una especie es variable a lo largo de las
8 estaciones, entre poblaciones e incluso entre individuos de una misma población (Burd
9 1994; Knight *et al.* 2005). La limitación polínica puede deberse a causas intrínsecas de la
10 población, como la baja disponibilidad de polen co-específico causada por la baja densidad
11 de individuos reproductivamente activos o a la floración asincrónica entre ellos, que afectan
12 tanto la cantidad del polen como su calidad disminuyendo la disponibilidad de polen
13 exogámico (producido por otro individuo) (Olivieri *et al.* 1994; Aizen & Harder 2007). Así
14 también, puede deberse a causas extrínsecas como la baja abundancia o actividad de los
15 polinizadores efectivos o al patrón de comportamiento forrajero de los mismos (Thomson
16 2001; Aizen & Harder 2007). Las plantas pueden aumentar las probabilidades de ser
17 polinizadas a través de ciertos cambios en los rasgos de sus flores o de la floración (Haig &
18 Westoby 1988). Por ejemplo, a través del aumento de la longevidad de las flores (Fabbro &
19 Körner 2004) o extendiendo la producción secuencial de las mismas (Ashman *et al.* 2004).
20 Otra de las estrategias es la modificación de los rasgos florales (Knight *et al.* 2005, Schiestl
21 & Johnson 2013). Se observó, en una población de *Crocus vernus* en una región montañosa
22 de Europa, que los individuos con pétalos más grandes y estigmas de color más vistoso
23 sufren menos limitación polínica que el resto de la población, posiblemente debido a que
24 sus flores son más llamativas para los polinizadores y reciben más visitas (Totland *et al.*
25 1998). Sin embargo, dado que la producción de flores tiene un costo para las plantas
26 (McLaughlin *et al.* 2000), muchas de las modificaciones en la fenología o fenotipo floral,
27 como un aumento del tamaño de la flor, pueden implicar una mayor inversión de recursos,
28 que deben ser asequibles por las plantas.

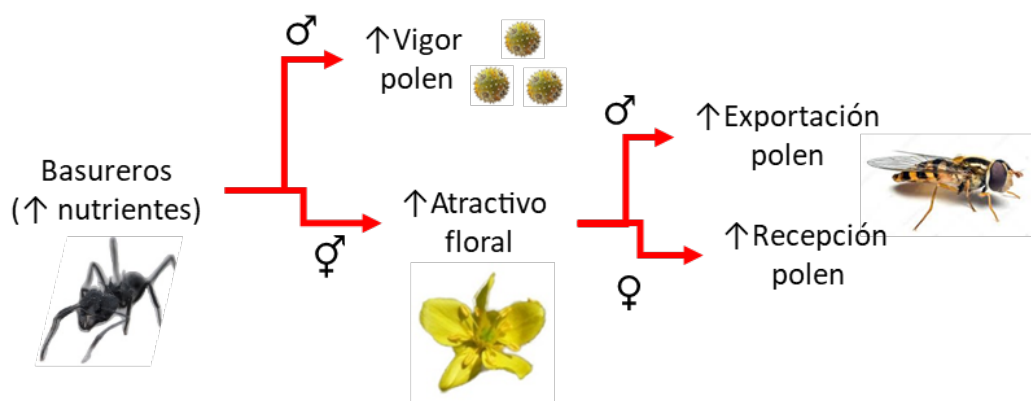
29 Dado que generalmente las plantas crecen limitadas por la disponibilidad de nutrientes
30 edáficos, la abundancia de los mismos podría incrementar su adecuación por dos vías. Por

1 un lado, estos recursos pueden derivarse directamente a un aumento del número de
2 estructuras reproductivas como gametas, flores y frutos. Pero también pueden derivarse a
3 producir flores más atractivas, como por ejemplo de mayor tamaño o de colores más
4 vistosos, que serán más visitadas por polinizadores y recibirán mayor cantidad de granos de
5 polen, aumentando las probabilidades de fecundación y reduciendo así la limitación
6 polínica (Haig & Westoby 1988). Plantas que crecen sobre suelos fértiles generalmente
7 poseen flores más atractivas, reciben mayor número de visitas y producen mayor cantidad
8 de semillas que plantas sobre suelos pobres (Campbell & Halama 1993; Cardoza *et al.*
9 2012). Mientras, muchos trabajos han estudiado el efecto directo del incremento de
10 recursos sobre la producción de flores y frutos, pocos han determinado si el aumento de la
11 adecuación de las plantas en suelos más ricos también se debe a modificaciones de los
12 rasgos florales que incrementen la tasa de visita de los polinizadores y, en consecuencia,
13 reduzcan la limitación polínica.

14 Existen estrategias evolutivas para afrontar la limitación polínica muy frecuentes en las
15 plantas como el desarrollo de la auto-compatibilidad que, si bien posee efectos negativos
16 respecto a la variabilidad genética, ya que aumenta la depresión por endogamia, tiene la
17 ventaja de asegurar la reproducción en ambientes limitados polínicamente (Barrett 2010).
18 Las especies auto-compatibles funcionan como su propia fuente de polen y, en general,
19 sufren menor grado de limitación polínica que las especies auto-incompatibles (Larson &
20 Barrett 2000). La autogamia es la polinización de una flor con su propio polen y la
21 geitonogamia con polen proveniente de otras flores del mismo individuo (Valla 1979).
22 Genéticamente estos procesos son similares, pero ecológicamente la autogamia tiene
23 ventajas ya que muchas veces no requiere de un vector externo para la transferencia del
24 polen desde las anteras al estigma (i.e., autogamia autónoma) (Barrett & Harder 1996;
25 Lloyd & Schoen 1992). Las especies auto-compatibles con polinización autónoma
26 resuelven dos de las principales causas de la limitación polínica; la baja actividad de
27 polinizadores y la baja disponibilidad de polen (Larson & Barrett 2000). No obstante, aún
28 en estos casos, la polinización cruzada (i.e., alogamia) suele ser preferible porque favorece
29 el entrecruzamiento genético (Aizen & Harder 2007). Por lo tanto, aun cuando se trata de
30 especies auto-compatibles es importante conocer el sistema reproductivo de la misma en
31 detalle, ya que aporta información sobre el grado de dependencia de los polinizadores,

1 sobre los niveles de limitación polínica del sitio y del grado de entrecruzamiento de la
 2 población.

3 Los sustratos ricos en nutrientes, además de favorecer indirectamente la función
 4 reproductiva femenina (i.e., producción de semillas) disminuyendo el grado de limitación
 5 polínica a través de la magnificación del atractivo floral, también pueden beneficiar la
 6 adecuación masculina por dos vías diferentes. Por un lado, el aumento del atractivo floral
 7 en flores hermafroditas beneficiaría tanto la tasa de recepción de polen como la exportación
 8 del mismo (Harder & Barrett 1996). Por otro lado, la fertilidad del suelo puede afectar
 9 directamente la producción de granos de polen, la adecuación de los mismos y su capacidad
 10 para competir con otros cuando son depositados en los estigmas florales (Young & Stanton
 11 1990) (Fig. 1).



12

13 **Figura 1:** Diagrama conceptual de pasos de las posibles vías a través de las cuales los basureros,
 14 por el aporte de nutrientes, afectan la adecuación reproductiva femenina y la masculina de plantas
 15 que crecen cercanos a ellos.

16

17 El éxito reproductivo masculino de una planta está determinado en gran parte por las
 18 condiciones bajo las cuales se encuentra durante la producción de polen. Los factores como
 19 el estrés térmico, la disponibilidad de recursos, entre otros, afectan la cantidad y calidad de
 20 granos producidos por antera y el desempeño de los mismos en los órganos femeninos
 21 (Mutikainen & Delph 1996; Stephenson *et al.* 2003). Por ejemplo, plantas de *Alstroemeria*
 22 *aurea* produjeron menor cantidad de granos de polen, con menor tasa de crecimiento de
 23 tubos polínicos y engendraron menor número de semillas, cuando las plantas fueron

1 sometidas a tratamientos de defoliación (Aizen & Raffaele 1998). Por otra parte, la
2 disponibilidad de nutrientes es un factor muy importante para la reproducción masculina,
3 ya que los granos de polen obtienen los recursos para madurar, germinar y crecer a partir
4 del tejido nutricional de las anteras (Lau & Stephenson 1994; Poulton *et al.* 2001). En
5 experimentos de polinización manual con mezcla de polen producidos por plantas
6 creciendo en suelos con alta y baja disponibilidad de nutrientes, los granos provenientes de
7 los suelos más fértiles engendraron más semillas, posiblemente debido a que los tubos
8 polínicos crecieron más velozmente y alcanzaron primero el ovario (Young & Stanton
9 1990). La distribución heterogénea de los nutrientes en los ambientes naturales, podría
10 conferirles gran ventaja competitiva a las plantas asociadas a los parches más fértiles,
11 respecto al número de descendencia producida.

12 Los suelos de la eco-región del Monte austral, en general, poseen baja disponibilidad de
13 materia orgánica, la cual está distribuida heterogéneamente (Aguiar & Sala 1999). Las
14 hormigas cortadoras de hojas *A. lobicornis*, generan parte de esa heterogeneidad a través de
15 la formación de parches ricos en nutrientes (basureros), que están disponibles para la
16 vegetación que los circunda. La concentración de algunos nutrientes en los basureros de *A.*
17 *lobicornis*, supera ampliamente a la del suelo desnudo. Por ejemplo, en el sitio de estudio
18 las concentraciones reportadas para C, N, P, Mg y K fueron 17, 15, 28, 5 y 8 veces mayores
19 en basureros (Tadey & Farji-Brener, 2016), estos resultados son apoyados por los medidos
20 en esta tesis, los cuales son mostrados en el **Capítulo 3**. Por otra parte, *Larrea divaricata* es
21 un arbusto bastante frecuente en esta región y muchas veces se lo encuentra creciendo
22 cercano o sobre a los basureros de *A. lobicornis* (observación personal, Fig. 2a).
23 Previamente se la determinó como una especie parcialmente auto-compatible (Simpson
24 1977; Rossi *et al.* 1999), aunque su sistema reproductivo no ha sido evaluado en
25 profundidad ya que nunca se compararon todas las formas de reproducción
26 simultáneamente (i.e., autogámica, geitonogámica y alógámica). Esta especie es polinizada
27 por insectos (Tadey, Tadey, & Tadey 2009) y su grado de limitación polínica nunca ha sido
28 determinado en el sitio de estudio. El sistema conformado por *L. divaricata* y las colonias
29 de *A. lobicornis* en el Monte austral es ideal para evaluar los efectos de la heterogeneidad
30 del paisaje y del sustrato generada por los parches ricos en nutrientes, producidos por los

1 nidos, sobre el éxito reproductivo de plantas polinizadas por animales, en una región
2 caracterizada por tener suelos con baja disponibilidad de nutrientes.

3 El **objetivo general** de este capítulo fue comparar el efecto de los basureros de *A.*
4 *lobicornis*, como fuente de nutrientes, sobre el éxito reproductivo de *L. divaricata*, tanto
5 sobre su función femenina (i.e., producción de semillas) como la masculina (i.e.,
6 adecuación del polen) con respecto al suelo desnudo. Además, aportar información sobre su
7 sistema reproductivo. Para ello realicé ensayos de polinización manual a campo; la
8 polinización la realicé con polen propio de la planta focal y extraño, proveniente de plantas
9 creciendo sobre basureros y lejos de ellos. Observé la germinación de granos de polen y
10 estimé la producción de semillas en plantas de *L. divaricata* creciendo sobre y fuera los
11 basureros, durante tres temporadas de floración.

12 Los **objetivos específicos** fueron: I) estimar y comparar los niveles de polinización para
13 determinar si *L. divaricata* está limitada polínicamente y si el nivel de limitación polínica
14 difiere entre plantas creciendo sobre basureros y suelo desnudo; II) determinar el grado de
15 auto-compatibilidad y de dependencia de polinizadores de *L. divaricata* en la región y III)
16 evaluar y comparar la germinación de granos de polen proveniente de individuos creciendo
17 sobre basurero y suelo desnudo (Tab. 1). Respecto a estos tres objetivos, planteé las
18 siguientes hipótesis: I) las plantas de *L. divaricata* están limitadas polínicamente, aunque
19 los individuos creciendo sobre los basureros sufren menor grado de limitación polínica que
20 las plantas sobre suelo desnudo, ya que poseen mayor disponibilidad de nutrientes que
21 pueden destinar a realzar los rasgos florales incrementando la atracción de sus
22 polinizadores. Si hay limitación polínica espero que la producción de semillas de las flores
23 polinizadas naturalmente (abierto) y el número de granos de polen depositados en los
24 estigmas florales, sea menor que en flores polinizadas manualmente con polen en exceso
25 (cruzada). Además, si los basureros de las hormigas reducen la limitación polínica, espero
26 que esta diferencia sea menor en plantas creciendo sobre los basureros que en suelo
27 desnudo (Tab. 1). Los cambios en los rasgos florales de *L. divaricata* asociados los
28 basureros de *A. lobicornis*, serán estudiados en el capítulo 3 de esta tesis.

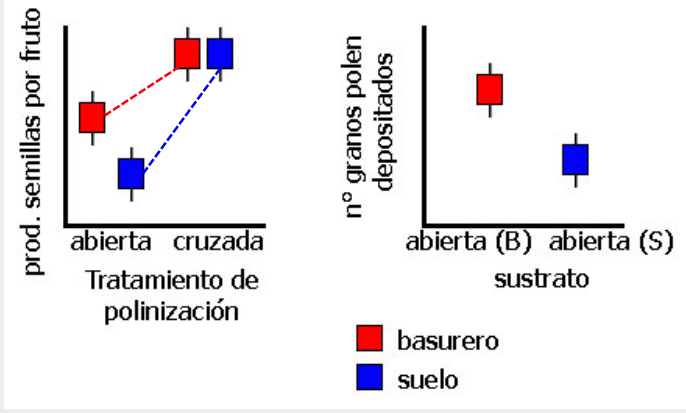
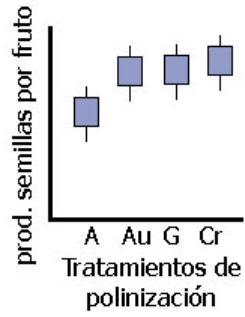
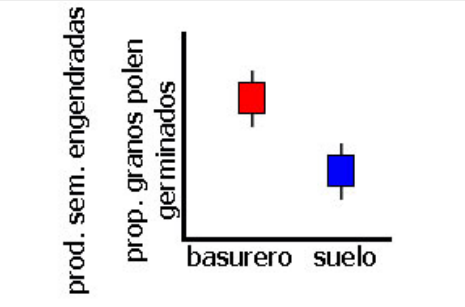
29 II) El éxito reproductivo (i.e., producción de semillas) y el grado de dependencia de
30 polinizadores de *L. divaricata* depende del grado de auto-compatibilidad, de la capacidad

1 de polinización autónoma (i.e., sin intervención de vectores externos) y del origen del polen
2 depositado en los estigmas (i.e., propio vs. extraño). Por lo tanto, si *L. divaricata* es una
3 especie auto-compatible con polinización autónoma (i.e., autógama autónoma), espero que
4 las flores aisladas de los polinizadores y sin polinización manual, posean similar número de
5 granos de polen depositados y germinados en sus estigmas y que produzcan similar número
6 de semillas que flores polinizadas con polen extraño. Por otro lado, si esta especie es auto-
7 compatible pero sin auto-polinización (i.e., geitonogama), espero que las flores polinizadas
8 manualmente con polen producido por otras flores del mismo individuo, produzcan similar
9 número de semillas que flores polinizadas con polen extraño. Por último, si *L. divaricata* es
10 una especie auto-incompatible y que por defecto depende de un agente polinizador, espero
11 que el número de semillas producidas por flores sometidas a polinización cruzada sea
12 mayor al de polinizadas con polen propio. (Tab. 1).

13 III) Los nutrientes aportados por el basurero aumentarán la adecuación masculina de *L.*
14 *divaricata*, ya que los granos de polen tendrán mayor disponibilidad de recursos para su
15 maduración, germinación y crecimiento a lo largo del estilo. Espero que los granos de polen
16 producidos por plantas creciendo sobre basureros germinen en mayor proporción (i.e.
17 mayor número de tubos polínicos en el estilo), que el polen producido por plantas sobre
18 suelo desnudo y que engendren mayor número de semillas.

19

20

HIPÓTESIS	PREDICCIONES
<p>I) Plantas sobre basureros (B) tienen menor grado de limitación polínica que plantas sobre suelo desnudo (S) porque invierten más nutrientes en el atractivo floral.</p>	
<p>II) Si <i>L. divaricata</i> es una especie auto-compatible con auto-polinización autónoma, su éxito reproductivo no depende del origen del polen recibido ni de la intervención de un agente polinizador.</p>	
<p>III) Las plantas sobre basureros (B) producen polen más vigoroso que plantas sobre suelo desnudo (S) porque poseen mayor disponibilidad de nutrientes.</p>	

1
2
3
4
5

Tabla 1: Resumen de hipótesis y predicciones.

1 **Materiales y métodos**

2 *Especie de estudio*

3 *Larrea divaricata* Cav (fam. Zygophyllaceae) es un arbusto con hojas perennes cuya
4 distribución abarca regiones áridas y semiáridas desde al sur al norte de América (Hunziker
5 1975; Correa 1988; Lia *et al.* 2001). Tiene flores solitarias, hermafroditas de color amarillo.
6 Éstas son protóginas, la receptividad del estigma inicia antes de la antesis y muchas veces
7 el estilo receptivo puede asomar por el ápice del botón floral. Poseen dos ciclos de cinco
8 estambres cada uno, el externo es el primero en abrir y el interno abre poco antes de la
9 senescencia floral (Rossi *et al.* 1999; Gandullo *et al.* 2004). Cuando esto ocurre las anteras
10 se encuentran posicionadas próximas al estigma aún receptivo, momento en el cual podría
11 ocurrir la auto-polinización (Rossi *et al.* 1999). El ovario está dividido en cinco lóculos con
12 siete a nueve óvulos cada uno, de los cuales sólo uno formará semillas (Marco *et al.* 2000).
13 El fruto es un esquizocarpo que se divide en cinco mericarpos uniseminados, por lo tanto,
14 cada fruto posee como máximo cinco semillas (Correa 1988; Rossi *et al.* 1999; Marco *et al.*
15 2000). Es polinizada por insectos y en el área de estudio principalmente por abejas
16 solitarias, y en menor grado por moscas y mariposas. En el sitio de estudio, la floración
17 puede darse entre mediados de octubre y mediados de diciembre y el pico de fructificación
18 suele darse entre enero y febrero, aunque es muy variable entre años (Fig. 2) (Tadey *et al.*
19 2009).

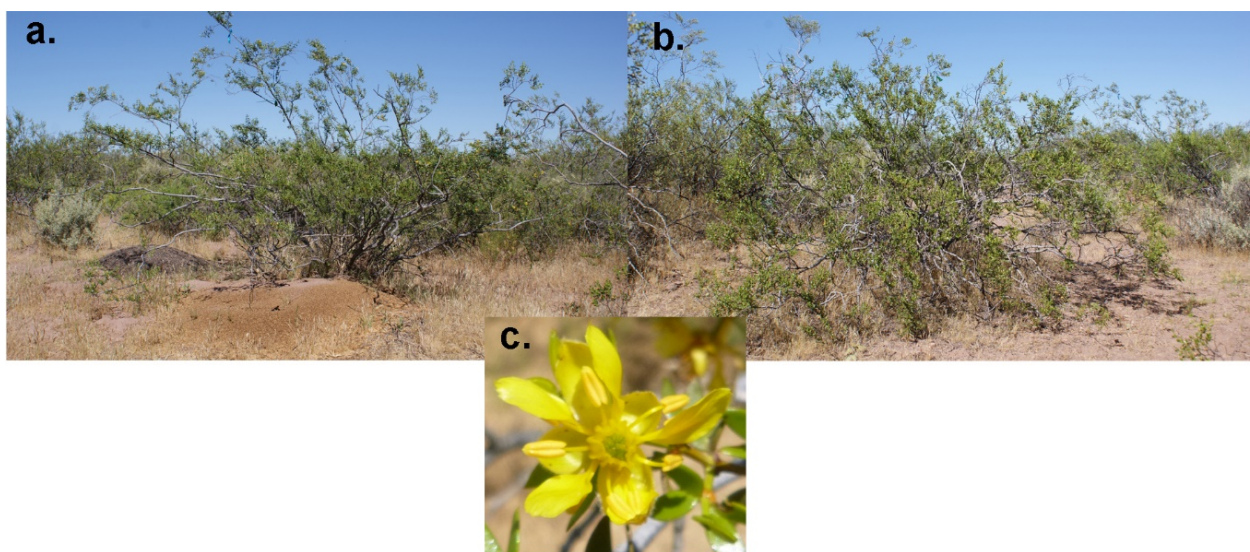
20

21 *Metodología*

22 El trabajo de campo lo realicé en la región del Monte austral, en Villa El Chocón (39° 17'
23 S, 68° 55' O), durante tres primaveras consecutivas (2014-2016). En cada temporada previo
24 al inicio de la floración, marqué plantas adultas de *L. divaricata* creciendo sobre basureros
25 (B, de aquí en más) pertenecientes a colonias activas de *A. lobicornis* (Fig. 2a). Los
26 basureros debían cumplir tres requisitos; 1) estar por debajo de la copa de los arbustos para
27 garantizar el acceso de las raíces a los nutrientes lixiviados 2) estar en uso activo por las
28 colonias, para asegurar que los nutrientes no hayan sido lixiviados en las temporadas
29 anteriores y 3) tener un tamaño mínimo de 70 cm de diámetro, para garantizar que las

1 plantas tuvieran acceso al mismo desde al menos tres a cuatro meses previos a la floración.
2 Cada vez que marqué una planta creciendo sobre un basurero, a una distancia de entre
3 cuatro a once metros de la misma, seleccioné un individuo creciendo en suelo desnudo (S,
4 de aquí en más). Estos debían tener un tamaño y entorno (e.g. plantas vecinas) similares a
5 los de las plantas creciendo en basureros (Fig. 2b). Los individuos no se repitieron entre
6 temporadas y el total de parejas basurero-suelo desnudo marcadas por año fueron cinco,
7 ocho y tres, para el 2014, 2015 y 2016, respectivamente.

8



9

10 **Figura 2:** Arbusto de *L. divaricata* creciendo sobre a) basureros de la hormiga cortadora *A.*
11 *lobicornis*; b) sobre suelo control y c) flor, previo a la maduración de las anteras.

12

13 Durante la temporada de floración (i.e., entre noviembre y diciembre), realicé los
14 tratamientos de polinización manual. En cada uno de los individuos creciendo sobre
15 basurero y suelo desnudo, apliqué cinco tratamientos para los cuales marqué una rama, por
16 cada tratamiento, con un número conocido de botones florales (de 5 a 12). Para cuatro de
17 estos tratamientos, excluí los visitantes florales embolsando las ramas completas con tul,
18 material que impide el acceso a los polinizadores sin modificar las condiciones micro-
19 climáticas de la flor (Tadey *et al.* 2009). Los tratamientos de polinización fueron: a)
20 polinización natural sin ningún tipo de intervención (abierta); b) polinización autónoma

1 autogámica (auto), flores embolsadas sin polinización manual en la cual la flor se auto-
2 poliniza con su propio polen; c) auto-compatible o geitonogámica (geito), flores
3 embolsadas y polinizadas manualmente con polen proveniente de la misma planta pero de
4 flores diferentes; d) cruzada-basurero (cruz-B), polinización manual con polen proveniente
5 de otras plantas creciendo sobre basurero y e) cruzada-suelo desnudo (cruz-S), flores
6 embolsadas con polinización manual usando polen proveniente de otras plantas creciendo
7 sobre suelo desnudo. Los tratamientos de polinización manual los realicé durante las
8 primeras horas de la mañana el mismo día en el que abrían los capullos, cuando los
9 estigmas ya estaban receptivos y las anteras aún cerradas (Rossi *et al.* 1999). Para coleccionar
10 el polen y depositarlo en los estigmas utilicé pinceles de punta fina, uno por cada tipo de
11 tratamiento para evitar contaminación. En los casos de polinización cruzada, el polen lo
12 colecté de dos o tres plantas diferentes, ubicadas a más de diez metros de distancia de la
13 planta polinizada para disminuir posibilidades de endogamia. Realicé un seguimiento diario
14 de las ramas embolsadas, hasta que todos los botones florales recibiesen el tratamiento de
15 polinización asignado. Una vez finalizado los tratamientos de polinización, colecté los
16 estilos florales de todas las flores marcadas dejando pasar una semana desde el momento de
17 la polinización, para no interrumpir el crecimiento de los tubos polínicos y la fecundación.
18 Ya que, existen evidencias que para *L. nitida* una especie cercana a *L. divaricata*, el tubo
19 polínico alcanza el ovario dentro de las 24 h desde la polinización (Rossi *et al.* 1999). Los
20 estilos los conservé en alcohol 70% para su posterior observación (Aizen *et al.* 1990;
21 Kearns & Inouye 1993). Si bien el alcohol puede generar el desprendimiento de algunos de
22 los granos de polen depositados en los estigmas, provocando la subestimación de los
23 mismos durante el conteo, asumo que este efecto será igual para todos los tratamientos por
24 lo que no invalidaría las comparaciones posteriores. Aproximadamente dos meses después
25 de realizada la polinización, durante la época de fructificación colecté los frutos maduros de
26 todos los tratamientos. Dado que en plantas de *L. divaricata* es muy frecuente la formación
27 frutos con uno o todos los mericarpos vacíos o con semillas abortadas (Marco *et al.* 2000).
28 En el laboratorio abrí cada uno de los mericarpos y conté el número de semillas formadas.
29 Ya que, sólo un óvulo por cada uno de los cinco lóculos formará semilla, el fruto puede
30 tener como máximo cinco semillas (uno por mericarpo) (Marco *et al.* 2000). Por lo tanto, la
31 producción de semillas por fruto la estimé como: $n^\circ \text{ semillas} / (5 * n^\circ \text{ frutos})$.

1 En los estilos colectados en el campo, realicé el conteo de granos de polen depositados en
2 los estigmas y el número de tubos polínicos desarrollados, utilizando un microscopio de
3 epifluorescencia Olympus BX51, aplicando el método de tinción de azul de anilina
4 (Apéndice 1) (Kearns & Inouye 1993). Como no fue posible seguir los tubos polínicos a lo
5 largo de todo el estilo, ya que los mismos se rompían o enmarañaban llegando a la base del
6 mismo, el conteo lo realicé en la zona del estilo cercano al estigma, que frecuentemente
7 estaba más preservada. Para lo cual tracé una línea imaginaria transversal al estilo, a la
8 altura del primer cuarto del largo total del estilo y conté el número de tubos polínicos que
9 atravesaban la misma. Para cada individuo, observé entre dos a diez estilos por tratamiento
10 de polinización. Como estimador de germinación utilicé la proporción de granos
11 germinados, calculada como: el nº tubos polínicos/nº granos de polen depositados.

12 La observación de los granos depositados y germinados en los diferentes tratamientos de
13 polinización y en ambos sustratos (B vs S), me permitió:

- 14 a. Constatar si los tratamientos de polinización manual fueron correctamente
15 realizados.
- 16 b. Estimar y comparar la cantidad de polen depositado naturalmente en las flores
17 pertenecientes a plantas sobre basureros y sobre suelo control.
- 18 c. Evaluar la capacidad de autopolinización de *L. divaricata*.
- 19 d. Comparar la adecuación de los granos de polen provenientes de plantas creciendo
20 sobre S y B.

21 Durante el transcurso del ensayo de polinización, una de las principales dificultades fue
22 encontrar en el campo polen de anteras recién abiertas para realizar las polinizaciones
23 manuales. Por otro lado, muchas de las flores marcadas o sus estilos se perdieron por los
24 fuertes vientos que quebraron las ramas embolsadas o fueron dañados por herbivoría; lo
25 mismo ocurrió durante la fructificación.

26

27 *Análisis de datos*

28 Para los análisis de producción de semillas por fruto no incluí datos provenientes de la
29 temporada de 2014, ya que a pesar de haber producido frutos ninguno de los tratamientos

1 de polinización produjo semillas. Para determinar y comparar el grado de limitación
2 polínica en plantas creciendo sobre B y sobre S, apliqué un modelo lineal generalizado con
3 distribución binomial (MLG binomial) en el cual la variable respuesta fue la producción de
4 semillas por fruto y las variables explicativas fueron el tipo de polinización (i.e., abierta y
5 cruzada) y el sustrato sobre el cual crecía la planta (i.e., basurero (B) y suelo (S)). Además,
6 calculé el índice de limitación polínica: $L = 1 - (P_{abierta}/P_{cruz})$, siendo $P_{abierta}$ y P_{cruz} la
7 producción de semillas de los tratamientos control (polinización abierta) y polinización
8 cruzada (con exceso de polen), respectivamente, $L = 0$ indica que no hay limitación
9 polínica en la población mientras que, $L = 1$ indica máxima limitación polínica (Larson &
10 Barrett 2000). Para cada individuo la producción de semillas por fruto para el tratamiento
11 de polinización cruzada, lo calculé como el promedio de la producción de semillas por fruto
12 de ambos tipos de polinización cruzada (cruz-B y cruz-S). Por otro lado, para comparar el
13 número de granos de polen depositados en los estigmas florales del tratamiento de
14 polinización abierta entre basureros y suelo desnudo, utilicé la prueba no paramétrica
15 Mann-Whitney dada la ausencia de normalidad en la distribución de los datos.

16 Para el análisis del sistema reproductivo, apliqué dos modelos lineales generalizados con
17 distribución binomial (MLG binomial) y pruebas de medias *post hoc* (Kelly *et al.* 2007),
18 para lo cual utilicé el paquete estadístico “lsmeans” para R. Para el primer modelo la
19 variable respuesta fue la producción de frutos por flor y para el segundo la producción de
20 semillas por fruto, en ambos casos la variable explicativa fue el tratamiento de polinización
21 (i.e., abierta, auto, geito, cruz-B y cruz-S). Para evaluar la germinación de polen en función
22 del tratamiento de polinización utilicé un modelo lineal generalizado mixto con distribución
23 binomial, con el individuo como variable aleatoria y una prueba de medias. Este último
24 modelo permite explorar si las barreras de auto-incompatibilidad (si es que las hay) actúan
25 a nivel estigma o estilo.

26 Para comparar el vigor del polen producido por plantas creciendo sobre basurero y suelo,
27 en función de la germinación (n° tubos polínicos/ n° granos de polen depositados), apliqué
28 un modelo lineal mixto con distribución binomial, siendo el sustrato el efecto fijo y el
29 individuo el aleatorio. Para evaluar la producción de semillas por fruto de flores
30 polinizadas con ambos tipos de polen, apliqué un modelo lineal con distribución binomial

1 con el sustrato como efecto fijo. En este caso no utilicé un modelo mixto porque para esta
2 variable, hubo una única observación por individuo,

3

4 **Resultados**

5 *Limitación polínica*

6 No detecté limitación polínica en la producción de semillas por fruto de plantas de *L.*
7 *divaricata* creciendo sobre basureros y suelo ($L_S = 0.0$ y $L_B = 0.1$, siendo L_S y L_B los
8 índices de limitación polínica para plantas sobre S y B, respectivamente). Es decir, la
9 producción de semillas fue similar para ambos tipos de polinización (i.e., abierta y cruzada)
10 en plantas creciendo sobre los dos tipos de sustrato (Tab. 2 y Fig. 3). Además, el número de
11 granos de polen depositados naturalmente en los estigmas en plantas creciendo sobre
12 basurero y en suelo desnudo también fueron similares entre sí ($U = 120$, $P = 0.8$, $X_B = 192$
13 ± 110 y $X_S = 216 \pm 205$, siendo X_B y X_S las medias \pm el error estándar para basurero y suelo
14 desnudo, respectivamente) (Fig. 4).

15

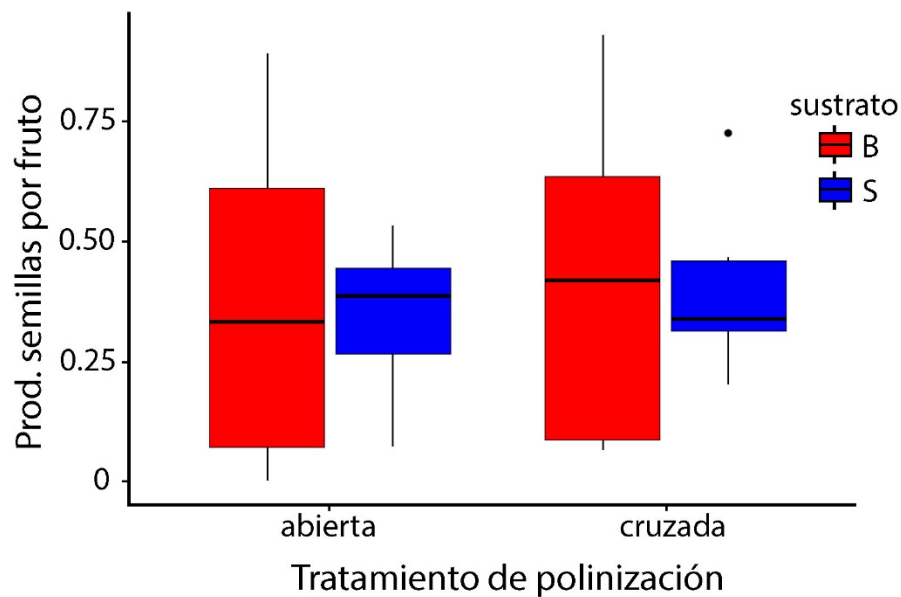
16

SEMILLAS	estimados	E.E	Z	P (< Z)
Intercepto	0.42	0.18	-1.72	0.09
“cruz”	0.47	0.23	-0.49	0.63
“S”	0.45	0.24	-0.78	0.44
“cruz” * “S”	0.56	0.33	0.71	0.48

1

2 **Tabla 2:** Coeficientes estimados del modelo lineal generalizado con distribución binomial de
3 producción de semillas (n° semillas/ (5* n° frutos)), en función del tratamiento de polinización (i.e.,
4 polinización abierta y cruzada) y del sustrato donde crece el individuo (i.e., basureros (B) y suelo
5 desnudo (S)). E.E es el error estándar.

6

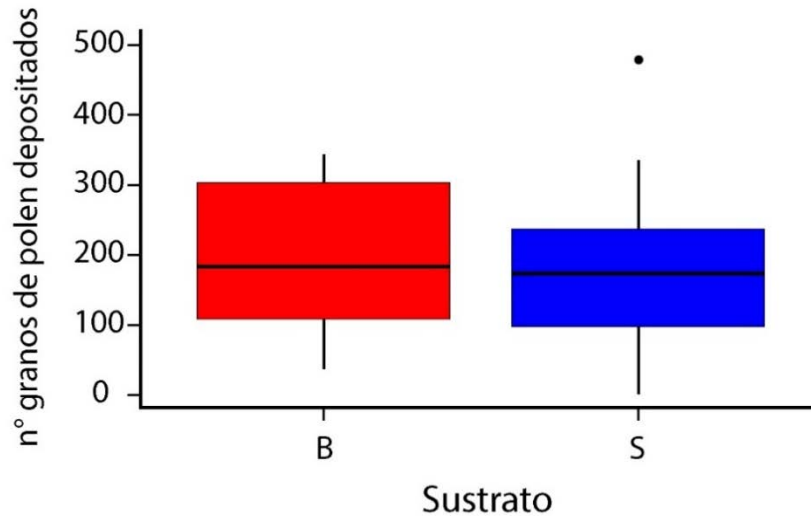


7

8 **Figura 3:** Boxplot, representando la producción de semillas por fruto de flores polinizadas
9 naturalmente (abierta) y manualmente (cruzada) en plantas creciendo sobre basureros (B, cajas
10 rojas) y sobre suelo desnudo (S, cajas azules). La línea central representa la mediana, los límites
11 inferior y superior representan los cuartiles del 25 y 75 %, respectivamente. Las líneas verticales
12 representan los valores mínimos y máximos y los puntos valores extremos.

13

14



1

2 **Figura 4:** Boxplot, representando el número de granos de polen depositados en las flores
 3 polinizadas naturalmente (abierta) en plantas creciendo sobre basureros (B, caja roja) y sobre suelo
 4 desnudo (S, caja azul). La línea central representa la mediana, los límites inferior y superior
 5 representan los cuartiles del 25 y 75 %, respectivamente. Las líneas verticales representan los
 6 valores mínimos y máximos y los puntos valores extremos.

7

8 *Sistema reproductivo*

9 Debido a que no hubo un efecto del tipo de sustrato en la producción de semillas por fruto,
 10 para evaluar el sistema reproductivo analicé en conjunto los datos obtenidos de plantas
 11 sobre basureros y suelo desnudo. Los tratamientos de polinización para evaluar el grado de
 12 auto-compatibilidad y la capacidad de auto-polinización autónoma no afectaron la
 13 producción de frutos por flor pero sí la producción de semillas por fruto (Tab. 3 y 4). La
 14 producción de semillas por fruto fue similar entre los tratamientos de polinización cruzada
 15 (B y S) y abierta, y alrededor de cuatro veces mayor que en los tratamientos de
 16 polinización autógama autónoma y geitonogama que produjeron similar número de semillas
 17 (Fig. 5). Por otro lado, la germinación del polen (n° tubos polínicos/n° granos de polen
 18 depositados) en los estigmas también estuvo afectada por los diferentes tratamientos de
 19 polinización (Tab. 5). La germinación en el tratamiento de polinización autógama
 20 autónoma fue similar a la de polinización cruzada (S), mientras que la de polinización y

1 cruzada (B) fueron similares entre sí y a la vez cruzada (B) fue similar a la de polinización
 2 geitonogama (Fig. 6).

3

FRUTOS	estimados	E. E.	Z	$P(> Z)$
Intercepto (auto)	0.51	0.23	-1.30	0.07
abierta	0.52	0.20	-1.28	0.42
cruz-B	0.58	0.18	1.84	0.20
cruz-S	0.53	0.24	-0.81	0.29
geito	0.52	0.25	-1.05	0.19

4

5 **Tabla 3:** Coeficientes estimados del modelo lineal generalizado con distribución binomial de
 6 producción de frutos por flor (n° frutos/ n° flores), en función del tratamiento de polinización (i.e.,
 7 polinización natural (abierta), autógama autónoma (auto), geitonogama (geito) y cruzada con polen
 8 proveniente de plantas creciendo sobre basureros (cruz-B) y sobre suelo desnudo (cruz-S)). E.E es
 9 el error estándar.

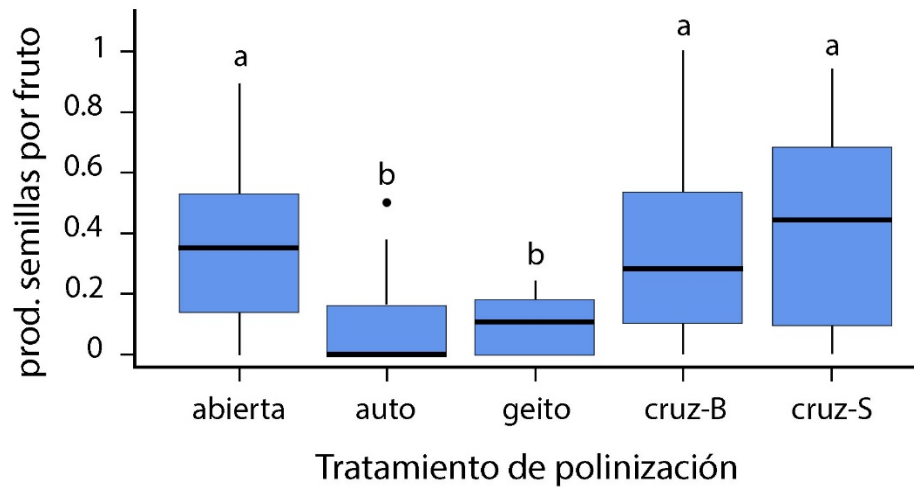
10

SEMILLAS	estimados	E. E.	Z	$P(> Z)$
Intercepto (auto)	0.10	0.19	-11.20	<0.001***
abierta	0.39	0.23	7.67	<0.001***
cruz-B	0.38	0.23	7.34	<0.001***
cruz-S	0.44	0.23	8.47	<0.001***
geito	0.11	0.29	0.29	0.77

11

12 **Tabla 4:** Coeficientes estimados del modelo lineal generalizado con distribución binomial de
 13 producción de semillas por fruto (n° semillas/ (5* n° frutos)), en función del tratamiento de
 14 polinización (i.e., polinización natural (abierta), autógama autónoma (auto), geitonogama (geito) y
 15 cruzada con polen proveniente de plantas creciendo sobre basureros (cruz-B) y sobre suelo desnudo
 16 (cruz-S)). E.E es el error estándar.

17



1

2 **Figura 5:** Boxplot, representando la producción de semillas por fruto (n° semillas/ (5* n° frutos)) de
 3 flores bajo cinco tratamientos de polinización. Los tratamientos de polinización fueron:
 4 polinización natural (abierta), autógama autónoma (auto), geitonogama (geito) y cruzada con polen
 5 proveniente de plantas creciendo sobre basureros (cruz-B) y sobre suelo desnudo (cruz-S). La línea
 6 central representa la mediana, los límites inferior y superior representan los cuartiles del 25 y 75 %,
 7 respectivamente. Las líneas verticales representan los valores mínimos y máximos. Las letras
 8 encima de las cajas representan los grupos homogéneos, determinados por el prueba de medias.

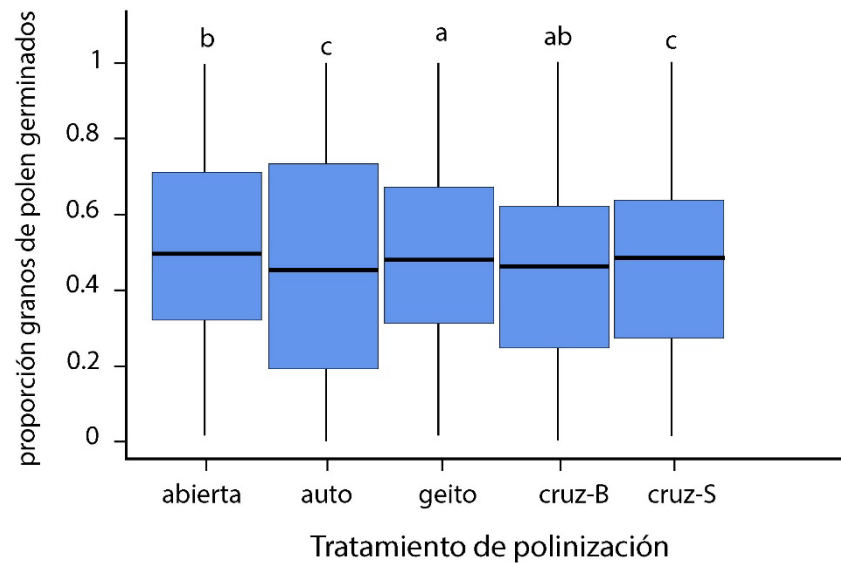
9

POLEN	estimados	E.E	Z	P (< Z)
Intercepto (auto)	0.45	0.03	-4.6	<0.01**
abierta	0.49	0.09	-0.37	<0.7
cruz-B	0.50	0.03	1.68	0.09
cruz-S	0.47	0.04	-2.99	<0.01**
geito	0.51	0.03	2.89	<0.01**

10

11 **Tabla 5:** Coeficientes estimados del modelo lineal generalizado con distribución binomial de la
 12 germinación de los granos de polen en función del tratamiento de polinización (i.e., polinización
 13 natural (abierta), autógama autónoma (auto), geitonogama (geito) y cruzada con polen proveniente
 14 de plantas creciendo sobre basureros (cruz-B) y sobre suelo desnudo (cruz-S)). E.E es el error
 15 estándar.

1



2

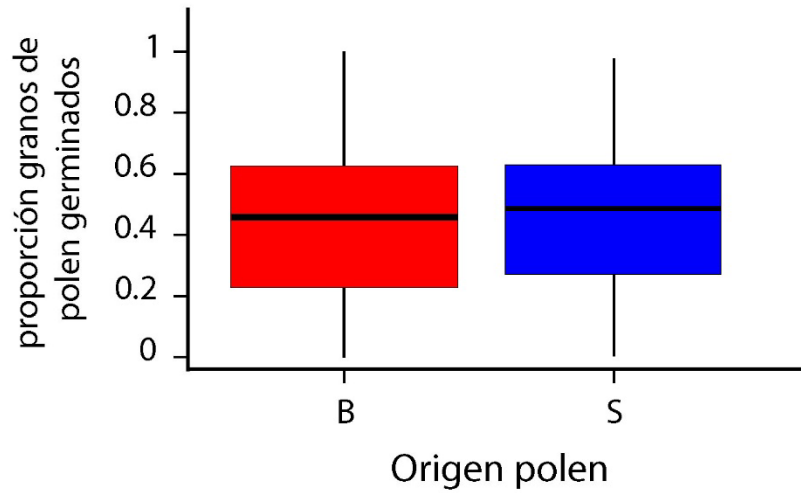
3 **Figura 6:** Boxplot, representando la germinación de polen (n° tubos polínicos/n° granos de polen
4 depositados) en flores polinizadas por cinco tratamientos de polinización. Los tratamientos fueron:
5 polinización natural (abierta), autógama autónoma (auto), geitonogama (geito) y cruzada con polen
6 proveniente de plantas creciendo sobre basureros (cruz-B) y sobre suelo desnudo (cruz-S). La línea
7 central representa la mediana, los límites inferior y superior representan los cuartiles del 25 y 75 %,
8 respectivamente. Las líneas verticales representan los valores mínimos y máximos. Las letras
9 encima de las cajas representan los grupos homogéneos, determinados por la prueba de medias.

10

11 *Vigor masculino*

12 La germinación del polen producido por plantas sobre basurero fue levemente mayor que la
13 de plantas sobre suelo desnudo ($Z = -1.99$, $P = 0.05$, $X_B = 0.51 \pm 0.15$ y $X_S = 0.49 \pm 0.04$,
14 siendo X_B y X_S las medias \pm el error estándar para basurero y suelo desnudo,
15 respectivamente) (Fig. 7). Por otra parte, no hubo diferencia en el número de semillas
16 producidas por flores polinizadas con polen proveniente de plantas sobre basurero y sobre
17 suelo también fue similar a cero ($Z = -1.99$, $P = 0.17$, $X_B = 0.38 \pm 0.13$ y $X_S = 0.44 \pm 0.17$,
18 siendo X_B y X_S las medias \pm el error estándar para basurero y suelo desnudo,
19 respectivamente) (Fig. 8).

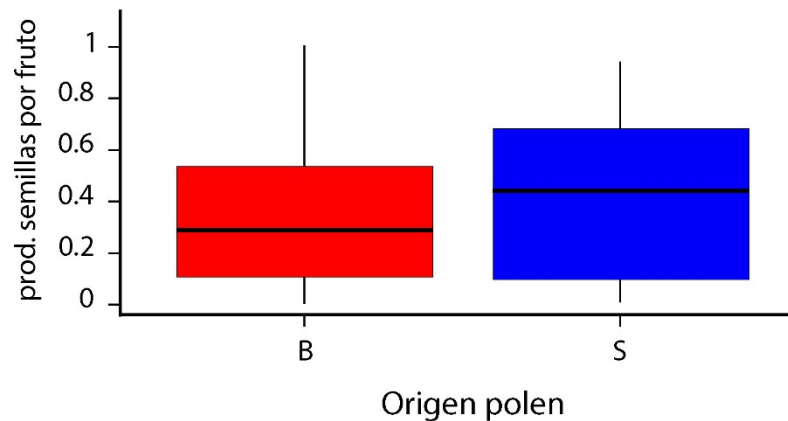
1



2

3 **Figura 7:** Boxplot, representando la germinación de polen (nº tubos polínicos/nº granos de polen
4 depositados) producido por plantas creciendo sobre basureros (B, caja roja) y sobre suelo desnudo
5 (S, caja azul). La línea central representa la mediana, los límites inferior y superior representan los
6 cuartiles del 25 y 75 %, respectivamente. Las líneas verticales representan los valores mínimos y
7 máximos y los puntos valores extremos.

8



9

10 **Figura 8:** Boxplot, representando la producción de semillas por fruto de flores polinizadas con
11 polen producido por plantas creciendo sobre basureros (B, caja roja) y sobre suelo desnudo (S, caja
12 azul). La línea central representa la mediana, los límites inferior y superior representan los cuartiles

1 del 25 y 75 %, respectivamente. Las líneas verticales representan los valores mínimos y máximos y
2 los puntos valores extremos.

3

4 **Discusión**

5 La función reproductiva femenina y masculina de las plantas polinizadas por animales
6 puede estar beneficiada por la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Si la planta
7 aprovecha incrementos nutritivos puede reducir la limitación polínica por el aumento del
8 atractivo floral y/o aumentar el vigor del polen (Haig & Westoby 1988; Lau & Stephenson
9 1994). En este capítulo, evalué el efecto de los basureros de *A. lobicornis*, un sustrato
10 naturalmente rico en nutrientes, sobre los componentes reproductivos femeninos (i.e.,
11 producción de semillas) y masculinos (i.e., germinación de polen) en *L. divaricata*. En base
12 a los resultados de los experimentos de polinización controlada a campo, no encontré
13 ningún efecto beneficioso de los basureros de las hormigas cortadoras sobre la producción
14 de semillas por fruto de *L. divaricata*. Las plantas sobre basurero y suelo produjeron similar
15 número de semillas por fruto, la cual no aumentó cuando las flores estuvieron polinizadas
16 manualmente. Además, la germinación del polen proveniente de plantas sobre basureros
17 fue apenas mayor que el generado por el polen proveniente de plantas en suelo desnudo,
18 mientras que el número de semillas engendradas fue similar. Por otro parte, a partir de los
19 tratamientos de polinización con polen propio y extraño corroboré que *L. divaricata* es
20 parcialmente auto-compatible y que depende de insectos para su polinización, aunque no
21 pude demostrar limitación por polen.

22 El índice de limitación polínica (L), indicó que *L. divaricata* no se encuentra limitada por
23 polen, independientemente de si crece sobre basurero o suelo desnudo. En otras palabras,
24 las flores polinizadas naturalmente produjeron similar cantidad de semillas por fruto que las
25 polinizadas manualmente en plantas creciendo sobre ambos sustratos. Sin embargo, el
26 número de granos de polen recibidos mediante polinización natural (abierta) fue, similar
27 entre plantas creciendo sobre basurero y suelo, pero 2.8 veces mayor que en las flores
28 polinizadas manualmente (Apéndice 2). Este resultado sugiere que la polinización manual
29 no fue exitosa, lo cual concuerda con la gran dificultad que tuve en el campo para conseguir
30 polen de anteras recién abiertas y con la complejidad intrínseca de la polinización manual

1 en flores relativamente pequeñas como las de esta especie. En general, independientemente
2 del tratamiento de polinización, la producción de semillas no estuvo relacionada
3 linealmente con la cantidad de granos de polen que recibieron las flores (Apéndice 3), por
4 lo que posiblemente la calidad sea un factor importante. Por lo tanto, la menor cantidad de
5 polen en los tratamientos de polinización manual parece estar compensada por la calidad
6 del mismo, ya que este era puramente exógamo (Thomson 2001). Es posible que, si las
7 flores del tratamiento de polinización cruzada hubiesen recibido al menos la misma
8 cantidad de polen que el control, la producción de semillas por fruto hubiese sido aún
9 mayor. Dado que el índice presupone que la cantidad de polen depositada por polinización
10 manual siempre es mayor a la de polinización natural y que en el presente trabajo no
11 sucedió esto, no se puede afirmar que no exista limitación polínica en esta especie. Por otro
12 lado, en todos los casos la producción de semillas por fruto fue relativamente baja, ya que
13 no superó el 40 %, sugiriendo que, independientemente de los resultados de la polinización
14 manual, algún factor está limitando la reproducción en esta población. Otras poblaciones
15 de *L. divaricata* en el bosque Chaqueño también formaron menos semillas que las
16 potencialmente posibles (Marco *et al.* 2000). Los factores que más comúnmente limitan la
17 reproducción de las plantas polinizadas por animales son la disponibilidad de polen y de
18 recursos (e.g. nutrientes y agua) (Campbell & Halama 1993; Asikainen & Mutikainen
19 2005). Si en este caso, el factor limitante fuese sólo la disponibilidad de nutrientes,
20 esperaríamos que las plantas que crecen sobre los basureros hubiesen producido mayor cantidad
21 de semillas que las plantas sobre suelo control, pero esto no fue así ya que la producción de
22 semillas fue similar. Por otra parte, la disponibilidad de agua es otro de los factores que con
23 frecuencia limitan la reproducción (Delph 1986), sobre todo en los sistemas áridos y
24 semiáridos donde las precipitaciones son esporádicas (Chesson *et al.* 2004). La baja
25 disponibilidad de agua afecta la reproducción directamente limitando la formación de las
26 estructuras reproductivas o indirectamente disminuyendo la mineralización y movilización
27 de los nutrientes del suelo (Fischer & Turner, 1978; Austin *et al.*, 2004). Específicamente,
28 se ha demostrado experimentalmente que la actividad de los microorganismos de los
29 basureros de *A. lobicornis* aumenta significativamente frente a incrementos de la
30 disponibilidad de agua (Fernandez *et al.* 2014). Por lo tanto, a pesar que los basureros
31 tienen alto contenido nutricional (ver **capítulo 3**) posiblemente debido a las escasas

1 precipitaciones que caracterizan esta región, los nutrientes queden retenidos en el suelo y
2 no puedan ser aprovechados por las plantas que crecen sobre los basureros de las hormigas.

3 Teniendo en cuenta la producción de semillas por fruto de los tratamientos de polinización
4 con polen propio y extraño, podemos decir que *L. divaricata* es una especie con un grado
5 moderado de auto-compatibilidad, en coincidencia con lo encontrado previamente por
6 Rossi *et al.* (1999). Con respecto a la producción de frutos por flor, no hubo diferencia
7 entre tratamientos pudiéndose deber a que muchos de los frutos formados tenían gran
8 número de mericarpos vanos o semillas abortadas, en coincidencia con lo reportado por
9 Marco *et al.* (2000). Por lo tanto, la mejor variable para estimar el éxito reproductivo en
10 esta especie es la producción de semillas. En este sentido, las flores polinizadas con polen
11 propio produjeron alrededor de un 10% de semillas, mientras que las polinizadas
12 naturalmente y con polen producido por otros individuos produjeron entre 35 y 40 %. Sin
13 embargo, aunque la adecuación autogámica no sea muy alta, la auto-polinización autónoma
14 es posible ya que pude observar la presencia de granos de polen en los estigmas que no
15 recibieron ningún tipo de polinización y que estuvieron aisladas de los polinizadores. La
16 auto-polinización podría ocurrir durante unos de los estadios florales en el cual las anteras
17 están en contacto con el estigma (Rossi *et al.* 1999). Por otro lado, los granos depositados
18 en los estilos pertenecientes a los tratamientos de polinización autógama autónoma y
19 geitonogama germinaron y desarrollaron tubos polínicos a una proporción similar que en
20 los polinizados naturalmente o con polen extraño (entre 40-50 %). Las especies auto-
21 incompatibles poseen mecanismos de “auto rechazo” que limitan la autofecundación, las
22 más comunes son la barrera esporófitica (i.e., controlado por el genotipo del esporófito,
23 fase diploide, productor de gametas) y la gametófitica (i.e., controlado por el genotipo del
24 polen, fase haploide) (Hiscock & Tabah 2003). La primera se manifiesta en el estigma,
25 evitando la germinación de los granos y la segunda actúa a lo largo del estilo a medida que
26 el tubo polínico crece y evita que el mismo alcance el ovario. Además, existe un tercer
27 mecanismo que es menos común y se da en el ovario, este puede ser pre o postcigótico
28 (Seavey & Bawa 1986). En *L. divaricata*, las barreras de auto incompatibilidad no
29 parecieran ser esporofíticas ya que los tubos polínicos se desarrollaron, pero dada la
30 imposibilidad de observar el crecimiento de los mismos en el tramo final del estilo y en el
31 ovario no es posible aseverar que mecanismo está limitando la auto-fertilización. A pesar

1 de tener la capacidad de auto-polinización, el éxito reproductivo de *L. divaricata* depende
2 de la intervención de los polinizadores, ya que la producción de semillas se incrementa
3 considerablemente cuando la polinización es cruzada. Por lo tanto, los rasgos florales
4 juegan un rol fundamental en el éxito de esta especie, ya que su mayor vistosidad podría
5 atraer más visitantes e incrementar el número de semillas engendradas.

6 Con respecto a la función masculina, los granos de polen provenientes de las plantas que
7 crecen sobre los basureros presentaron un porcentaje de germinación apenas mayor que el
8 polen de suelo desnudo pero similar porcentaje de semillas engendradas. En relación a la
9 germinación del polen, a pesar que el efecto del sustrato fue estadísticamente significativo,
10 biológicamente no es muy relevante. Ya que, el porcentaje de germinación del polen
11 proveniente de basureros fue apenas mayor que el de suelo (51 % vs 49 %) y además, esto
12 no se vio reflejado en el aumento de semillas engendradas. Aunque, el número de semillas
13 puede estar limitado por los recursos disponibles de la planta receptora de polen, para la
14 formación de semillas. Por lo tanto, la limitación de recursos podría enmascarar la
15 adecuación polínica, aunque como mencioné antes el aumento en la germinación de polen
16 proveniente de los basureros fue relativamente bajo. Sin embargo, este resultado deja
17 entrever el potencial del aumento del vigor del polen en relación a los basureros. La falta de
18 un patrón claro, puede deberse a que el tamaño de la muestra no fue el adecuado y un
19 aumento del mismo podría destapar el efecto del sustrato en el vigor masculino. Asimismo,
20 el aumento de nutrientes en el suelo podría mejorar la adecuación masculina a través de
21 otros mecanismos que aumentan las probabilidades de engendrar semillas. Por ejemplo, la
22 mayor producción de polen por antera (Lau *et al.* 1995) o el mayor número de flores
23 productoras de polen. Estudios previos han demostrado que plantas de otras especies
24 producen mayor número de flores cuando están asociadas a los basureros de *A. lobicornis*
25 (Farji-Brener & Ghermandi 2008). En el **capítulo 3**, mostraré el efecto del aumento de
26 nutrientes aportados por el basurero de hormigas cortadoras en la producción de flores de *L.*
27 *divaricata*. Sería interesante que futuros estudios, repitan este ensayo aumentando el
28 tamaño de muestra y evalúen la producción de granos de polen por antera y la tasa de
29 exportación de los mismos en plantas asociadas a los basureros antes de descartar el
30 potencial efecto de los mismos sobre la función masculina. Asimismo, es necesario la
31 realización de experimentos en los cuales el agua no sea una limitante para poder

1 determinar fehacientemente si el aumento de nutrientes aportados por los basureros
2 beneficia la adecuación de las plantas en este ambiente.

3 A través de este trabajo aporté nuevos conocimientos sobre la reproducción de *L. divaricata*
4 y, en coincidencia con otros autores, encontré que la producción de semillas, en general, es
5 bastante baja (Marco *et al.* 2000; Tadey & Souto 2016). Aunque, el índice de limitación
6 polínica fue muy bajo para esta población, no podemos descartar a este factor como una de
7 las causas limitantes de la reproducción a causa de las dificultades metodológicas. Sin
8 embargo, debido a la complejidad de la disponibilidad de los recursos en los sistemas
9 áridos y semi-áridos (Chesson *et al.* 2004), los factores que limitan la reproducción pueden
10 ser muy diversos y difíciles de dilucidar. Finalmente, encontré que las plantas que crecen
11 sobre el basurero de las hormigas incrementaron levemente su adecuación masculina,
12 sugiriendo que el aprovechamiento de parches ricos en nutrientes por parte de la vegetación
13 puede estar limitado por las condiciones de aridez.

14

1 **Apéndice 1:**

2 Protocolo de tinción para observación de tubos polínicos en microscopio de
3 epifluorescencia.

4

5 Preparado de estilos florales para observación:

- 6 1. Poner los estilos en tubos ependorff y enjuagarlos con agua destilada.
- 7 2. Dejar el estilo con agua destilada durante 24 hs*.
- 8 3. Quitar el agua destilada del ependorff y agregar NaOH 8 N, para que se ablanden
9 los tejidos vegetales.
- 10 4. Dejar el estilo en NaOH por 24 hs*.
- 11 5. Quitar el NaOH del ependorff y hacer varios enjuagues con agua destilada, hasta
12 que el agua salga completamente transparente.
- 13 6. Dejar los estilos con agua destilada por 24 hs*
- 14 7. Sacar el agua destilada del ependorff y poner azul de anilina.
- 15 8. Dejar los estilos en azul de anilina por lo menos 24 hs.
- 16 9. Montaje y observación. Los estilos que no se observan el mismo día que finaliza la
17 preparación, dejarlos guardados en heladera durante no más de 4 días en azul de
18 anilina.
- 19 10. Los preparados ya montados no deben estar más de 2 días fuera de heladera.

20

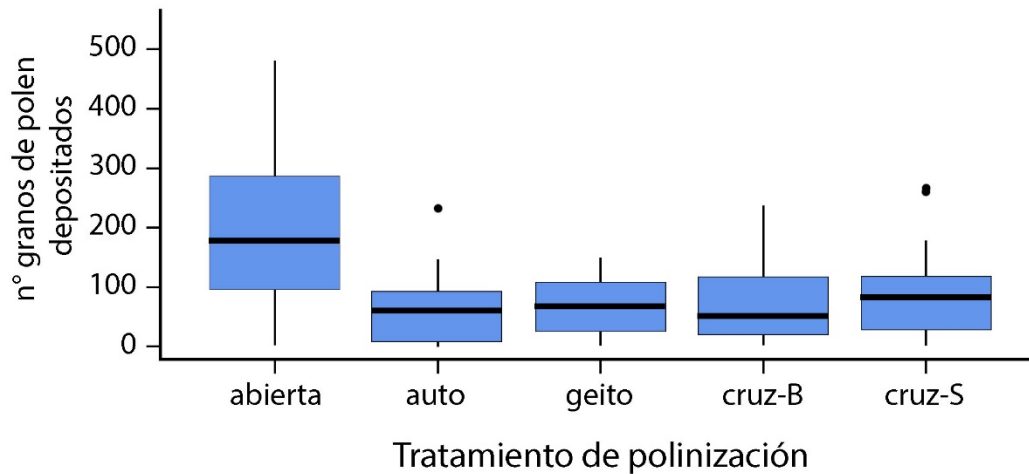
21 *La cantidad de horas en cada solución fue un ajuste del protocolo original, para lograr la
22 adecuada observación en *L. divaricata*.

23

1 **Apéndice 2:**

2 Boxplot, representando el número de granos de polen depositados en flores polinizadas por
3 cinco tratamientos de polinización. Los tratamientos fueron: polinización natural (abierta),
4 autógama autónoma (auto), geitonogama (geito) y cruzada con polen proveniente de plantas
5 creciendo sobre basureros (cruz-B) y suelo desnudo (cruz-S). La línea central representa la
6 mediana, los límites inferior y superior representan los cuartiles del 25 y 75 %,
7 respectivamente. Las líneas verticales representan los valores mínimos y máximos y los
8 puntos los valores extremos. Las letras encima de las cajas representan los grupos
9 homogéneos, determinados por el prueba de medias.

10



11

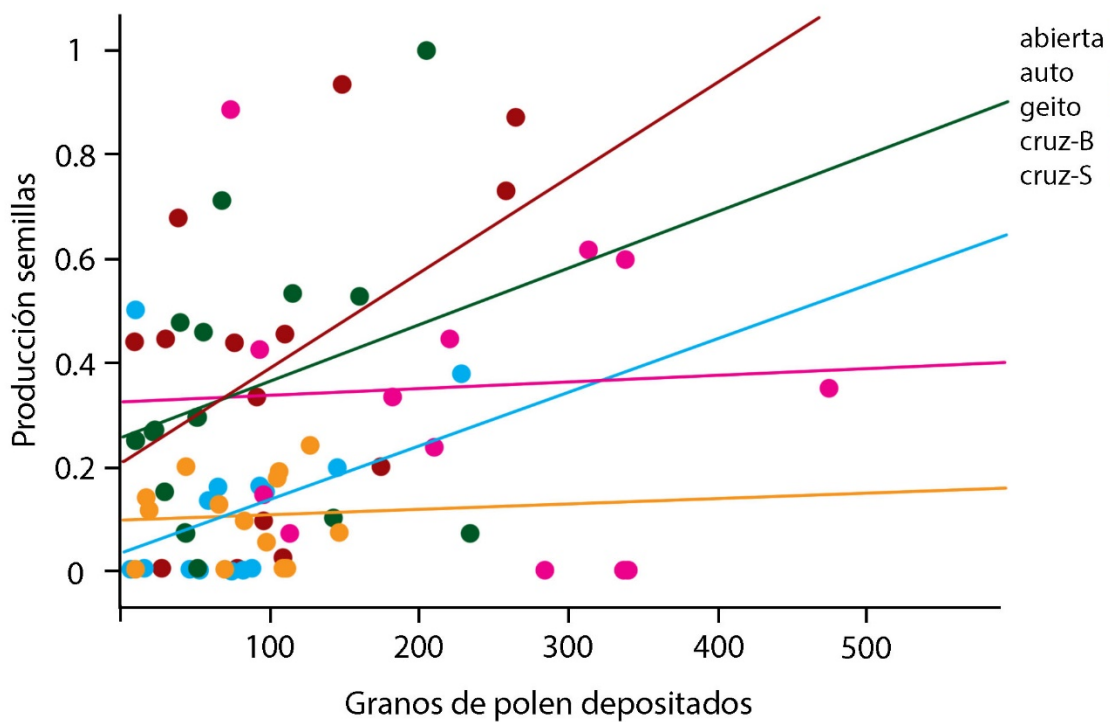
12 Este gráfico permite observar si los tratamientos de polinización manual (geito, cruz-B y
13 cruz-S) fueron realizados de manera correcta. En este caso, el polen que apliqué en estos
14 tratamientos no fue suficiente ya que no superó al depositado por polinización natural
15 (abierta).

16

1 **Apéndice 3:**

2 Diagrama de dispersión del número de semillas formadas por fruto en relación al número
3 de granos depositados en los estigmas florales, bajo los cinco tratamientos de polinización.
4 Los puntos fucsias representan el tratamiento de polinización natural (abierta), los celestes
5 la polinización autógama autónoma (auto), los verdes geitonogama (geito), los verdes
6 cruzada con polen proveniente de plantas sobre basureros (cruz-B) y los bordos la
7 polinización cruzada con polen proveniente de suelo desnudo (cruz-S). Las líneas, muestran
8 la tendencia lineal siguiendo la misma referencia de colores que los puntos. Los valores de
9 R^2 en todos los tratamientos de polinización fue menor a 0.1, excepto para la polinización
10 cruzada con polen proveniente de suelo que fue 0.4.

11



12

13

CAPÍTULO 3

Efectos indirectos de los basureros de *A. lobicornis* sobre la adecuación de plantas polinizadas por insectos: consecuencias sobre el atractivo floral.



Resumen

Los basureros de las hormigas cortadoras, ricos en nutrientes, pueden incrementar directamente el éxito reproductivo de las plantas incrementando la producción de flores y frutos. Sin embargo, ese aumento en recursos también podría afectar la adecuación de la planta indirectamente mejorando la relación con los polinizadores, al modificar el atractivo floral y favorecer la visita de los mismos. En este capítulo evalué de manera experimental en condiciones de invernadero, y a través de un trabajo de observación a campo, si los basureros de las hormigas cortadoras *Acromyrmex lobicornis* afectan los rasgos florales, la tasa de visita de polinizadores y el éxito reproductivo de plantas que crecen sobre ellos. En el invernadero cultivé plantas de *Eschscholzia californica* con y sin agregado de basurero. Durante la temporada de floración evalué cambios en rasgos florales relacionados con la atracción de polinizadores como la forma y tamaño de la flor aplicando métodos de morfometría geométrica. También evalué la duración de la floración, producción de flores y el tamaño del despliegue floral (i.e., número de flores abiertas el mismo día). Por otra parte, en la región del Monte austral y evalué el efecto de los basureros en tres especies de arbustos nativos (i.e., *Larrea divaricata*, *Monttea aphylla* y *Grindelia chiloensis*). Previo a la temporada de floración marqué individuos de las tres especies creciendo naturalmente sobre y lejos de los basureros de colonias activas de *A. lobicornis*. Durante la temporada de floración en *L. divaricata* y *M. aphylla* evalué la forma y el tamaño de la flor aplicando métodos de morfometría geométrica y medí producción de flores. En *G. chiloensis*, un arbusto con flores dispuestas en capítulos, medí la producción, el tamaño y la altura de los capítulos y la fenología floral. En las tres especies registré la tasa de visita y la riqueza de polinizadores y estimé el éxito reproductivo a través de la producción de semillas. Los basureros de *A. lobicornis* afectaron positivamente todos los rasgos florales evaluados en condiciones de invernadero, pero no en condiciones naturales. A campo ninguna de las variables asociadas al atractivo floral fue modificada por la presencia de basurero. Asimismo, la visita de los polinizadores fue similar en plantas creciendo en ambos sustratos. Sólo una de las especies (*L. divaricata*) produjo más semillas en plantas creciendo en basurero. En condiciones naturales el potencial efecto positivo de los basureros sobre las características florales podría estar limitado por las escasas

1 precipitaciones características de la región (que desfavorecen la movilización de los
2 nutrientes) y/o por los efectos negativos de la herbivoría, que suele aumentar en plantas
3 bien fertilizadas. Por otra parte, el efecto del basurero observado en condiciones de
4 invernadero, puede deberse la ausencia de limitaciones hídricas y/o a características de la
5 especie con la que trabajé, ya que la misma es una hierba, anual y exótica mientras que las
6 especies del campo son arbustos, perennes y nativos del sitio de estudio. Las especies
7 exóticas y anuales suelen tener estrategias diferentes de aprovechamiento y repartición de
8 los recursos que podrían explicar la diferencia entre los resultados obtenidos a campo y en
9 invernadero. Los resultados obtenidos bajo condiciones controladas apoyan la importancia
10 de la vía indirecta, en donde las hormigas benefician la adecuación de las plantas mediante
11 la modificación de rasgos florales asociados a la atracción de polinizadores. Sin embargo,
12 en la naturaleza este efecto podría estar condicionado por factores ambientales y por las
13 características particulares de las especies vegetales.
14

1 **Introducción**

2 En las plantas que son polinizadas por animales, los rasgos florales cumplen un
3 papel fundamental sobre la atracción de los polinizadores y, por ende, sobre el éxito
4 reproductivo de las mismas. Los polinizadores pueden asociar el color de la flor, su tamaño
5 o forma con recompensas nutricionales como néctar, polen o aceites (Rasmussen & Olesen
6 2000; Schiestl & Johnson 2013). Por ejemplo, las flores o inflorescencias de mayor tamaño
7 mejoran la atracción visual, y son más visitadas por los polinizadores que las más pequeñas
8 (Gómez *et al.* 2008a; Bauer *et al.* 2017). Por otra parte, la morfología de la flor puede
9 facilitar el aterrizaje para los polinizadores y el contacto entre las estructuras reproductivas
10 y el cuerpo del visitante (Nilsson 1988; Tadey & Aizen 2001). Los cambios en la forma de
11 la flor entre especies relacionadas, o entre individuos de una misma especie, usualmente
12 están asociados a la atracción de diferentes tipos de polinizadores (Gómez *et al.* 2008b). En
13 consecuencia, cambios en la forma, simetría o tamaño de las flores pueden poseer un
14 impacto directo sobre la tasa de visita de los polinizadores y sobre la adecuación final de la
15 planta. Dado que la expresión de la mayoría de los rasgos florales depende de la
16 disponibilidad de nutrientes al que accede una planta (Gardener & Gillman 2001),
17 comprender cómo los cambios en la fertilidad del suelo influyen sobre el fenotipo floral es
18 particularmente relevante para comprender la interacción entre las plantas y sus
19 polinizadores.

20 Los nutrientes del suelo afectan el éxito reproductivo de las plantas directamente
21 incrementando la producción de frutos y semillas, pero también indirectamente
22 modificando rasgos florales relacionados con la atracción de los polinizadores (Campbell &
23 Halama 1993). Por ejemplo, plantas fertilizadas de *Ipomopsis aggregata* producen flores
24 con corolas más anchas, más cantidad de néctar y períodos de floración más largos que
25 plantas no fertilizadas, y reciben más visitantes florales (Burkle & Irwin 2009). De la
26 misma manera, plantas de *Chuquiraga oppositifolia* bajo tratamientos de enriquecimiento
27 de nitrógeno produjeron más flores por individuo que plantas control, incrementando la
28 frecuencia de visita de los polinizadores (Muñoz *et al.* 2005). Sin embargo, estos trabajos
29 usaron fertilizantes artificiales en lugar de fuentes naturales de nutrientes, como suelo
30 enriquecido como consecuencia de la acumulación de materia orgánica (Voroney 2007).
31 Experimentos usando fuentes orgánicas de nutrientes son más realistas que los que usan

1 adición de fertilizantes químicos (Tibbett 2000). A pesar de esto, pocos estudios han
2 utilizado sustratos enriquecidos naturalmente para estudiar el efecto de la adición de
3 nutrientes sobre los rasgos florales. Una excepción es un estudio donde plantas de *Cucumis*
4 *sativus* creciendo sobre suelos enriquecidos con vermicompuesto produjeron flores más
5 pesadas y polen con mayor contenido proteico que plantas control y en consecuencia,
6 aumentaron las visitas y el tiempo de permanencia de los polinizadores en esas flores
7 (Cardoza, Harris, & Grozinger 2012). El uso de fertilizantes naturales tiene la ventaja de
8 que disminuyen la lixiviación de los nutrientes, debido a que la liberación de los mismos es
9 más gradual, con lo que su efecto puede ser más duradero (Chen 2006). Por otro lado, el
10 uso de fertilizantes naturales propios del sistema de interés es una ventaja tanto práctica
11 como ecológica. Por un lado, tienen la ventaja práctica de estar presentes en el sistema,
12 facilitando su recolección y distribución. Y por el otro lado, poseen la ventaja ecológica de
13 asegurar nutrientes sin aumentar la probabilidad de invasiones de especies que puedan
14 provenir de otro sistema. Por lo tanto, son necesarios más estudios usando fuentes naturales
15 de nutrientes para entender el flujo de nutrientes desde el suelo hacia la planta, y cómo esto
16 influye sobre otros niveles tróficos, por ejemplo, en el proceso de polinización a través del
17 incremento de la atracción floral.

18 Uno de los rasgos que cumple un rol fundamental en determinar la diversidad de los
19 visitantes que se acercan a una planta es la forma de la flor (Gómez *et al.* 2008b; Nilsson
20 1988). Pero a pesar de su importancia en la polinización, no encontré ningún trabajo en el
21 que se hayan evaluado cambios de la forma floral en relación a la disponibilidad de
22 nutrientes en el suelo. Existen algunos estudios que han observado variaciones en la forma
23 de hojas debido a la adición de fertilizantes (Gosler *et al.* 1994; Njoku 1957). Dado que los
24 pétalos y sépalos son hojas modificadas (Coen & Meyerowitz 1991), el incremento del
25 contenido nutricional podría afectar la forma de la flor, aumentando la diversidad de formas
26 como fue demostrado en las hojas. Uno de los aspectos de la forma de la flor que podría
27 variar con el aumento de nutrientes, es la simetría. La asimetría fluctuante son pequeñas
28 desviaciones de la simetría, asociadas a factores genéticos, pero también a estrés por alguna
29 variable ambiental (Neal, Dafni, & Giurfa 1998). Las flores más simétricas en general son
30 más visitadas por los polinizadores, favoreciendo la recepción y remoción de polen (Møller
31 & Eriksson 1995). Otros rasgos importantes en la atracción a los polinizadores es el tamaño

1 del despliegue floral (i.e., número de flores abiertas) que, de manera similar al tamaño de la
2 flor, produce mayor impacto visual cuando es más grande (Grindeland *et al.* 2005).
3 Similarmente, aquellas flores o inflorescencias que se encuentran a mayor altura sobre la
4 superficie del suelo sobresalen del resto, son más fáciles de detectar por los polinizadores y
5 son más visitadas (Ehrlen *et al.* 2002; Yoshihara *et al.* 2010). Por otra parte, una mayor
6 producción de flores extendida a lo largo del tiempo puede aumentar la efectividad de la
7 polinización, el número de visitantes y la diversidad de los mismos; aumentando las
8 probabilidades de fecundación y producción de semillas (Ohashi & Yahara 2002). Todas
9 estas variables podrían ser modificadas por la disponibilidad de nutrientes en los sustratos
10 donde crecen las plantas, afectando indirectamente la adecuación de la planta.

11 Una de las principales fuentes naturales de nutrientes en los suelos neo tropicales
12 son los basureros producidos por las hormigas cortadoras de hojas (Farji-Brener &
13 Werenkraut 2015). Las plantas que crecen asociadas a estos basureros, generalmente
14 muestran mayor crecimiento, acumulación de biomasa total y éxito reproductivo que
15 plantas cercanas creciendo sobre suelo control (Farji-Brener & Werenkraut 2015). Por
16 ejemplo, individuos de *Carduus nutans* asociados a los basureros crecieron en altura 1.1
17 veces más y produjeron el doble de inflorescencias que plantas en suelo desnudo (Farji-
18 Brener & Ghermandi 2008). Sin embargo, el aumento de la adecuación de estas plantas
19 podría ser una consecuencia directa de la mayor asignación de nutrientes a la producción de
20 frutos y flores (Farji-Brener & Ghermandi 2008). O podría ser una consecuencia indirecta
21 ocasionada por cambios en los rasgos florales asociados a la atracción de polinizadores y,
22 por lo tanto, a un incremento en la tasa de visitas, una mayor recepción de polen y, por lo
23 tanto, una mayor reproducción. El objetivo general de este capítulo fue evaluar este efecto
24 indirecto de los basureros de hormigas cortadoras de hojas sobre el éxito reproductivo de
25 plantas. Los objetivos específicos fueron: evaluar y comparar: I) cambios en los rasgos
26 florales asociados a la atracción, II) la tasa de visita de polinizadores y III) la producción de
27 semillas de plantas creciendo sobre y fuera de los basureros. Para ello postulé la siguiente
28 hipótesis: la gran disponibilidad de nutrientes que proveen los basureros de las hormigas
29 modifican los rasgos florales haciéndolos más atractivos para los polinizadores, mejorando
30 indirectamente la adecuación de las plantas que crecen asociados a esta fuente de
31 nutrientes. Específicamente, los rasgos que evalué fueron variaciones en la forma de la flor,

1 tamaño de la flor o inflorescencia y del despliegue floral, altura de la inflorescencia,
2 producción de flores y duración de la floración. En base a la hipótesis planteada espero que
3 las plantas creciendo sobre los basureros produzcan flores con formas más diversas y con
4 niveles de asimetría fluctuante más bajos, flores o inflorescencias y despliegues florales de
5 mayor tamaño, inflorescencias a mayor altura, mayor producción de flores y floraciones
6 más extendidas en el tiempo. Además, espero si estas plantas poseen rasgos florales más
7 atractivos, sean más visitadas por los polinizadores y que su adecuación reproductiva sea
8 mayor que aquellas plantas creciendo en suelo control.

9 Puse a prueba la hipótesis planteada a través de dos aproximaciones. Por un lado,
10 realicé un experimento en invernadero bajo condiciones controladas en el cual evalué los
11 rasgos florales de *Eschscholzia californica*, una especie herbácea polinizada por insectos,
12 con y sin agregado de basurero de la hormiga cortadora de hojas *A. lobicornis*. Elegí esta
13 especie porque está bien adaptada a los suelos pobres donde suelen encontrarse las colonias
14 de *A. lobicornis* (Kirkpatrick 1998). Además, contrario a la mayoría de las hierbas de la
15 Patagonia, es una especie que crece fácilmente y rápidamente en condiciones de
16 invernadero y posee flores grandes, facilitando la manipulación para aplicar métodos de
17 morfometría geométrica (Fig. 1b). No obstante, esta metodología al ser en condiciones de
18 invernadero y ser destructiva (i.e., las flores deben ser recolectadas para su análisis), no me
19 permite hacer observaciones de frecuencia de visitas ni evaluar la producción de semillas.
20 Por otra parte, realicé un trabajo de campo en el Monte austral, un sitio caracterizado por
21 tener suelos pobres y en el cual son frecuentes las colonias de esta especie de hormiga
22 cortadora, productoras del basurero utilizado como fertilizante en este trabajo (Tadey &
23 Farji-brener 2007). En este caso evalué los rasgos florales, la tasa de visita de polinizadores
24 y la producción de semillas/frutos de tres especies de arbustos nativos que se encontraban
25 creciendo naturalmente sobre y fuera de los basureros. Estos enfoques complementarios me
26 permitieron verificar si los eventuales patrones encontrados en condiciones controladas se
27 manifiestan también en condiciones naturales.

28

29 **Materiales y métodos**

30

31 *Especies de estudio*

1 Utilicé la hierba anual *Eschscholzia californica* en el experimento de invernadero y
2 analicé las especies de arbustos *Larrea divaricata*, *Monttea aphylla* y *Grindelia chiloensis*
3 en condiciones naturales. En condiciones de invernadero medí diferentes rasgos florales en
4 plantas creciendo con y sin el agregado de basurero, pero no pude estimar la tasa de visita
5 de polinizadores ni la producción de semillas por las características del experimento. En el
6 campo, aparte de medir las características florales de plantas creciendo naturalmente sobre
7 y lejos de basureros en las tres especies en estudio, medí la tasa de visita de polinizadores y
8 la producción de semillas o frutos, según la especie. Los rasgos florales evaluados fueron:
9 forma, tamaño y producción de flores para *E. californica*, *L. divaricata* y *M. aphylla*. Para
10 *E. californica* también medí la duración de la floración. Para *G. chiloensis*, debido a que
11 posee inflorescencias compuestas, evalué el tamaño, la altura y la producción de los
12 capítulos y la fenología floral.

13 *Eschscholzia californica*, es una especie herbácea anual proveniente de Norte
14 América que está muy bien adaptada a áreas disturbadas de la estepa patagónica (Correa
15 1988). En esas áreas, es común encontrarla creciendo cerca o sobre los basureros de la
16 hormiga cortadora *A. lobicornis* (Fig. 1a). Esta especie es parcialmente auto-compatible
17 pero depende de la polinización biótica. Sus principales polinizadores son abejas melíferas,
18 abejorros y algunos himenópteros solitarios (Cook 1962).

19



20

21 **Figura 1:** *E. californica* en la naturaleza a) creciendo sobre un basurero de *A. lobicornis* en
22 un sitio disturbado al costado de una ruta y b) flor abierta.

23

1 *Larrea divaricata* Cav (fam. Zygophyllaceae), es un arbusto con hojas perennes, su
2 distribución disyunta abarca regiones áridas y semiáridas, tanto al sur de América del norte
3 como al sur de América del sur (Hunziker 1975; Correa 1988; Lia *et al.* 2001). Tiene flores
4 solitarias, hermafroditas de color amarillo. El fruto es un esquizocarpo que se divide en cinco
5 mericarpos de una semilla (Correa 1988; Rossi *et al.* 1999). Es parcialmente auto-compatible
6 y posee autopolinización autónoma, pero cuando es polinizada por insectos la producción de
7 semillas aumenta entre tres y cuatros veces (ver **Capítulo 2**). En el área de estudio es
8 polinizada principalmente por abejas solitarias, aunque también por moscas y mariposas
9 (Tadey *et al.* 2009) (Fig. 2a).

10 *Monttea aphylla* Griseb. (fam. Plantaginaceae), es una especie auto-incompatible,
11 depende completamente de insectos para su polinización y en el sitio de estudio es
12 polinizada principalmente por tres especies de abejas de los géneros *Centris* y
13 *Mesonychium* (Tadey 2011). Tiene flores hermafroditas, color lavanda, tubulares,
14 bilabiadas-zigomórficas y en el interior poseen elaióforos tricómicos (Simpson, Neff, &
15 Dieringer 1990) (Fig. 2b).

16 *Grindelia chiloensis* (fam. Asteraceae) es un subarbusto, auto-incompatible,
17 completamente dependiente de polinizadores para la fertilización y es polinizada por una
18 amplia diversidad de insectos himenópteros, coleópteros, lepidópteros, dípteros, hemipteros
19 y tisanopteros (Roitman 1995; Tadey *et al.* 2009). Las inflorescencias son capítulos
20 dorados con flores femeninas y hermafroditas y el fruto es un aquenio (Cabrera 1971) (Fig.
21 2c).

22



23

24 **Figura 2:** Flores tres especies de arbustos nativos en el Monte austral a) *Larrea divaricata*;

25 b) *Monttea aphylla* y c) *Grindelia chiloensis*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

Metodología

Experimento de invernadero: diseño general

Durante abril de 2015, cultivé semillas de uso comercial de plantas de *E. californica* bajo dos tratamientos de sustrato; suelo control (S) y basurero (B). Ambos sustratos los colecté de Villa Llanquín, una zona de estepa cercana a la ciudad de S.C. de Bariloche (40° 53'40'' S 71° 02'12'' O). Seleccioné al azar diez nidos de *A. lobicornis* y colecté muestras de sus basureros, y a una distancia de al menos 2 m de cada nido colecté suelo desnudo. Junté las diez muestras de los basureros y las diez de suelo en una única muestra compuesta para cada sustrato (Farji-Brener, Lescano, & Ghermandi 2010). En un primer intento de ensayo, preparé macetas de 1.6 L con dos sustratos diferentes, el primero consistía en suelo control y el segundo en suelo control con una capa superficial de basurero de aproximadamente 3 cm y en cada maceta planté tres semillas de *E. californica*. Ninguna de las semillas plantadas en el sustrato con basurero logró emerger, debido a que se formó una costra dura y se desarrollaron hongos en la superficie. Por lo tanto, volví a plantar todas las semillas en macetas que tenían únicamente suelo control y en este caso, la emergencia de las plántulas fue exitosa. En las macetas que tenían más de una plántula, extraje las sobrantes para que quede un único individuo por maceta. Una vez que las plántulas alcanzaron alrededor de 10 cm, a la mitad de las macetas les agregué aproximadamente 3 cm de basurero. Por lo tanto, el número total de individuos fue 74, uno por maceta y 37 por tratamiento (Fig. 3). Regué todas las macetas regularmente. Como mencioné anteriormente, las plantas cultivadas en este experimento las empleé para evaluar cambios en los rasgos florales. Sin embargo, intenté repetir este experimento dos veces durante el 2016 y una vez durante el 2017, para evaluar el efecto de los cambios en los rasgos florales sobre la visita de los polinizadores y el éxito reproductivo. Pero esto no fue posible, ya que todas las plántulas sembradas en el primer intento del 2016 murieron, posiblemente debido a las altas temperaturas del invernadero y casi ninguna de las plantas cultivadas en el segundo intento del 2016 y en el 2017 florecieron. Cabe destacar que el experimento del 2015 lo realicé en el invernadero perteneciente al Laboratorio Ecotono y las siembras del 2016 y 2017 en el invernadero perteneciente a INIBIOMA y al Jardín Botánico.



1
2 **Figura 3:** Plantas de *E. californica* creciendo en el invernadero sobre suelo desnudo
3 proveniente de la estepa con y sin agregado de basurero de la hormiga cortadora de hojas *A.*
4 *lobicornis*, flechas roja y azul respectivamente.

5
6 *Trabajo de campo: diseño general*

7 El trabajo de campo lo realicé en la región del Monte austral entre las localidades de
8 Arroyito (39°50'S, 68°35' O) y Villa El Chocón (39°17'S, 68°55'O), en la provincia de
9 Neuquén, Argentina. Durante tres temporadas de floración (2015, 2016 y 2017). Previo a
10 cada temporada, realicé una búsqueda preliminar de plantas adultas con polinización biótica
11 que se encontraran creciendo sobre basureros (B, de aquí en más) de colonias activas de *A.*
12 *lobicornis* y seleccioné las especies que encontré con mayor frecuencia (i.e., *L. divaricata*,
13 *M. aphylla* y *G. chiloensis*) y marqué plantas de estas especies. Los basureros debían
14 cumplir con los siguientes requisitos: 1) estar por debajo de la copa de los arbustos, para
15 garantizar el acceso de las raíces a los nutrientes lixiviados 2) estar en uso activo por las
16 colonias, para asegurar que los nutrientes no hayan sido lixiviados en las temporadas
17 anteriores y 3) tener un tamaño mínimo de 70 cm de diámetro, para garantizar que las
18 plantas tuvieran acceso al mismo desde hace por lo menos tres a cuatro meses previos a la
19 floración. Cada vez que marcaba una planta creciendo sobre un basurero, seleccioné un
20 individuo co-específico creciendo sobre suelo desnudo o “control” (S, de aquí en más), a
21 una distancia de entre 4 a 11 m de la misma. Los individuos caracterizados como “control”

1 debían tener un tamaño vegetativo y un entorno (i.e., plantas vecinas, cercanía al agua, etc.)
2 similar a la planta creciendo sobre basurero (Fig. 4). El total de parejas basurero-suelo
3 control marcadas dependió de la abundancia de plantas encontradas creciendo en basureros,
4 en el sitio de estudio. Finalmente, el total de parejas basurero-suelo fue 31 para *L.*
5 *divaricata*, 16 para *M. aphylla* y 20 para *G. chiloensis*. Durante la temporada 2016, colecté
6 muestras de suelo y de basurero de abajo de 9 y 10 parejas marcadas de *L. divaricata* y *G.*
7 *chiloensis*, respectivamente para medir la concentración de algunos nutrientes (fósforo,
8 potasio, nitrógeno y carbono). Los análisis fueron realizados por el Grupo de Suelos de la
9 Universidad Nacional del Comahue.



1
2 **Figura 4:** Arbustos de *L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chiloensis* creciendo sobre basureros
3 de *A. lobicornis* en el Monte austral (a, c y e, respectivamente) y al lado, individuos co-específicos
4 creciendo sobre suelo control (b, d y f).

5
6 *Rasgos florales*

7 Los rasgos florales que evalué y la forma en que los estimé fueron elegidos en base a lo que
8 consideré más adecuado según las características particulares de cada especie. Por otra
9 parte, en todas ellas intenté extraer néctar usando un microcapilar para medir su volumen y
10 concentración de azúcares, pero los intentos fueron vanos en todos los casos. En la

1 bibliografía *E. californica* está reportada como no productora de néctar (Cook 1962) y para
2 *G. chiloensis* no encontré ningún trabajo en el que hayan evaluado la producción de néctar.
3 Por otra parte, *L. divaricata* ha sido reportada como productora de néctar en poblaciones de
4 la región norte del Monte (Simpson *et al.* 1977), sin embargo, en este sitio ya se habían
5 realizado intentos de extracción de néctar sin ningún éxito (Tadey, comunicación personal).
6 Respecto a *M. aphylla*, esta especie puede producir aceites y néctar como recompensa para
7 los polinizadores, pero la predominancia de una u otra sustancia es variable en su
8 distribución (Ferreiro *et al.* 2015) y en este sitio fue reportada como no productora de
9 néctar (Tadey 2011).

10

11 *E. californica* (invernadero)

12 Siete meses después de sembrar las semillas, inició la temporada de floración. En
13 cada planta medí, el tamaño y forma de la flor utilizando métodos de morfometría
14 geométrica. Este método permite el análisis de formas de estructuras biológicas, a partir de
15 una configuración de coordenadas cartesianas de puntos “landmarks” (Mitteroecker &
16 Gunz 2009). Tomé fotografías de todas las flores bajo condiciones estandarizadas para
17 evitar errores de co-planariedad y escala (Zelditch, Lundrigan, & Garland Jr. 2004). Corté
18 las flores y las pegué aplanadas en un cartón paralelo al lente de la cámara fotográfica. Por
19 otro lado, a nivel de cada planta registré: la duración de la floración (número de días entre
20 el primero y el último día con flores), producción total de flores y tamaño del despliegue
21 floral (i.e., número de flores abiertas por día) (Tab. 1).

22

23 *L. divaricata* y *M. aphylla* (campo)

24 Los rasgos florales para estas especies los analicé durante la temporada de floración
25 entre noviembre y diciembre, en los años 2015, 2016 y 2017 para *L. divaricata* y 2017 para
26 *M. aphylla*. Analicé la forma y el tamaño de la corola para ambas especies y la simetría
27 floral para *M. aphylla*, utilizando métodos de morfometría geométrica (MG). Colecté por
28 individuo aleatoriamente entre 6 a 10 flores recién abiertas o iniciando la maduración de las
29 anteras, para luego fotografiarlas. Al igual que para *E. californica*, saqué fotos de las flores
30 aplanadas bajo condiciones estandarizadas (Zelditch, Lundrigan, & Garland Jr. 2004). Las
31 fotos las saqué el mismo día que colecté las flores para evitar que se marchiten. Dado el

1 gran tamaño y la alta producción de flores de estos arbustos, estimé la producción total de
2 flores a partir de su densidad. Para esto, lo que hice fue sacar fotos a través de un marco de
3 cartón, con una ventana de superficie conocida (113 cm²) y conté el número total de flores
4 dentro de la ventana, incluyendo capullos, flores abiertas y senescentes y calculé la
5 densidad, como el n° flores/cm² (Apéndice 1). Saqué entre 6 y 10 fotos por individuo
6 dependiendo del tamaño de los mismos, de manera azarosa rodeando la planta de forma
7 espiral para abarcar diferentes alturas de la planta (Tab.1).

8

9 *G. chilensis* (campo)

10 Durante las temporadas de floración de 2016 y 2017 entre noviembre y diciembre,
11 estimé el tamaño de los capítulos a partir del diámetro medido de punta a punta de las
12 lígulas, utilizando un calibre digital de mano (± 1 mm) y medí la altura de la varilla floral
13 con un centímetro (± 0.5 cm). Registré el tamaño del despliegue floral (n° capítulos abiertos
14 al mismo tiempo) y conté el número total de capítulos producidos a lo largo de la
15 temporada. Además, en la temporada de 2017 evalué la fenología floral contando el número
16 de capullos, capítulos abiertos y senescentes una vez por semana a lo largo de toda la
17 floración que duró alrededor de cinco semanas (Tab.1).

18

19 *Observación visita polinizadores* (campo)

20 Para las tres especies evaluadas a campo, realicé observaciones de visitas de
21 polinizadores durante las mismas temporadas en las cuales evalué los rasgos florales.
22 Realicé observaciones por períodos de 10 min. por individuo durante las horas de mayor
23 actividad forrajera de los polinizadores (entre las 10 y 15 hs, aprox.). Realicé de una a
24 cuatro observaciones por planta a lo largo de la floración. Inmediatamente después de
25 observar un individuo, realizaba la observación de su par (i.e., B-S). Solo realicé los
26 registros de visitas los días en los que ambos integrantes de la pareja tenían flores abiertas.
27 Consideré como polinizador efectivo sólo a aquellos visitantes que se posaron sobre las
28 flores durante más de cinco segundos y mantuvieron contacto con las estructuras
29 reproductivas. Registré el número de visitas, la riqueza de visitantes (número de especies) y
30 el tamaño del despliegue floral (n° de flores abiertas) en el momento de la observación. La
31 identificación de los polinizadores para el registro de riqueza, la realicé visualmente

1 durante la observación de las visitas. Para conocer la comunidad de polinizadores presente
 2 y facilitar la identificación, capturé individuos en vuelo con una red aérea y coloqué
 3 trampas de aguas distribuidas al azar, coloqué los individuos capturados en una caja
 4 entomológica y los clasifiqué taxonómicamente en grandes grupos (i.e., Orden y Familia).
 5 Para estimar el tamaño del despliegue floral en *L. divaricata* y *M. aphylla* usé el método de
 6 densidad y para *G. chilensis* conté el número total de capítulos abiertos (Tab.1).

7

8 *Producción de frutos y semillas*

9 Aproximadamente dos meses después de finalizada la floración de *L. divaricata* y
 10 *M. aphylla* -cuando los frutos estuvieron maduros- estimé la producción de frutos y
 11 semillas durante las mismas temporadas que evalué los rasgos florales y la tasa de visita de
 12 polinizadores. Para *L. divaricata* y *M. aphylla* apliqué el mismo método de densidad que
 13 utilicé para medir la producción de flores (i.e., n° de frutos/cm²). Para estas especies calculé
 14 la producción de frutos como la proporción de flores que formaron frutos (n° de frutos/ n°
 15 de flores). Las flores de *L. divaricata* pueden formar frutos con ninguna hasta cinco
 16 semillas (Marco *et al.* 2000) por lo tanto, colecté los frutos para calcular la producción de
 17 semillas por flor, que lo estimé como: n° semillas/ (5* n° frutos). Las flores de *M. aphylla*
 18 sólo forman fruto si están fecundadas y cada fruto posee una única semilla, por lo tanto, en
 19 este caso la producción de semillas es igual a la producción de frutos (Tab.1). Para *G.*
 20 *chilensis* durante la temporada 2016, aproximadamente un mes después de finalizada la
 21 floración, colecté los capítulos para contar el número de frutos (aquenios) formados. Dado
 22 que el número de flores esta correlacionado con el tamaño del disco del capítulo, para
 23 estimar la producción de frutos por flor, utilicé la siguiente ecuación: n° de frutos/ diámetro
 24 del disco (Tadey *et al.* 2009) (Tab.1).

25

Especie	Rasgos medidos	Método o estimador	Temporada floración
<i>E. californica</i> (n = 37)	forma flor	MG	2015
Invernadero	tamaño flor	MG	2015

	duración floración	n° de días entre el primero y el último día en flor	2015
	producción flores	n° total de flores	2015
	despliegue floral	n° flores abiertas el mismo día	2015
<i>L. divaricata</i> (n = 31)	forma flor	MG	2015, 2016 y 2017
Campo	tamaño flor	MG	2015, 2016 y 2017
	producción de flores	densidad (n° flores/cm ²)	2015, 2016 y 2017
	producción de frutos por flor	n° de frutos/ n° de flores	2015, 2016 y 2017
	producción de semillas por fruto	n° semillas/(5* n° frutos)	2015, 2016 y 2017
	visita polinizadores	observación 10'	2015, 2016 y 2017
<i>M. aphylla</i> (n = 16)	forma flor	MG	2017
Campo	simetría	MG	2017
	tamaño flor	MG	2017
	producción de flores	densidad (n° flores/cm ²)	2017
	producción de frutos por flor	n° de frutos/ n° de flores	2017
	visita polinizadores	observación 10'	2017
<i>G. chilensis</i> (n = 20)	producción de flores	total inflorescencias	2016 y 2017
Campo	tamaño capítulo	Diámetro	2016 y 2017
	altura capítulo	largo varilla floral	2016 y 2017
	despliegue floral	n° de capítulos abiertos el mismo día	2016 y 2017
	fenología floral	n° de capullos, capítulos abiertos y senescentes por semana	2017

	producción de frutos por flor	nº semillas/diámetro capítulo	2016
	visita polinizadores	observación 10'	2016 y 2017

1

2

3

4

5

6

Tabla 1: Resumen de los rasgos estimados y observaciones realizadas para *E. californica*, *L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chiloensis*. n es el número total de pares basurero-control y MG es análisis de morfometría geométrica.

7

8

9

10

11

Análisis de datos

Para comparar la concentración de fósforo (P), potasio (K), nitrógeno (N), carbono (C) y el ratio C:N entre ambos sustratos, realicé un análisis de varianza multivariado (MANOVA) con el sustrato (B y S) como factor fijo. Probé normalidad y homogeneidad de varianzas con una prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente, utilizando el paquete estadístico “mvnormtest” para R.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

Para comparar los cambios en la forma y el tamaño de las flores producidas por plantas de *E. californica*, *L. divaricata* y *M. aphylla* creciendo sobre basureros y sobre suelo control, apliqué métodos de morfometría geométrica (MG). Este método se basa en la representación bi o tridimensional de la forma de estructuras biológicas, a través de una configuración de las coordenadas cartesianas de puntos “landmarks” (Mitteroecker & Gunz 2009). Esta técnica permite el análisis estadístico de la forma de la flor independientemente de su orientación, posición y tamaño, basándose en un método de superimposición de Procrustes (Rohlf & Marcus 1993). Las técnicas de MG, además, permiten explorar las variaciones de la simetría bilateral evaluando las diferencias entre ambas mitades definidas por el eje de simetría. Para una población, las variaciones de la simetría pueden evaluarse intra o inter individuo. La asimetría direccional (AD) se refiere al desarrollo consistentemente diferente entre ambos lados de una estructura, es la diferencia promedio entre el lado derecho e izquierdo. Mientras que la asimetría fluctuante (AF), es la diferencia azarosa entre el lado derecho e izquierdo de una estructura y está asociada a las condiciones ambientales, como podría ser la concentración de nutrientes en el suelo (Klingenberg 2015). Para representar la forma de la flor, para cada una de las especies elegí la configuración de “landmarks” (LMs) que mejor representara la forma de sus flores. La

1 configuración para *E. californica* estaba compuesta por 16 LMs, la de *L. divaricata* por 25
2 LMs y la de *M. aphylla* por 20 LMs (Apéndice 2). Para la digitalización de los LMs en los
3 especímenes (flores) y para los análisis de la morfometría usé los softwares gratuitos
4 tpsDigver 2 y MorphoJ 1.06 d (Klingenberg 2011), respectivamente. Como estimador de
5 tamaño, utilicé el “centroid size” (CS), definido como la raíz cuadrada de la suma de las
6 distancias al cuadrado de cada LM al centroide de la flor (Mitteroecker & Gunz 2009). Para
7 detectar posibles efectos de alometría (cambios de la forma debido al tamaño), apliqué un
8 modelo de regresión multivariada de la forma (i.e., coordenadas LMs) en función del
9 tamaño (i.e., CS) (Monteiro 1999; Klingenberg *et al.* 2012). Para describir el patrón de
10 dispersión de las formas de las flores producidas por plantas creciendo sobre B y S, utilicé
11 un Análisis de Componentes Principales (PCA) (Klingenberg 2011) y utilicé un análisis
12 discriminante para detectar diferencias estadísticas entre las flores producidas por plantas
13 creciendo en ambos sustratos (Campbell & Atchley 1981). Para las flores de *M. aphylla*
14 también analicé simetría fluctuante (AF), para lo cual definí un eje de simetría bilateral que
15 iba desde el LM 4 hasta el 14. Apliqué un ANOVA de Procrustes, siendo los individuos y
16 los lados (derecho e izquierdo) los factores del análisis. La asimetría fluctuante está
17 representada por la interacción de los factores individuo y lado (Klingenberg & McIntyre
18 1998). Las variaciones de la simetría las evalué para las plantas creciendo sobre los
19 basureros y sobre suelo control por separado (Benítez, Vargas, & Püschel 2015).

20

21 *E. californica* (invernadero)

22 Para comparar el efecto de los basureros sobre el tamaño de la flor (CS), la
23 producción total de flores y el largo de la temporada de floración realicé un Análisis
24 Multivariado de la Varianza (MANOVA), siendo el tipo de sustrato (basurero y suelo) el
25 factor fijo. Probé los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza con las pruebas
26 de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Para analizar el efecto del sustrato sobre el
27 tamaño del despliegue floral a lo largo de la floración, usé un análisis de varianza de
28 medidas repetidas (ANOVA), para lo cual promedié del tamaño del despliegue por semana,
29 desde la segunda semana de octubre hasta la primera de abril.

30

31 *L. divaricata* (campo)

1 Para comparar el efecto de los basureros sobre los otros rasgos florales medidos y la
2 producción de frutos por flor realicé un modelo lineal mixto. En el cual, el tamaño de la
3 flor, la producción de flores y de frutos fueron las variables respuesta, el sustrato (B y S) el
4 factor fijo y el año (2015, 2016 y 2017) el factor aleatorio. Para comparar la producción de
5 semillas por fruto apliqué un modelo lineal generalizado mixto con distribución binomial
6 utilizando el paquete estadístico “lme4” para R. En el modelo el sustrato (B y S) fue el
7 factor fijo, el año (2015, 2016 y 2017) el factor aleatorio y la producción de semillas la
8 variable respuesta.

9
10 *M. aphylla* (campo)

11 Para esta especie, que sólo observé en la temporada 2017, comparé el tamaño de la
12 flor, la producción de flores y frutos por flor mediante un Análisis Multivariado de la
13 Varianza (MANOVA), siendo el sustrato el factor explicativo. Probé normalidad y
14 homogeneidad de varianzas con las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente.

15
16 *G. chiloensis* (campo)

17 Para comparar el efecto de los basureros sobre el tamaño del capítulo, el largo de la
18 varilla floral y la producción total de capítulos a lo largo de toda la temporada, realicé un
19 modelo lineal mixto con el sustrato (B y S) como factor fijo y el año (2016 y 2017) como
20 aleatorio. Para analizar el efecto de los basureros sobre la fenología floral (nº de capítulos
21 abiertos por semana), apliqué un ANOVA de medidas repetidas. Para comparar la
22 producción de frutos por flor en la temporada 2016 entre plantas creciendo sobre basurero y
23 sobre suelo, realicé una prueba t pareada.

24
25 *Visita polinizadores*

26 Para comparar el número de visitantes florales entre ambos sustratos, estimé la
27 distribución de ésta variable, a través de un test de bondad de ajuste utilizando el paquete
28 “vcd” para R. Luego, apliqué dos modelos lineales generalizados mixtos con distribución
29 Binomial negativa, utilizando el paquete “glmmADMB” para R y los comparé en base al
30 criterio de Akaike (AIC). Estos modelos incluyeron el número de visitantes florales como
31 variable respuesta, el sustrato (B y S) como efecto fijo, el año (2015, 2016 y 2017) y la

1 especie (*L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chilensis*) como efectos aleatorios y sólo uno de
2 ellos poseía el tamaño del despliegue floral como predictor lineal. Para las parejas de
3 plantas en las que realicé más de una observación y promedie los datos, redondeé los
4 decimales para sólo utilizar números enteros dado que la distribución Binomial negativa no
5 admite números decimales. Debido a que el tamaño del despliegue floral (n° de flores
6 abiertas) no lo estimé de la misma manera en las tres especies de arbustos (para *L.*
7 *divaricata* y *M. aphylla* lo estimé a partir de la densidad y en *G. chilensis* conté el número
8 total de flores), en el modelo utilicé esta variable estandarizada.

9 Para analizar los datos de riqueza de visitantes también realicé un test de bondad de
10 ajuste utilizando el paquete “vcd” para R. En este caso, apliqué dos modelos generalizados
11 mixtos con distribución Poisson usando el paquete para R “lme4” y también, los comparé
12 usando el criterio de Akaike (AIC). Estos modelos incluyeron la riqueza de polinizadores
13 como variable respuesta, el sustrato (B y S) como efecto fijo, el año (2015, 2016 y 2017) y
14 la especie (*L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chilensis*) como efectos aleatorios y como en el
15 caso anterior, uno de los modelos incluyó el tamaño del despliegue floral como predictor
16 lineal. Adicionalmente, para poder comparar la riqueza de polinizadores a igual número de
17 visitantes recibidos, realicé una curva de rarefacción para cada sustrato por separado,
18 utilizando el software EstimateS versión 9.1.0 (Colwell, Mao, and Chang 2004).

19

20 **Resultados**

21

22 La concentración de nutrientes en los basureros fue varias veces mayor que en el
23 suelo control MANOVA, Wilk’s $\lambda = 0.2$, $F_{(1, 36)} = 38.5$, $P < 0.001$). En promedio la
24 concentración de carbono fue 63.4 veces mayor en los basureros que en el suelo control, la
25 de nitrógeno 80 veces mayor, la de fósforo 35.9 veces y el potasio 28.8 veces mayor. Por
26 otra parte, el ratio C:N fue similar entre ambos sustratos (Tab. 2).

27

28

29

30

31

	Suelo control	Basurero	<i>F</i>	<i>P</i>
C (%)	0.34 ± 0.03	21.56 ± 2.14	98.4	<0.001
N (%)	0.03 ± 0.00	2.4 ± 0.42	31.8	<0.001
P (µg g ⁻¹ sustrato)	6.22 ± 1.1	223.5 ± 29.1	55.7	<0.001
K (g kg ⁻¹ sustrato)	0.17 ± 0.01	4.9 ± 0.47	103.5	<0.001
C:N	13.27 ± 1.27	12.11 ± 0.9	0.84	0.37

1

2 **Tabla 2:** Promedio de las concentraciones de nutrientes y del ratio C:N ± los errores
3 estándares de los basureros de *A. lobicornis* y de suelo control. C, N, P y K son carbono, nitrógeno,
4 fósforo y sodio, respectivamente. *F* y *P* corresponden los resultados univariados del análisis de
5 varianzas multivariado (MANOVA).

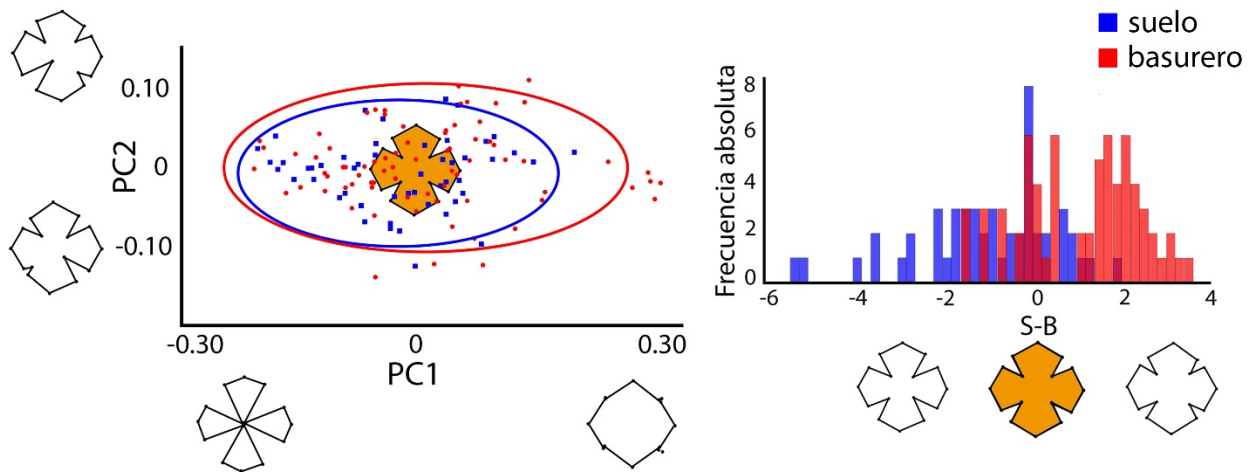
6

7 *Rasgos florales*

8 *E. californica* (invernadero)

9 La temporada de floración inició en octubre del 2015 y finalizó en abril del 2016, el
10 100% y el 85% de los individuos creciendo sobre basurero y suelo control,
11 respectivamente, produjeron al menos una flor a lo largo de la temporada. Para el análisis
12 del tamaño y forma aplicando métodos de morfometría geométrica obtuve 75 fotos de
13 flores pertenecientes a 32 plantas creciendo sobre basurero y 51 de flores producidas por 27
14 individuos creciendo sobre suelo control. Las flores de las plantas creciendo sobre
15 basureros fueron más grandes que las flores de plantas sobre suelo control ($F_{(1,52)} = 6.8$, P
16 = 0.01, Fig. 6a). El 12.3 % de la variación total de la forma de las flores fue explicado por
17 efecto de la alometría, por lo tanto, los análisis siguientes usé los residuales de la regresión
18 para evitar el efecto alométrico (Klingenberg & Marugán-Lobón 2013) En el análisis PCA,
19 los primeros dos ejes explicaron el 70% de la variación (59% y 11%, respectivamente). A
20 lo largo del eje 1, la variación de la forma de la flor estuvo asociada a variaciones en la
21 posición de los LMs ubicados en la intersección de los pétalos (i.e., LMs= 2, 4, 6 y 8; Fig.
22 5a). Hacia la izquierda del eje 1, los LMs 2, 4, 6 y 8 estaban cercanos al centroide de la
23 forma, mientras que hacia la derecha los LMs se ubicaron cercanos al perímetro de la flor
24 (Fig. 5a). A lo largo del eje 2, la forma varió inconsistentemente sin ningún patrón claro
25 (Fig. 5a). Además, las formas de las flores producidas por plantas sobre los basureros
26 mostraron mayor variación que aquellas producidas por plantas control (Fig. 5a). A pesar
27 de algunas superposiciones, las flores de plantas sobre los basureros mostraron formas

1 diferentes a las flores de plantas control ($T^2 = 60.4$, $P = 0.03$, Fig. 3b). Además, algunas de
 2 las formas se encontraron solo en uno de los dos sustratos (Fig. 5b). En general, las flores
 3 de plantas creciendo sobre suelo control poseían los LMs de la intersección de los pétalos
 4 más cercanos al centroide que las flores de plantas creciendo en basureros (Fig. 5b).
 5

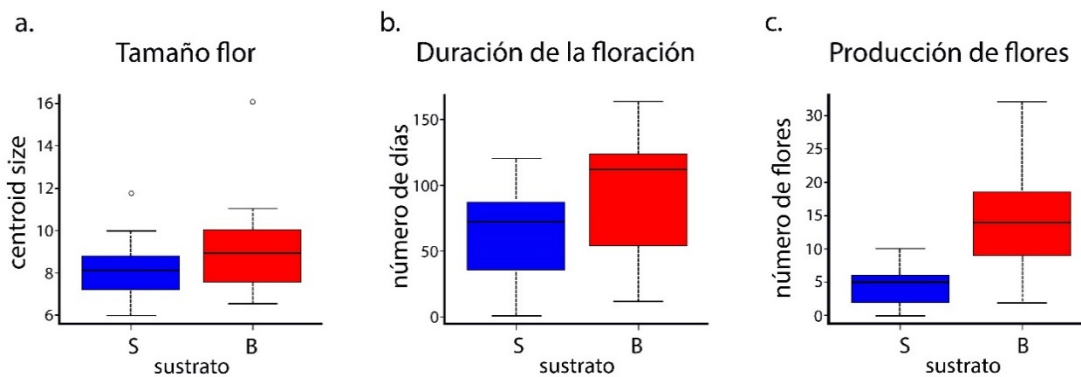


6
 7 **Figura 5:** a) Diagrama de dispersión de los primeros dos Componentes Principales que
 8 explican el 70% (59% y 11%, respectivamente) de la variación de la forma de la flor de *E.*
 9 *californica*, creciendo sobre basureros de *A. lobicornis* (puntos rojos) y sobre suelo control
 10 (cuadrados azules). Las elipses rojas representan el intervalo de confianza del 95 % para las flores
 11 producidas por plantas sobre basureros y las azules por plantas sobre suelo. b) Histograma que
 12 muestra la frecuencia absoluta en la cual se encuentran las diferentes formas florales en *E.*
 13 *californica* creciendo sobre los basureros (barras rojas) y sobre suelo (barras azules). En ambos
 14 gráficos, los esquemas florales por debajo de los ejes representan la variación de la forma en los
 15 extremos de los mismos y los esquemas anaranjados representan la forma consenso o promedio para
 16 la población.

17

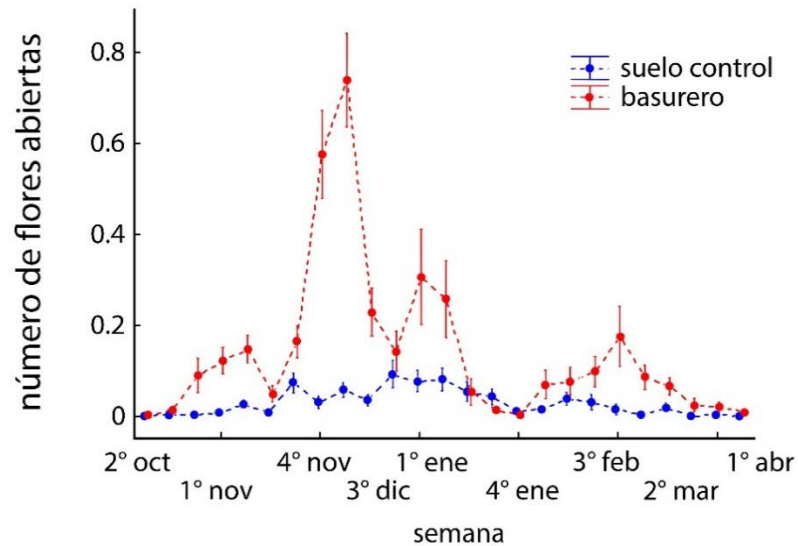
18 La adición de basura de la hormiga cortadora *A. lobicornis* afectó todos los rasgos
 19 florales medidos a nivel planta (MANOVA, Wilk's $\lambda = 0.47$, $F_{(3, 52)} = 18.5$, $P < 0.001$). Las
 20 plantas creciendo sobre basureros mostraron despliegues florales de mayor tamaño (i.e.,
 21 mayor n° de flores abiertas por día; $F_{(1, 70)} = 53.9$, $P < 0.001$, Fig. 7), una temporada de
 22 floración más larga ($F_{(1, 52)} = 7.9$, $P < 0.01$, Fig. 6b) y mayor producción de flores que
 23 plantas control ($F_{(1, 52)} = 39.8$, $P < 0.001$, Fig. 6d). Las plantas sobre los basureros

1 produjeron despliegues florales mayores durante cuatro intervalos de la floración ($F_{\text{sem. (24, 70)}} = 16.5, P < 0.001$, Fig. 7). Hubo una interacción entre el sustrato y los intervalos de la
2 $70) = 16.5, P < 0.001$, Fig. 7). Hubo una interacción entre el sustrato y los intervalos de la
3 temporada de floración (i.e. semana) ($F_{(24, 70)} = 12.3, P < 0.001$), las plantas sobre
4 basureros mostraron cuatro picos prominentes de floración, mientras que los despliegues de
5 las plantas control fueron constantes a lo largo de la temporada (Fig. 7).
6



7
8 **Figura 6:** Boxplots representando a) el tamaño de la flor; b) la duración de la floración y c)
9 la producción de flores de plantas de *E. californica* creciendo sobre suelo control (S, cajas azules) y
10 sobre basureros (B, cajas rojas). La línea central representa la mediana, los límites inferior y
11 superior representan los cuartiles del 25 y 75 %, respectivamente. Las líneas verticales representan
12 los valores mínimos y máximos y los puntos los valores extremos.

13
14



1
 2 **Figura 7:** Promedio del tamaño del despliegue floral \pm el error estándar de plantas de *E. californica*
 3 creciendo sobre los basureros de *A. lobicornis* (puntos rojos) y sobre suelo (puntos azules), a lo
 4 largo de la temporada de floración. El tamaño del despliegue floral fue definido como el número de
 5 flores abiertas en el mismo día.

6
 7 *L. divaricata* (campo)

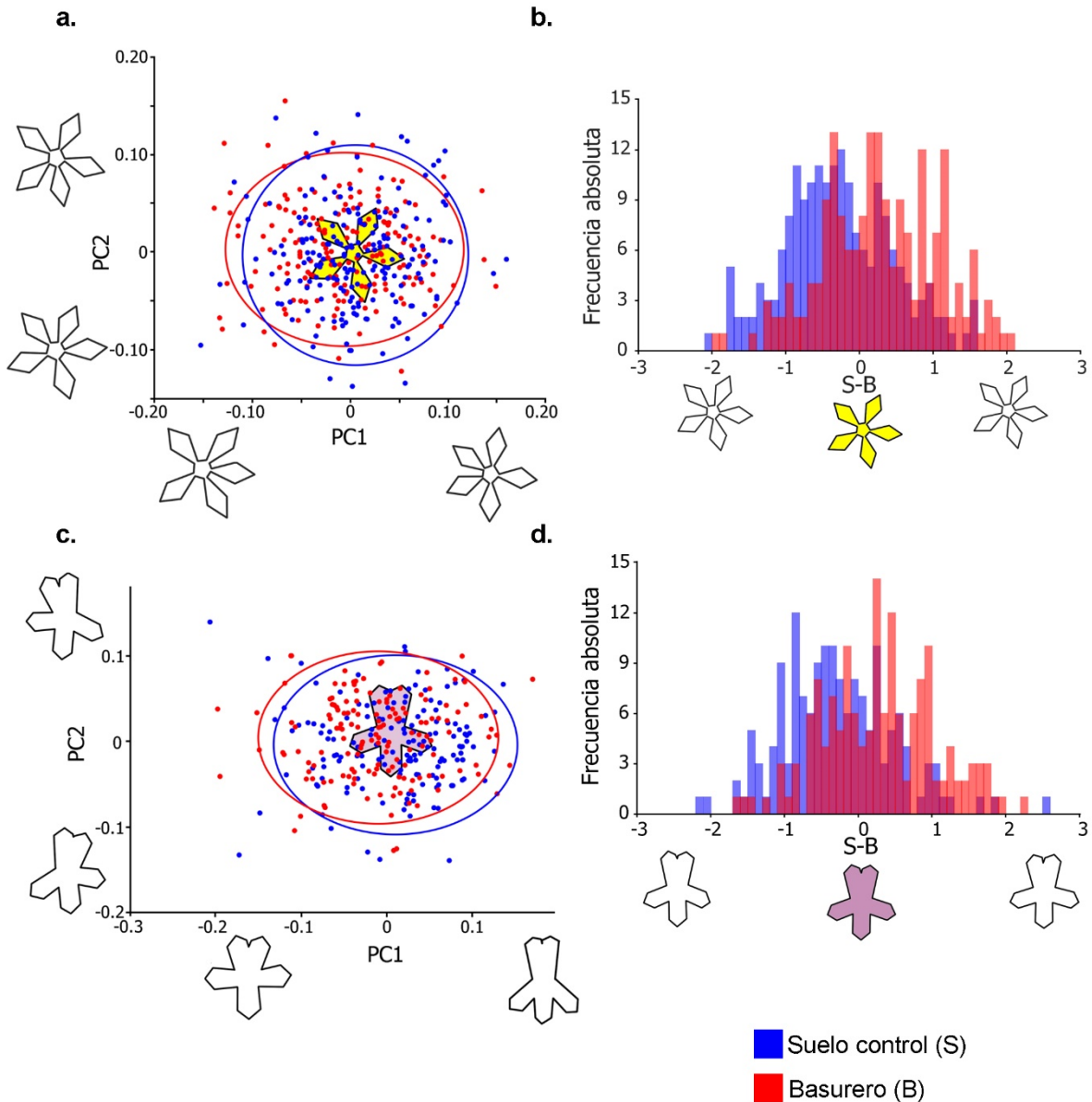
8 Para el análisis de la forma y el tamaño de las flores en función del sustrato (B y S),
 9 obtuve fotografías digitales de 192 flores producidas por 22 plantas creciendo sobre
 10 basureros y de 189 flores de 22 plantas sobre suelo control. El tamaño de las flores no
 11 estuvo afectado por el sustrato ($F_{(1,55)} = 0.11, P = 0.74$). Las variaciones del tamaño (CS)
 12 de la flor explicaron las variaciones de la forma en un porcentaje muy bajo (1.2 %, $P <$
 13 0.001). Por lo tanto, para el análisis de la forma usé los datos originales y no los residuales
 14 de la regresión múltiple (forma vs tamaño), cómo suele hacerse cuando no hay un efecto
 15 alométrico considerable (Monteiro 1999; Klingenberg *et al.* 2012). La dispersión de la
 16 forma de la flor estuvo explicada en un 40% por los primeros dos ejes del PCA (22% y
 17 18%, respectivamente). A lo largo de ambos ejes, las variaciones de la forma se observaron
 18 principalmente en la distancia de separación entre pétalos adyacentes (Fig. 8a). Sin
 19 embargo, las dispersiones de las formas correspondientes a ambos sustratos mostraron altos
 20 niveles de superposición en el espacio multi-dimensional. En consecuencia, las plantas
 21 creciendo sobre ambos sustratos no se separaron en dos grupos diferentes por las
 22 diferencias en la forma de sus flores ($T^2 = 55.4, P = 0.4$, Fig. 8b). Por otro lado, la

1 producción de flores y de frutos fue similar entre plantas creciendo en ambos sustratos
2 ($F_{flores (1,57)} = 0.01, P = 0.9$) y ($F_{frutos (1,56)} = 0.16, P = 0.68$). En cambio, la producción de
3 semillas por fruto fue levemente mayor en las plantas creciendo en basureros ($Z = -5.52, P$
4 $< 0.001, X_B = 0.44 \pm 0.14$ y $X_S = 0.37 \pm 0.06$, siendo X las medias \pm el error estándar para
5 basureros y suelo, respectivamente)

6

7 *M. aphylla* (campo)

8 En este caso, para los análisis morfométricos obtuve fotografías digitales de 154
9 flores producidas por 16 plantas creciendo sobre basureros y de 157 flores de 16 plantas
10 sobre suelo control. El tamaño de las flores no estuvo afectado por el sustrato ($F_{(1,30)} =$
11 $0.04, P = 0.9$). El porcentaje de variaciones de la forma explicado por las variaciones del
12 tamaño (CS) también fue bajo (5.5 %, $p < 0.001$), por lo tanto, igual que para *L. divaricata*
13 usé los datos originales para los análisis de la forma. Los primeros dos ejes del PCA,
14 explicaron el 43% de la dispersión de la forma de la flor (28% y 15%, respectivamente). A
15 lo largo del eje 1, las variaciones de la forma se observaron principalmente en el ángulo (α)
16 que forman los pétalos laterales con el inferior y en la separación entre los dos pétalos
17 superiores. Tanto la separación entre los pétalos superiores y α , decrecieron de izquierda a
18 derecha (Fig. 8c). A lo largo del eje 2, la variación se observó en los pétalos superiores; en
19 el extremo inferior del eje estos pétalos estuvieron ladeados hacia la derecha y en el
20 extremo superior hacia la izquierda (Fig. 8c). La dispersión de la forma de las flores
21 producidas por plantas sobre B estuvo bastante superpuesta con las de la planta control. En
22 consecuencia, las flores producidas por ambos sustratos no se separaron en dos grupos
23 diferentes ($T^2 = 45.3, P = 0.3$, Fig. 8d). Las flores de las plantas creciendo sobre suelo
24 control (S) y sobre basurero (B), mostraron asimetría direccional (siendo, $F_{(18)} = 3.8, P <$
25 0.0001 y $F_{(18)} = 2.3, P = 0.002$, los valores estadísticos para S y B respectivamente) pero
26 no asimetría fluctuante (siendo, $F_{(270)} = 1.03, P = 0.4$ y $F_{(270)} = 1.1, P = 0.3$, los valores
27 estadísticos para S y B respectivamente). Adicionalmente, la producción de flores y frutos
28 por flor fue similar en plantas creciendo en los diferentes sustratos ($F_{(1,30)} = 0.74$, y $F_{(1,3)} =$
29 $1.8, P = 0.2$ y 0.4 , respectivamente).



1
2 **Figura 8:** a) Diagrama de dispersión de los primeros dos Componentes Principales que
3 explican el 40% (22% y 18%, respectivamente) de la variación de la forma de la flor de *L.*
4 *divaricata*; b) histograma que muestra la frecuencia absoluta en la cual se encuentran las diferentes
5 formas florales en *L. divaricata*; c) diagrama de dispersión de los primeros dos Componentes
6 Principales que explican el 43% (28% y 15%, respectivamente) de la variación de la forma de la
7 flor de *M. aphylla* y d) histograma que muestra la frecuencia absoluta en la cual se encuentran las
8 formas de *M. aphylla*. En los diagramas de dispersión los puntos rojos y azules representan las
9 flores producidas por plantas creciendo sobre los basureros de *A. lobicornis* y suelo control,
10 respectivamente. Las elipses rojas representan el intervalo de confianza del 95 % para las flores

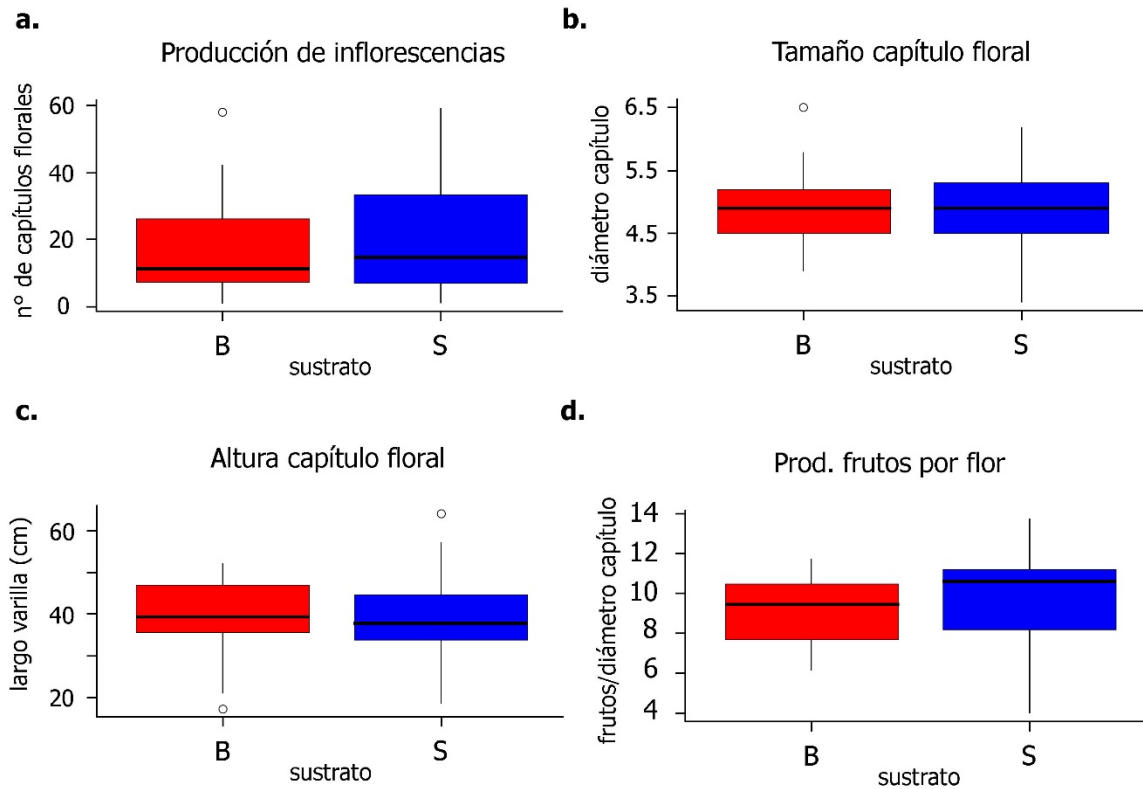
1 producidas por plantas sobre basureros y las azules por plantas sobre suelo. En los histogramas las
2 barras rojas y azules representan las flores producidas por plantas sobre basureros y sobre suelo,
3 respectivamente. Por otra parte, en todos los casos los esquemas florales por debajo de los ejes
4 representan la variación de la forma en los extremos de los mismos y los esquemas coloreados (i.e.
5 amarillo para *L. divaricata* y lila para *M. aphylla*) representan la forma consenso o promedio para la
6 población.

7

8 *G. chiloensis* (campo)

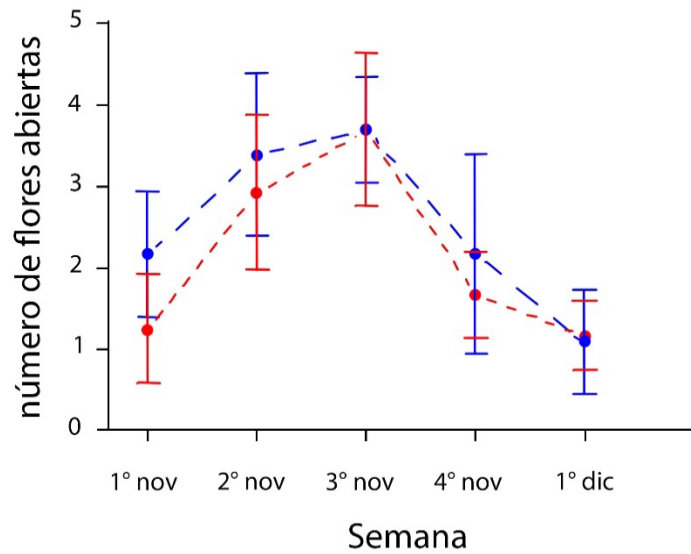
9 Ninguno de los rasgos florales medidos estuvo afectado por el tipo de sustrato. Las
10 plantas creciendo sobre ambos sustratos mostraron similar producción de capítulos ($F_{(1,45)}$
11 $= 0.33$, $P = 0.57$, Fig. 9a), tamaño de capítulo ($F_{(1,44)} = 0.14$, $P = 0.71$, Fig. 9b) y largo de
12 la varilla floral ($F_{(1,44)} = 0.004$, $P = 0.95$, Fig. 9c). La producción de capítulos para las
13 plantas creciendo sobre ambos sustratos fue similar a lo largo de toda la temporada de
14 floración ($F_{(5,18)} = 1.2$, $P = 0.4$). La segunda y tercera semana de floración fueron las de
15 mayor producción y abarcaron entre el 12 y 27 de noviembre y la de menor producción fue
16 la quinta semana, entre el 4 y 11 de diciembre (Fig. 10). La producción de frutos por flor
17 también fue similar para plantas creciendo sobre basurero y suelo control ($T_{(17)} = -0.6$, $P =$
18 0.56 , Fig. 9d).

19



1
2
3
4
5
6
7
8

Figura 9: Boxplots representando a) la producción de inflorescencias; b) el tamaño del capítulo floral; c) la altura del capítulo y d) la producción de frutos por flor de plantas de *G. chilensis* creciendo sobre basureros (B, cajas rojas) y sobre suelo control (S, cajas azules). La línea central representa la mediana, los límites inferior y superior representan los cuartiles del 25 y 75 %, respectivamente. Las líneas verticales representan los valores mínimos y máximos y los puntos los valores extremos. n° es número.



1
 2 **Figura 10:** Promedio del número de capítulos abiertos \pm el error estándar de plantas de *G.*
 3 *chiloensis* creciendo sobre los basureros de *A. lobicornis* (puntos rojos) y sobre suelo (puntos
 4 azules), a lo largo de la temporada de floración.

5
 6 *Visita polinizadores*

7 El tiempo total de observación fue 320 minutos para *M. aphylla*, 1340 para *L.*
 8 *divaricata* y 580 para *G. chiloensis*, divididos en partes iguales para plantas sobre basurero
 9 y suelo control. Las plantas de *L. divaricata* fueron visitadas principalmente por
 10 himenópteros de las familias Andrenidae, Anthophoridae, Apidae, Apinae, Colletidae y
 11 Vespidae y por dípteros. Las plantas de *G. chiloensis* fueron visitadas por coleópteros de la
 12 familia Buprestidae, dípteros de la familia Syrphidae y por himenópteros de las familias
 13 Apinae y Halictidae. Por otro parte, *M. aphylla* fue visitada mayormente por himenópteros
 14 de la familia Anthophoridae y en menor medida por dípteros. El modelo de mejor ajuste
 15 para evaluar el número de visitantes en función del sustrato, fue el que incluyó al tamaño
 16 del despliegue floral como predictor lineal, siendo 434.8 y 429.7 los valores AIC para los
 17 modelos con y sin predictor lineal, respectivamente. Por otra parte, el modelo de mejor
 18 ajuste para evaluar la riqueza de polinizadores no incluyó al tamaño del despliegue floral
 19 como predictor lineal, siendo 373.6 y 357.8 los valores AIC para los modelos sin y con
 20 predictor lineal, respectivamente. En base a los modelos seleccionados, el número y riqueza
 21 de visitantes florales fue similar entre plantas creciendo sobre basurero y sobre suelo

1 control (Tab. 3 y 4, Fig. 11). Asimismo, las curvas de rarefacción coinciden para plantas
 2 creciendo sobre basureros y suelo control (Apéndice 3).

3

Sustrato	Estimados	E.E	Z	P(> Z)
Suelo	1.23	0.49	0.42	0.67
Basurero	1.28	0.18	0.21	0.83

4

5 **Tabla 3:** Coeficientes estimados del modelo lineal generalizado mixto con distribución
 6 Binomial negativa, siendo el número de visitantes florales la variable explicada, el sustrato (i.e.,
 7 basurero y suelo) el efecto fijo, el año (i.e., 2015, 2016 y 2017) y las especies (*L. divaricata*, *M.*
 8 *aphylla* y *G. chiloensis*) las variables aleatorias y el tamaño del despliegue floral el predictor lineal.

9

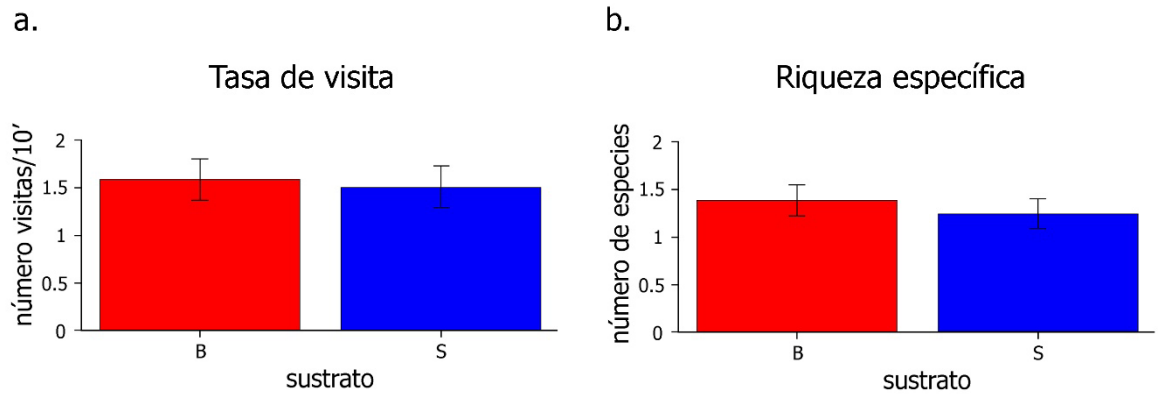
Sustrato	Estimados	E.E	Z	P(> Z)
Suelo	1.32	0.40	0.69	0.49
Basurero	1.47	0.15	0.69	0.49

10

11 **Tabla 4:** Coeficientes estimados del modelo lineal generalizado mixto con distribución
 12 Poisson, siendo la riqueza específica de polinizadores la variable explicada, el sustrato (i.e.,
 13 basurero y suelo) el efecto fijo y el año (i.e., 2015, 2016 y 2017) y las especies (*L. divaricata*, *M.*
 14 *aphylla* y *G. chiloensis*) las variables aleatorias.

15

16



1
2 **Figura 11:** Gráfico de barras representando a) la tasa de visita de polinizadores y b) la
3 riqueza específica de polinizadores que visitaron plantas de *L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chiloensis*
4 creciendo sobre los basureros de *A. lobicornis* y sobre suelo control.

5
6 **Discusión**

7 Los nutrientes del suelo tienen el potencial de afectar indirectamente el éxito
8 reproductivo de las plantas a través del aumento del atractivo floral, favoreciendo la
9 atracción de los polinizadores. Varios autores han demostrado el efecto positivo de
10 fertilizantes químicos sobre los rasgos florales, pero pocas veces se ha explorado el efecto
11 de fuentes naturales de nutrientes en condiciones naturales (Muñoz *et al.* 2005; Cardoza *et*
12 *al.* 2012). En este capítulo exploré cómo un fertilizante natural (i.e., basureros de hormigas
13 cortadoras de hojas) afecta los rasgos florales, la polinización y la reproducción de plantas
14 polinizadas por animales, mediante un enfoque experimental en invernadero y un enfoque
15 comparativo a campo. En plantas creciendo sobre basureros y suelo control, evalué varios
16 rasgos florales, como el tamaño y la forma, y también evalué la fenología floral. Además,
17 en el campo medí la tasa de visita de polinizadores y estimé el éxito reproductivo como la
18 producción de frutos por flor y semillas por fruto. Tal como lo esperaba, los basureros
19 acrecentaron los rasgos florales de *E. californica*, en el invernadero. Las plantas sobre los
20 basureros mostraron mayor variación de formas y produjeron flores 1.1 veces más grandes,
21 las floraciones fueron 1.5 veces más largas, produjeron 3.4 veces más flores y mostraron
22 despliegues florales más de 7 veces mayores que plantas sobre suelo control. Sin embargo,
23 en condiciones naturales no observé un patrón consistente del efecto del sustrato (i.e.,
24 basurero y suelo) sobre los rasgos florales ni sobre la visita de polinizadores en ninguna de
25 las tres especies observadas (i.e., *L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chiloensis*). Con respecto a

1 la producción de semillas sólo observé leves incrementos asociados a los basureros en
2 condiciones naturales en plantas de *L. divaricata*.

3 La concentración de los cuatro nutrientes medidos (C, N, P y K), fue varias veces
4 mayor en los basureros de las hormigas cortadoras que en el suelo control y el ratio C:N fue
5 similar (alrededor de 13) entre ambos sustratos. Estos nutrientes se los considera
6 macronutrientes porque son requeridos en grandes cantidades por las plantas y son los
7 principales limitantes del crecimiento, ya que cumplen funciones elementales (Jobbágy &
8 Jackson 2001; Evert & Eichhorn 2013). Por ejemplo, el N forma parte de las moléculas de
9 proteínas y aminoácidos, el potasio está involucrado en la ósmosis y apertura de los
10 estomas y el fósforo está involucrado en la obtención de energía (Evert & Eichhorn 2013).
11 Por otra parte, para que los nutrientes que llegan al suelo en forma orgánica puedan ser
12 aprovechados por las plantas, estos deben ser convertidos al estado inorgánico, a través del
13 proceso de mineralización (Robertson & Groffman 2007). En este sentido, la relación C:N
14 se utiliza como estimador de la calidad de la materia orgánica dado que, determina el
15 balance entre la mineralización y la inmovilización de N durante la descomposición
16 (Horwath 2007). En general se considera que suelos con un ratio mayor a 25 promueven la
17 inmovilización de N y un ratio menor a 25 la mineralización, favoreciendo la disponibilidad
18 de N inorgánico para la vegetación (Robertson & Groffman 2007). Por lo tanto, en base a
19 los valores C:N para suelo y basurero podemos decir que ambos sustratos estimulan la
20 mineralización por igual. Sin embargo, como la cantidad inicial de N en los basureros es
21 mayor, es esperable que la cantidad total disponible para las plantas sea también mayor en
22 los basureros. Estas características convierten a los basureros en verdaderas “islas de
23 fertilidad”, contribuyendo a la heterogeneidad en la distribución de los nutrientes, típicas de
24 los sistemas áridos (Aguilar & Sala 1999; Farji-Brener & Tadey 2009).

25 Las plantas de *E. californica* con agregado de basura de hormigas en condiciones
26 de invernadero produjeron flores con formas más diversas y mostraron flores y despliegues
27 florales de mayor tamaño y floraciones más extensas que plantas control. Todos estos
28 rasgos afectan potencialmente la tasa, composición del ensamble de polinizadores y el
29 comportamiento forrajero de los mismos, con posibles consecuencias sobre la reproducción
30 de las plantas. Los himenópteros, que son los principales polinizadores de esta especie
31 (Cook 1962), usualmente responden a cambios en estas características de las flores. Por

1 ejemplo, pueden detectar variaciones intra-específicas de la forma de la flor, y sus
2 preferencias sobre las mismas varían entre los diferentes grupos funcionales (Gómez *et al.*
3 2008b). En general, las flores producidas por plantas sobre basureros tenían pétalos de
4 mayor área con espacios inter-pétalos menores otorgándole a la flor una forma más
5 esférica, mientras que las flores de las plantas sobre suelo mostraron una forma más
6 estrellada (Fig. 5). La forma más esférica podría representar una señal más visible a larga
7 distancia para los polinizadores que la forma estrellada, favoreciendo la frecuencia de
8 visitas. Por otro lado, los himenópteros suelen ser más atraídos por las flores y despliegues
9 florales de mayor tamaño, posiblemente porque éstos despliegues son más conspicuos y
10 generan mayor impacto visual, aparte de ofrecer mayor cantidad de recompensas que los
11 más pequeños reduciendo el costo energético del forrajeo (Eckhart 1991; Ohara & Higashi
12 1994; Johnson, Delph, & Elderkin 1995; Martin 2004). Asimismo, la mayor producción de
13 flores a lo largo de una floración más extendida puede aumentar la efectividad de la
14 polinización a través de la visita de un rango mayor de abundancia y riqueza de visitantes
15 florales (Herrera 1988; Fishbein & Venable 1996; Bosch *et al.* 1997). Lamentablemente, no
16 pude registrar la visita de polinizadores en condiciones de invernadero, ya que removí las
17 flores para fotografiarlas para los análisis morfométricos y no fue posible repetir el
18 experimento en las temporadas siguientes. Sin embargo, se conoce que los rasgos que
19 analicé mejoran la atracción de los polinizadores y el éxito reproductivo de las plantas
20 (Herrera 1993; Grindeland *et al.* 2005). Sería interesante complementar estos resultados de
21 invernadero con observaciones de campo para confirmar si los cambios en los rasgos
22 florales afectan la polinización y la adecuación de esta especie.

23 En condiciones naturales, el crecer sobre basureros de hormigas no modificó las
24 significativamente las características florales ni incrementó la producción de flores y frutos
25 por flor. En general, la forma de la flor se mantuvo más conservada, dentro de cada especie
26 y entre sustratos, ya que *L. divaricata* y *M. aphylla* mostraron poca variación en este
27 carácter. En *L. divaricata* la escasa variación encontrada parece deberse, por su aspecto, a
28 potenciales errores de la técnica cometidos al acomodar las flores para sacar las fotos. Ya
29 que, como los pétalos no están fusionados entre sí fue difícil acomodarlos radialmente y
30 equidistantes. En cambio, en *M. aphylla* la variación de forma no parece deberse a errores
31 metodológicos ya que sus flores son una corola con pétalos soldados y no mostraron

1 dificultades a la hora de acomodarlas para sacar las fotos como sucedió con *L. divaricata*.
2 Lo más probable es que esta variación se deba a causas intrínsecas de la especie (i.e.,
3 plasticidad fenotípica o variabilidad genética), y no esté asociada a la disponibilidad de
4 nutrientes del suelo. Sumado a los resultados obtenidos en *G. chiloensis*, esta ausencia de
5 variación en la morfología floral en plantas creciendo sobre basureros sugiere que los
6 nutrientes no estarían afectando los rasgos florales en estas especies o que las plantas no
7 están pudiendo aprovechar esta mayor riqueza nutritiva por alguna razón no analizada en
8 este trabajo. Acorde a estos resultados, tampoco observé cambios en la visita de los
9 polinizadores asociados al tipo de sustrato. Asimismo, el modelo de mejor ajuste para el
10 número de visitantes florales incluyó el tamaño del despliegue, pero no fue así para la
11 riqueza de los polinizadores. Sugiriendo, que esta variable puede tener un impacto visual en
12 la atracción de los polinizadores, pero no pareciera influir en la identidad de los mismos.
13 Por otra parte, las plantas de *L. divaricata* creciendo sobre los basureros produjeron más
14 semillas que las plantas creciendo sobre suelo. Por lo tanto, puede haber otros rasgos
15 florales que afectaron otros aspectos de la polinización que no fueron medidos. Por
16 ejemplo, la calidad de la recompensa, que posiblemente en este caso sea el polen puede
17 haber afectado la identidad de los polinizadores, atrayendo a los más eficientes. Además,
18 este aumento en la producción de semillas por fruto podría explicarse por una vía directa,
19 en la cual las plantas con mayor disponibilidad de recursos los destinan directamente a la
20 formación de frutos y semillas. O, también es probable que los beneficios de crecer cercano
21 a los nidos de hormigas, se deban a otros factores que no sean el aporte de nutrientes al
22 suelo. Dado que, en un trabajo previo se observó que los nidos de las hormigas *Formica*
23 *pepilosa*, incrementan la concentración de nutrientes del suelo y que plantas del arbusto
24 *Acacia constricta* producen más semillas cuando están cerca de estos nidos. Pero no se
25 encontró correlación entre la producción de semillas y el contenido nutricional del suelo, ni
26 cambios en las características químicas de los tejidos vegetales (Wagner 1997). Asimismo,
27 este resultado difirió de los reportados en el **capítulo 2**, en los cuales no se observó efectos
28 de los sustratos en la producción de semillas por fruto. Por lo tanto, es posible que la mayor
29 producción de semillas por fruto en plantas sobre basureros se haya dado en la temporada
30 2017, la cual no estuvo incluida en los análisis anteriores. Sugiriendo que puede haber un
31 efecto ese grupo de plantas o de las condiciones ambientales, que varían año a año, sobre el

1 potencial efecto fertilizante de los basureros. Es muy llamativo que un sustrato tan rico en
2 nutrientes, como son los basureros de las hormigas cortadoras, no tenga efectos más
3 destacables sobre la adecuación de la vegetación cercana, siendo que en las regiones áridas
4 como es el Monte austral los suelos suelen tener bajo contenido nutricional (Dregne 1977).
5 Existe otros factores, que no fueron tenidos en cuenta, que podrían estar explicando el bajo
6 efecto de esta fuente natural de nutrientes en la adecuación de las plantas del monte, como
7 por ejemplo la herbivoría, las escasas precipitaciones, el sistema radicular y la historia
8 natural de las especies analizadas.

9 Los potenciales efectos positivos de la fertilización, generada por los basureros,
10 podrían ser contrarrestados por los efectos negativos por el aumento de la herbivoría. En
11 algunos casos el aumento de nitrógeno en el suelo se ve reflejado en un incremento de los
12 niveles nutricionales de las hojas, lo cual hace que esas plantas sean más preferidas por los
13 herbívoros (Altieri & Nicholls 2003). Un incremento en el daño foliar generado por los
14 herbívoros puede afectar negativamente la polinización de diversas maneras. Por un lado,
15 las flores de plantas más dañadas suelen ser menos elegidas por los polinizadores. Por otro
16 lado, plantas con altos niveles de daño foliar pueden reducir la inversión en los rasgos
17 florales y calidad de recompensas (Jacobsen & Raguso 2018). Por ejemplo, plantas de
18 *Trifolium repens* que sufrieron más herbivoría produjeron menos inflorescencias con
19 pétalos más angostos que plantas menos depredadas (Thompson & Johnson 2016). Por otra
20 parte, plantas más atacadas pueden invertir más en defensas limitando los recursos para las
21 otras funciones como la reproducción (Obeso 2002; Tadey & Souto 2016). Además, el
22 aumento de defensas como los compuestos secundarios puede impactar en la calidad de las
23 recompensas florales disminuyendo la polinización (Jacobsen & Raguso 2018). Entonces,
24 la herbivoría podría estar diluyendo los beneficios de los basureros de las hormigas
25 cortadoras. En un trabajo reciente realizado en un ambiente similar no se detectó una mayor
26 tasa de daño en plantas sobre los basureros que sobre suelo control (Farji-Brener & Tadey,
27 2017). Sin embargo, dicho trabajo solo cuantificó la remoción de área foliar realizada solo
28 por las hormigas cortadoras sin tener en cuenta otro tipo de daño. Lamentablemente, en este
29 trabajo no se realizaron mediciones del nivel de daño foliar sobre las plantas muestreadas.
30 Por lo tanto, es importante que trabajos futuros se focalicen en evaluar daño foliar-floral y
31 producción de defensas en las plantas asociadas a los basureros para terminar de

1 comprender los potenciales efectos indirectos de los basureros sobre las interacciones entre
2 plantas e insectos (Herrera *et al.* 2002).

3 Además, las escasas precipitaciones que caracterizan la región del Monte podrían
4 estar limitando la movilización y mineralización de los nutrientes de los basureros (Fischer
5 & Turner 1978; Austin *et al.* 2004). Si bien los basureros tienen varias veces más contenido
6 de nutrientes que los suelos adyacentes, los pulsos de humedad son necesarios para
7 incrementar la actividad de los microorganismos descomponedores, la cual es
8 imprescindible para que los nutrientes estén disponibles para las plantas (Robertson &
9 Groffman 2007; Fernandez *et al.* 2014). Por lo tanto, si las precipitaciones son limitadas los
10 nutrientes podrían quedar retenidos en los basureros quedando inaccesibles para la
11 vegetación. Apoyando esta hipótesis, las condiciones de humedad como de herbivoría
12 estuvieron controladas en el experimento en invernadero, lo cual puede explicar por qué
13 solo en condiciones de invernadero los basureros afectaron los rasgos florales.

14 Otro aspecto a tener en cuenta, es la accesibilidad de las plantas a los nutrientes
15 provistos por los basureros, determinada por el alcance del sistema radical. En general, las
16 hierbas anuales como *E. californica* poseen raíces poco profundas que no suelen superar los
17 0.5 m. Mientras que, las raíces de los arbustos perennes, como las evaluadas en el campo,
18 crecen en mayor profundidad y en promedio alcanzan los 2.5 m (Brown & Archer 1990;
19 Schenk & Jackson 2001). Por esta razón, las hierbas aprovechan de forma más efectiva las
20 fuentes superficiales de nutrientes (Ward *et al.* 2013), como lo son los basureros. Sin
21 embargo, la principal fuente de macronutrientes en los sistemas áridos, es el material
22 vegetal muerto que cae sobre la superficie del suelo y la mayor concentración de estos
23 minerales se encuentra a poca profundidad (Jobbágy & Jackson 2001). Por lo que, los
24 arbustos nativos de estos ambientes poseen estrategias para aprovechar la capa menos
25 profunda del suelo (Bertiller *et al.* 2004). Por ejemplo, *L. divaricata* posee raíces que
26 alcanzan los 3 m de profundidad, pero también ocupan la capa más superficial del suelo con
27 raíces muy finas (Bertiller 1991; Rodríguez *et al.* 2007), por lo tanto, podría acceder a los
28 nutrientes provistos por los basureros. Lamentablemente, en la bibliografía que está a mi
29 alcance no encontré descripciones específicas del sistema radicular de las otras tres
30 especies. Sería interesante contar con esta información para estimar mejor el potencial de
31 los basureros como proveedores de nutrientes para estas especies. En relación a esto, los

1 mejores resultados obtenidos en el invernadero, pueden haberse debido a que la poca
2 profundidad de las macetas haya facilitado el acceso a los nutrientes de los basureros.
3 Además, en las macetas los basureros ocuparon una proporción mayor del volumen total
4 del sustrato, que la que la ocupada por los basureros en el campo, teniendo en cuenta el
5 volumen de suelo que potencialmente utilizan los arbustos. Asimismo, además del sistema
6 radical otras características intrínsecas de las especies evaluadas, pueden determinar la
7 importancia de los basureros como fuentes de nutrientes.

8 Finalmente, la historia natural de las especies evaluadas también puede explicar por
9 qué el efecto de los basureros mostró diferentes resultados en el invernadero y en el campo.
10 Por un lado, en el invernadero trabajé con *E. californica* que es una especie herbácea, anual
11 y exótica, mientras que en el campo trabajé con *L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chilensis*
12 que son arbustos, perennes, longevos, de crecimiento lento y nativos. En general, las
13 especies exóticas capaces de colonizar nuevos ambientes tienen estrategias de
14 aprovechamiento de los recursos diferentes a las nativas (Pattison *et al.* 1998). Estas
15 especies pueden ser más eficientes en el aprovechamiento de nutrientes, lo que podría
16 facilitarles la adaptación y el éxito en nuevos ambientes (Funk & Vitousek 2007). En un
17 trabajo previo, en el cual compararon la ganancia de biomasa vegetativa de siete especies
18 nativas y siete exóticas creciendo sobre basurero versus suelo desnudo, en condiciones de
19 invernadero, observaron que las plantas exóticas se vieron favorecidas alrededor de cien
20 veces más que las nativas. Además, observaron que en el campo los basureros favorecieron
21 la cobertura vegetal de especies exóticas (Farji-Brener *et al.* 2010). Asimismo, los
22 antecedentes que existen del efecto positivo de los basureros de *A. lobicornis* sobre la
23 adecuación reproductiva también fueron probados para especies exóticas (Farji-Brener &
24 Ghermandi 2008). En las comunidades naturales, la presencia de especies exóticas puede
25 afectar la polinización de la vegetación nativa, por la competencia del servicio de
26 polinización (Bjerknes *et al.* 2007). En general, la polinización y el éxito reproductivo de la
27 vegetación nativa disminuye en presencia de plantas exóticas que florecen simultáneamente
28 (Morales & Traveset 2009). La preferencia de los polinizadores sobre las flores exóticas
29 puede estar mediada por la mayor asignación de recursos al atractivo floral (Bjerknes *et al.*
30 2007, y referencias ahí). Por lo tanto, si las especies exóticas son capaces de aprovechar
31 mejor los recursos aportados por los basureros, que las especies nativas. Los nidos de las

1 hormigas cortadoras de hojas podrían tener un efecto negativo sobre la flora nativa,
2 favoreciendo la preferencia de los polinizadores por las especies exóticas. Por otra parte, *E.*
3 *californica* es una especie anual mientras que los arbustos evaluados en el Monte poseen
4 ciclos de vida perennes. Debido a que las especies anuales poseen una única oportunidad
5 reproductiva a lo largo de su vida invierte gran cantidad de los recursos disponibles para
6 asegurar el éxito de la reproducción. Mientras que las especies perennes invierten menos
7 cantidad de recursos, ya que atraviesan varios eventos reproductivos a lo largo de su vida y
8 tienen que repartir los recursos sin descuidar el resto de las funciones como el crecimiento
9 vegetativo (Pitelka 1977; Primack 1979; Kozłowski 1992). Por lo tanto, un aumento en los
10 nutrientes disponibles puede ser muy significativo para la reproducción de las especies
11 anuales, pero menos relevante para las perennes. Estas características distintivas entre la
12 especie empleada en invernadero y las analizadas a campo podrían explicar por qué los
13 basureros no fueron igual de efectivos en estas diferentes condiciones. Los experimentos
14 bajo condiciones controladas como los realizados en invernadero son una buena
15 herramienta para detectar posibles patrones y explorar sobre los mecanismos que los
16 producen. No obstante, los trabajos de campo son importantes ya que nos permiten tener
17 una visión más realista sobre lo que realmente sucede en la naturaleza.

18 A través de este trabajo, realicé aportes de los efectos de los basureros sobre el
19 atractivo floral y el éxito reproductivo de la vegetación que los rodea. Para terminar de
20 comprender el efecto de los hormigueros sobre la vegetación, sería interesante contar con
21 más información sobre la dinámica de movilización de los nutrientes de los basureros en los
22 sistemas áridos. Los resultados obtenidos bajo condiciones controladas apoyan la hipótesis
23 de una vía indirecta, mediante la cual las hormigas benefician la adecuación de las plantas
24 por la modificación de rasgos florales asociados a la atracción de polinizadores. Sin
25 embargo, el trabajo de campo pone en evidencia que este efecto podría estar limitado por
26 factores ambientales y por las características particulares de las especies vegetales.

27

1

Apéndice 1:

2

Marco para estimar la densidad de flores y frutos en *L. divaricata* y *M. aphylla*, el

3

círculo del centro tiene una superficie de 113 cm².



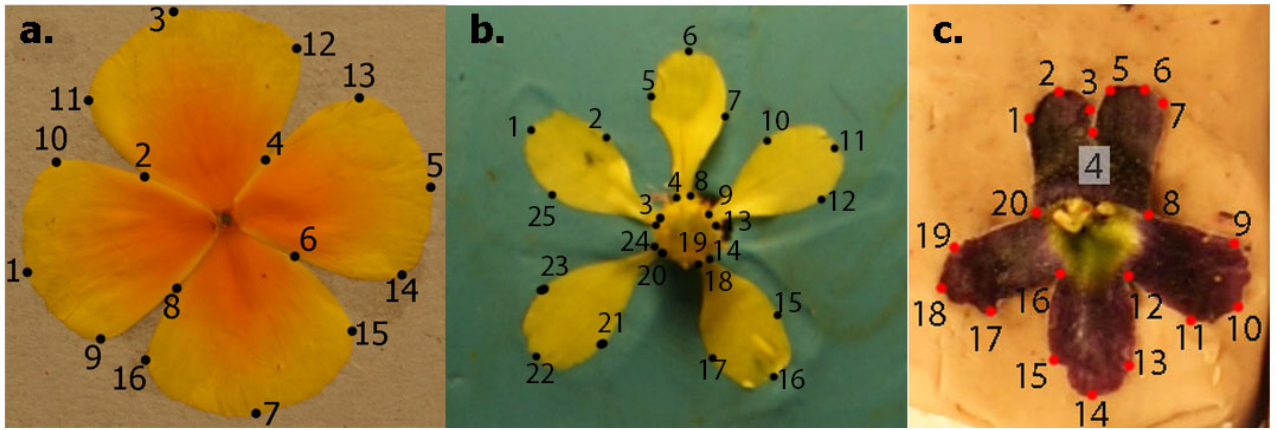
4

5

1 **Apéndice 2:**

2 Configuración de landmarks (LMs) utilizados para representar la forma de la flor de

3 a) *E. californica*, b) *L. divaricata* y c) *M. aphylla*.

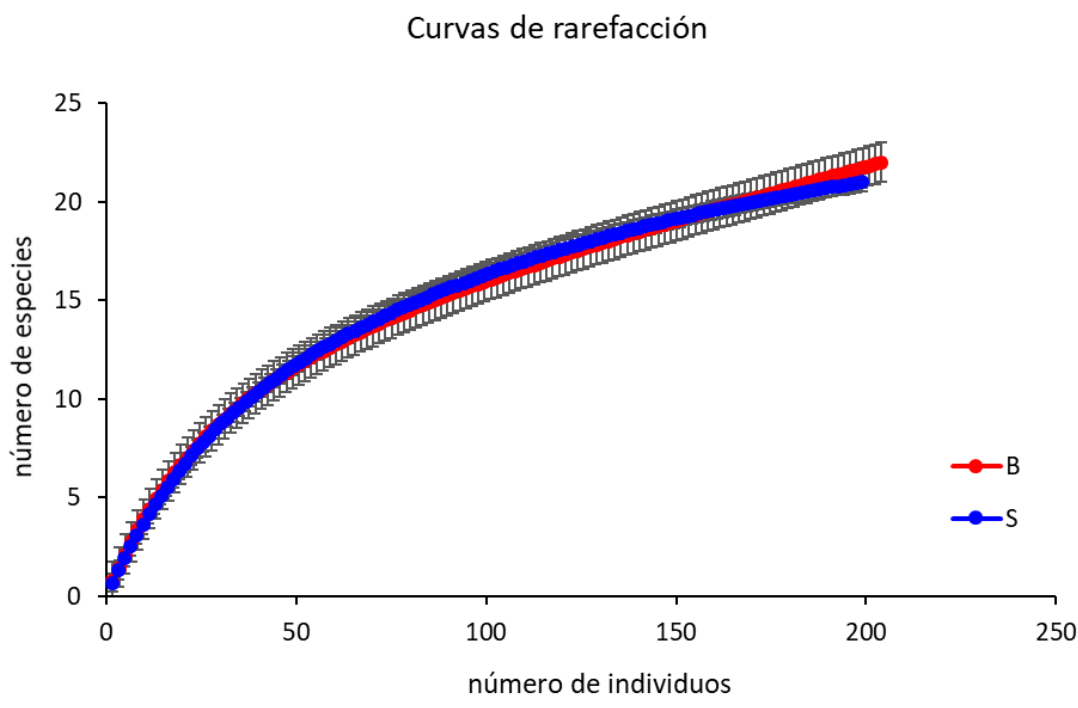


4

5

6

- 1 **Apéndice 3:**
- 2 Curvas de rarefacción para la riqueza de polinizadores recibida por plantas
- 3 creciendo sobre basureros y suelo control.
- 4



- 5
- 6

CAPÍTULO 4

Efectos directos e indirectos del aumento de nutrientes edáficos generados por las hormigas cortadoras sobre la adecuación de plantas polinizadas por insectos.



1 **Resumen**

2 En este capítulo estudié de manera integral el efecto de los disturbios al suelo
3 provocados por hormigas sobre la adecuación de las plantas. Las hormigas cortadoras de
4 hojas aumentan la fertilidad del suelo a través de la formación de basureros. La vegetación
5 que circunda a los basureros se beneficia directamente de ellos, a través del
6 aprovechamiento de los nutrientes para la formación de frutos y semillas. También las
7 plantas podrían beneficiarse de los basureros a través de un aumento en el vigor masculino
8 y del atractivo floral, destinando más nutrientes a dichas funciones. Asimismo, el aumento
9 del atractivo floral podría favorecer la polinización y la producción de semillas por fruto o
10 la producción de frutos por flor. En este capítulo, propongo un análisis de vías para integrar
11 y evaluar la importancia relativa entre los efectos directos e indirectos de los nutrientes del
12 suelo, aportados por los basureros, sobre el éxito reproductivo de la vegetación. Realicé el
13 análisis de vías con los resultados de la concentración de nutrientes en suelos y basureros,
14 los rasgos florales, visita de polinizadores y producción de semillas obtenidos en dos
15 especies evaluadas a campo (*L. divaricata* y *G. chiloensis*), durante 2016. Los análisis de
16 vías no detectaron efectos positivos directos e indirectos de los basureros sobre la
17 vegetación. En ningún caso los nutrientes afectaron a los rasgos florales, en algunos casos
18 los rasgos florales afectaron a la polinización y sólo en un caso, la polinización afectó la
19 producción de semillas por flor. No obstante, los resultados obtenidos en invernadero
20 (capítulo 3) sugieren la existencia de un efecto potencial positivo de los basureros sobre el
21 atractivo floral. La ausencia de este efecto positivo en situación de campo sugiere que
22 existen otros factores, tanto ambientales como biológicos, que podrían estar limitando el
23 efecto de los basureros sobre la adecuación de las plantas. Los aportes de este trabajo
24 amplían los conocimientos del rol de las hormigas cortadoras de hojas como ingenieras
25 ecosistémicas en los ambientes naturales, la importancia de los efectos indirectos de los
26 disturbios en las interacciones planta-insecto y la necesidad de complementar los estudios
27 de invernadero con trabajos a campo.

28

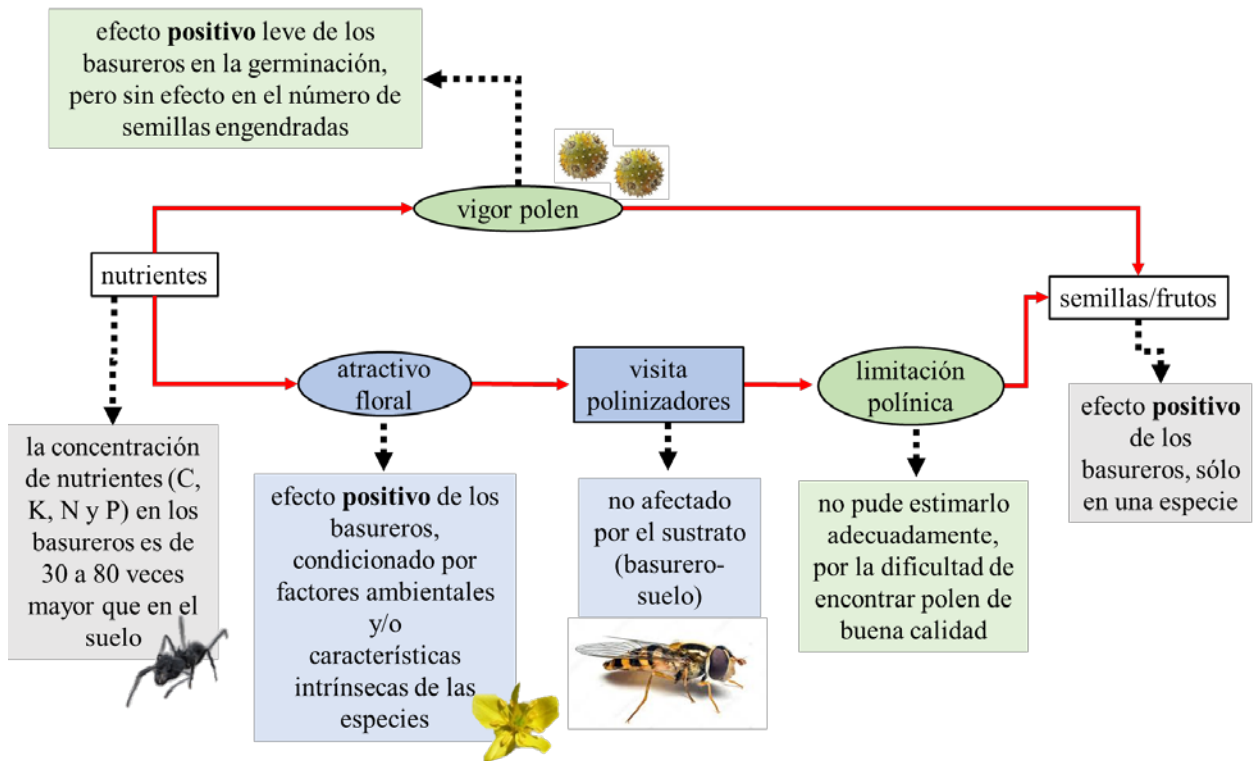
1 **Introducción**

2 Los disturbios a pequeña escala provocados por los ingenieros ecosistémicos,
3 generan cambios en la disponibilidad de recursos que afectan de manera directa e indirecta
4 al resto de los organismos (Denslow 1980; Yoshihara *et al.* 2010; Miranda *et al.* 2018). En
5 esta tesis estudié uno de esos efectos: las consecuencias de la alteración del suelo
6 provocada por las hormigas sobre la adecuación de las plantas vía cambios en las
7 características de sus flores. Las plantas que son polinizadas por animales poseen rasgos
8 florales seleccionados naturalmente para atraer a los polinizadores y asegurar su éxito
9 reproductivo (Gómez *et al.* 2008; Stanton, Snow, & Handel 1986). Estos rasgos pueden
10 magnificarse cuando la disponibilidad de recursos es alta. Las plantas que crecen en suelos
11 fértils poseen rasgos florales más atractivos, son más visitadas por polinizadores y
12 aumentan su producción de semillas (Cardoza, Harris, & Grozinger 2012; Muñoz *et al.*
13 2005). Además, las plantas con alta disponibilidad de recursos pueden producir granos de
14 polen más vigorosos con mayor capacidad de engendrar semillas (Lau & Stephenson 1994).
15 Por lo tanto, los disturbios que alteran la disponibilidad de nutrientes tienen el potencial de
16 mejorar el desempeño de los granos de polen y afectar indirectamente la adecuación de las
17 plantas polinizadas por animales a través de cambios en el atractivo floral.

18 Las hormigas cortadoras de hojas incrementan la fertilidad del suelo mediante la
19 acumulación de materia orgánica en sus basureros (Farji-Brener & Werenkraut 2015). Estos
20 parches ricos en nutrientes favorecen directamente la reproducción de la vegetación
21 circundante, ya que las plantas pueden destinar los nutrientes a la formación de las
22 estructuras reproductivas como los frutos y semillas (Farji-Brener & Ghermandi 2008). Sin
23 embargo, también podrían existir otras dos vías, que hasta ahora no habían sido estudiadas,
24 mediante las cuales los basureros podrían mejorar el éxito reproductivo de las plantas
25 polinizadas por animales. Por un lado, la capacidad masculina de engendrar semillas puede
26 aumentar a través del mejoramiento del desempeño de los granos de polen cuando alcanzan
27 las flores femeninas. Por otro lado, la producción de semillas podría favorecerse
28 indirectamente de los nutrientes aportados por las hormigas, a través del aumento del
29 atractivo floral y de las visitas de los polinizadores. El efecto potencial de los basureros
30 sobre los rasgos florales, es especialmente relevante en las plantas que están limitadas
31 reproductivamente por la cantidad de polen que reciben las flores femeninas.

1 En este contexto, el foco principal de esta tesis fue evaluar el efecto indirecto de los
2 basureros de la hormiga cortadora *Acromyrmex lobicornis* sobre la adecuación de plantas
3 polinizadas por insectos (i.e., entomófilas). Por un lado, en el **capítulo 2**, evalué el grado de
4 dependencia de polinizadores y el efecto de los basureros en los niveles de limitación
5 polínica y en el vigor masculino de *L. divaricata*, en el Monte austral. En el **capítulo 3**,
6 evalué cambios en los rasgos florales asociados a los basureros en *E. californica* bajo
7 condiciones de invernadero y en *L. divaricata*, *M. aphylla* y *G. chilensis* en condiciones
8 naturales. Además, en las plantas creciendo en condiciones naturales, evalué la tasa de
9 visita de polinizadores y éxito reproductivo, estimado a partir de la producción de semillas
10 por fruto o producción de frutos por flor. A través de experimentos de polinización
11 controlada pude constatar que *L. divaricata* depende de la polinización biótica para mejorar
12 la producción de semillas, aunque por dificultades técnicas no pude determinar
13 correctamente los niveles de limitación polínica en el sitio de estudio. Sin embargo, es
14 conocido que en el área de estudio las especies entomófilas están limitadas polínicamente
15 (Tadey *et al.* 2009). Con respecto a la adecuación masculina, el vigor del polen estimado a
16 partir de la germinación estuvo levemente favorecido por los basureros, pero el número de
17 semillas engendradas, no estuvo afectada. Por otro lado, el efecto de los basureros sobre los
18 rasgos florales, la atracción de polinizadores y la producción de semillas/frutos por
19 fruto/flor fue menos consistente y dependió de las condiciones ambientales y de las
20 especies vegetales estudiadas. En el invernadero los rasgos florales de una especie exótica
21 anual mejoraron notablemente, sin embargo, en el campo los rasgos florales de especies
22 arbustivas nativas no estuvieron afectados, como tampoco la visita de los polinizadores y su
23 producción de semillas (Fig. 1).

24 Al evaluar por separado el efecto de los basureros sobre las variables involucradas
25 en la *vía indirecta* propuesta sobre las especies estudiadas en el campo, no observé ningún
26 patrón definido. Por lo tanto, en este capítulo propongo un análisis de vías que me permitirá
27 evaluar simultáneamente los efectos directos e indirectos de los nutrientes del suelo sobre la
28 producción de semillas en condiciones naturales.



1

2 **Figura 1:** Resumen de la hipótesis y objetivos principales evaluados en esta tesis y de los resultados
 3 obtenidos. Las cajas verdes representan las variables evaluadas en el capítulo 2 y las lilas en el
 4 capítulo 3. El aumento de los nutrientes debido a los basureros es la premisa principal de esta
 5 hipótesis y el aumento de semillas el resultado final esperado.

6

7 **Materiales y métodos**

8 Para evaluar cómo interactúan la disponibilidad de nutrientes del suelo, los rasgos
 9 florales, la visita de polinizadores y la producción de semillas/frutos realicé un análisis de
 10 vías utilizando la prueba “d-separation (d-sep)” de Shipley (2009). Los análisis de vías
 11 permiten el análisis de una serie de relaciones causa-efecto hipotéticas, entre pares de
 12 variables, mientras que el método d-sep tiene la ventaja que permite comparar estas
 13 relaciones entre variables con diferente distribución en muestras pequeñas y en datos con
 14 estructuras jerárquica (Shipley 2000a, 2009). Para estos análisis, trabajé con los individuos
 15 estudiados en el campo para los cuales obtuve datos de todas las variables mencionadas
 16 arriba, éstos fueron en total 16 individuos de *L. divaricata* y 17 de *G. chiloensis* creciendo
 17 sobre basurero y suelo control, muestreados durante 2016. Debido a que *L. divaricata* es un
 18 arbusto de gran tamaño, que produce cientos de flores solitarias y *G. chiloensis* es un

1 arbusto pequeño, que produce flores dispuestas en capítulos en un número fácil de contar,
2 los rasgos florales y la producción de semillas/frutos no fueron estimados de la misma
3 manera para ambas especies. Por lo tanto, utilicé un modelo conceptualmente igual, pero
4 con diferentes variables para cada especie, y apliqué este modelo en ambos tipos de sustrato
5 por separado (basurero y suelo control). Dado que, para algunas de estas variables registré
6 más de una observación por individuo, los modelos fueron mixtos y tuvieron al individuo
7 como factor aleatorio. Las variables de rasgos florales que utilicé para probar los modelos
8 en *L. divaricata* fueron la producción de flores y el tamaño de las mismas, y para *G.*
9 *chiloensis* la producción, el diámetro y la altura del capítulo floral. Con las variables
10 medidas probé varios modelos, para finalmente elegir el de mejor ajuste utilizando el
11 criterio de χ^2 que utiliza el método d-sep. En este caso, un $\chi^2 > a 0.05$ indica un buen ajuste
12 del modelo (Shipley 2009). Para estimar “nutrientes” en una sola variable integral, realicé
13 un Análisis de Componentes Principales (PCA) con la concentración de nitrógeno, fósforo,
14 potasio y carbono obtenida en cada muestra. Utilicé entonces el auto-valor del eje 1 el cual
15 siempre explica en mayor proporción la varianza de los datos (Tadey & Farji-brener 2007).
16 Para ambas especies utilicé el número de visitantes recibidos en el período de observación
17 de 10 minutos y la producción de semillas por fruto para *L. divaricata* y la producción de
18 frutos por flor para *G. chiloensis*. Para obtener el efecto total de la disponibilidad de
19 nutrientes sobre la producción de semillas mediado por los rasgos florales y por las visitas
20 de los polinizadores, multiplique los coeficientes estimados para cada una de los pares de
21 variables involucrados en las vías indirectas y sumé el efecto de todas las vías indirectas
22 (Shipley 2000b).

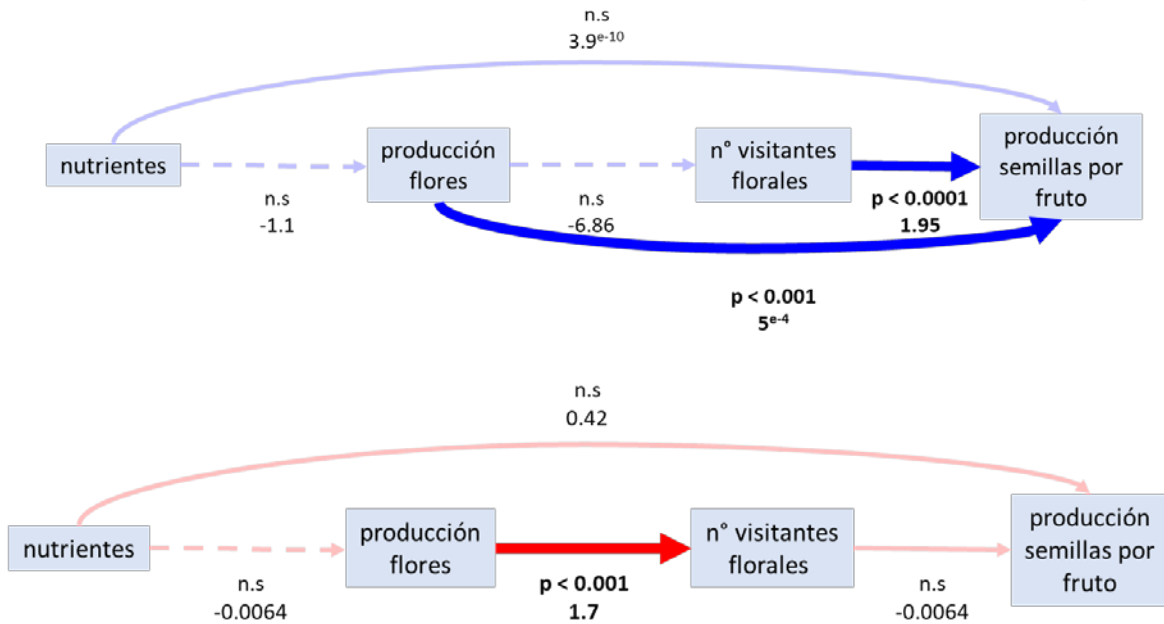
23

24 **Resultados**

25 El modelo que mejor explicó el efecto de los nutrientes sobre la producción de
26 semillas por fruto para *L. divaricata* creciendo sobre suelo control, fue aquel que incluyó la
27 producción de flores y la interacción directa entre éstas y la producción de semillas ($\chi^2 =$
28 0.06 , $P = 0.48$, siendo χ^2 y P el coeficiente y la probabilidad) (Fig. 2). Por otra parte, el
29 modelo de mejor ajuste para *L. divaricata* sobre basureros también incluyó la producción
30 de flores, pero no la interacción directa entre ésta y la producción de semillas por fruto (χ^2
31 $= 3.95$, $P = 0.14$, siendo χ^2 y P el coeficiente y la probabilidad) (Fig. 2). Para *G. chiloensis*,

1 el modelo de mejor ajuste fue el mismo para ambos sustratos, éste incluyó la producción de
2 capítulo y la interacción directa entre ésta y la producción de frutos por flor, ($\chi^2_s = 2.09$, P_s
3 = 0.18; $\chi^2_B = 3.21$, $P_B = 0.1$, siendo χ^2 y P el coeficiente y la probabilidad para plantas
4 sobre suelo y basurero, respectivamente) (Fig. 3). Los coeficientes del efecto indirecto total
5 de los nutrientes sobre la producción de semillas/frutos por fruto/flor, mediado por los
6 rasgos florales y las visitas de los polinizadores, fueron: 14.7 y 6.9^{e-5} para *L. divaricata*
7 sobre suelo y basurero; y -104.56 y 0.06 para *G. chiloensis* sobre suelo y basurero,
8 respectivamente. Por otra parte, los coeficientes del efecto directo total de los nutrientes
9 sobre la producción de semillas por flor fueron 3.9^{e-10} y 0.42 para *L. divaricata* sobre suelo
10 y basurero; y sobre la producción de frutos por flor 26.16 y 1.27 para *G. chiloensis* sobre
11 suelo y basurero, respectivamente.

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

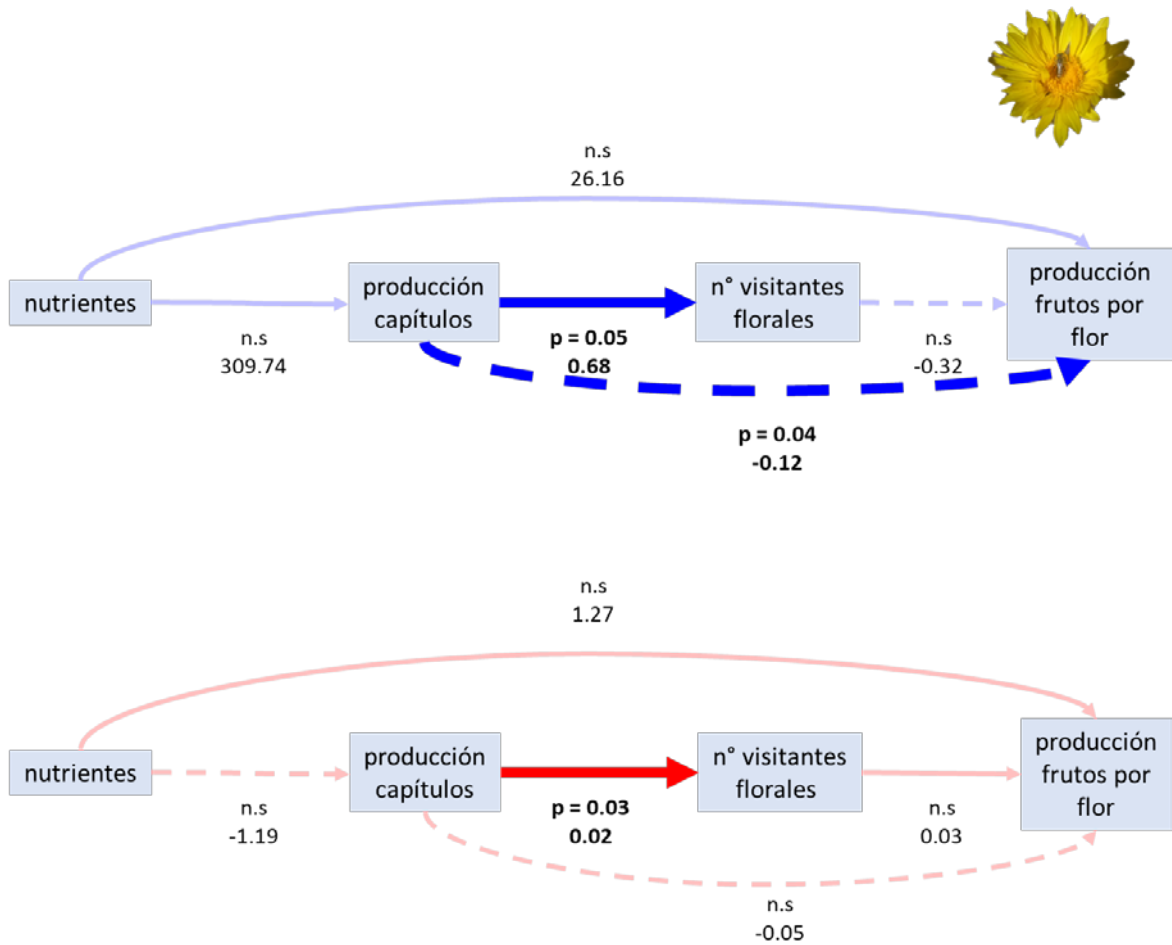
16

17

18

19

Figura 2: Modelo de vías que representa el efecto de la disponibilidad de nutrientes en el suelo sobre la producción de semillas por fruto de *L. divaricata*, a través de una vía directa y dos vías indirectas que involucran los rasgos florales (i.e., tamaño y producción de flores) y la atracción de polinizadores (número de visitantes florales). El diagrama de arriba (flechas azules) pertenece a individuos creciendo sobre suelo control y el de abajo (flechas rojas) a individuos sobre basureros de la hormiga cortadora *A. lobicornis*. Las flechas continuas representan relaciones positivas mientras que las punteadas las negativas, las de color más claro representan las relaciones no significativas estadísticamente y las más oscuro las significativas por otro lado, el grosor de las mismas indica la intensidad del efecto. Arriba de las flechas se muestra el valor de probabilidad (p) para las relaciones significativas y (n.s), para las relaciones con una significancia menor a 0.05, además, se muestra el coeficiente estimado por el modelo para cada interacción.



1
2

3
4

5 **Figura 3:** Modelo de vías que representa el efecto de la disponibilidad de nutrientes en el
 6 suelo sobre la producción de frutos por flor de *G. chilensis*, a través de una vía directa y dos vías
 7 indirectas que involucran los rasgos florales (i.e., producción de flores y altura del capítulo) y la
 8 atracción de polinizadores (número de visitantes florales). El diagrama de arriba (flechas azules)
 9 pertenece a individuos creciendo sobre suelo control y el de abajo (flechas rojas) a individuos sobre
 10 basureros de la hormiga cortadora *A. lobicornis*. Las flechas continuas representan relaciones
 11 positivas mientras que las punteadas las negativas, las de color más claro representan las relaciones
 12 no significativas estadísticamente y las más oscuro las significativas por otro lado, el grosor de las
 13 mismas indica la intensidad del efecto. Arriba de las flechas se muestra el valor de probabilidad (*p*)
 14 para las relaciones significativas y (n.s), para las relaciones con una significancia menor a 0.05,
 15 además, se muestra el coeficiente estimado por el modelo para cada interacción.

16
17
18

Discusión

1 Los basureros de las hormigas cortadoras pueden beneficiar directamente la
2 producción de frutos y semillas de las plantas a través del aumento de nutrientes edáficos
3 (Farji-Brener & Ghermandi 2008; Lescano *et al.* 2012). Este aumento de los nutrientes
4 disponibles podría asignarse directamente a la producción de más estructuras reproductivas
5 o favorecer los rasgos florales asociadas a la atracción de polinizadores. La hipótesis
6 principal de esta tesis proponía que las plantas que crecen sobre los basureros de las
7 hormigas cortadoras pueden incrementar su adecuación de forma indirecta, destinando el
8 aumento de nutrientes del suelo al incremento del atractivo floral, recibiendo más visitas de
9 polinizadores e incrementando en consecuencia la producción de semillas o frutos. En este
10 capítulo empleé análisis de vías para determinar la importancia relativa de esta vía indirecta
11 sobre la directa. Sin embargo, los modelos probados en este capítulo, si bien fueron
12 significativos ($P > 0.05$) resultaron poco explicativos. Contrario a lo esperado en base a la
13 hipótesis planteada, no observé ningún efecto positivo de los nutrientes edáficos sobre la
14 producción de semillas por fruto o producción de frutos por flor a través de ninguna de las
15 dos vías. Para ambas especies, el único rasgo floral involucrado en los modelos fue la
16 producción de flores o capítulos para *G. chiloensis*. En ninguno de los modelos los
17 nutrientes afectaron la producción de flores/capítulos. Asimismo, tal como lo esperaba, la
18 producción de flores/capítulos favoreció la visita de polinizadores en casi todos los casos,
19 excepto en *L. divaricata* sobre suelo control donde no hubo efecto. Sin embargo, el
20 aumento de la visita de polinizadores no se tradujo a un aumento en la producción de
21 semillas. Paradójicamente, en el único caso que las visitas aumentaron la producción de
22 semillas fue en *L. divaricata* sobre suelo. El rol de la producción de flores o capítulos en la
23 atracción de polinizadores, puede estar mediada por dos mecanismos. Si la floración es
24 extendida en el tiempo, los polinizadores pueden aprender que ese “parche” floral es una
25 fuente de alimentos asegurada y volver repetidas veces (Chittka *et al.* 1999). Asimismo, si la
26 gran producción de flores se da en un corto período, el tamaño del despliegue floral será
27 mayor y aumentará el impacto visual en los polinizadores (Eckhart 1991; Martin 2004). A
28 su vez, la producción de flores sólo afectó la producción de semillas o frutos en las plantas
29 sobre suelo control, este efecto fue positivo para *L. divaricata* pero negativo para *G.*
30 *chiloensis*. Estos efectos podrían ser explicados por la disponibilidad de los recursos, más
31 allá de los medidos acá. Si hay gran disponibilidad de recursos, las plantas pueden invertir

1 en producir flores, semillas y frutos. Sin embargo, si son escasos puede haber un efecto
2 “trade-off” entre la producción de flores y la de semillas o frutos. Los coeficientes del
3 efecto total de las vías directas e indirectas muestran que la vía indirecta tiene mayor peso
4 relativo en la producción de semillas/frutos que la directa, en plantas sobre suelo control
5 pero en plantas sobre basurero este patrón es el opuesto. Sugiriendo que las plantas sobre
6 suelo control invierten más en el mejoramiento del atractivo floral que en la formación de
7 semillas/frutos y al revés, las plantas sobre basurero, aunque hay que tener en cuenta que
8 casi ninguno de los efectos fue significativo. Esto puede deberse principalmente a que el
9 tamaño de muestra era pequeño y los datos muy variables, lo cual podría dificultar la
10 detección de patrones existentes. Además, el ajuste de los modelos fue relativamente bajo.
11 Los resultados obtenidos aquí, coinciden en su gran mayoría con los obtenidos en los
12 capítulos anteriores. Sin embargo, en el **capítulo 3**, se observó que las plantas sobre
13 basureros produjeron más semillas por fruto, en base a los resultados obtenidos acá, ese
14 aumento de semillas no parece estar explicado por el contenido de nutrientes de este
15 sustrato. Coincidiendo, con lo encontrado en el sistema conformado por *Formica perpilosa*
16 y *Acacia constricta* (Wagner 1997). Aunque, que los análisis de vías no reflejen el aumento
17 de semillas en función a los nutrientes, puede deberse en parte a que se construyeron con
18 una sub-muestra de los individuos analizados en los otros capítulos. Esto refuerza, la
19 necesidad de un tamaño de muestra mayor para la observación de patrones. Los resultados
20 referentes al atractivo floral obtenidos en condiciones naturales se contraponen con los
21 obtenidos en el experimento bajo condiciones controladas. Esta inconsistencia en los
22 resultados obtenidos puede deberse a distintas razones tanto ambientales como biológicas.

23 Como mencioné en el capítulo anterior, las diferentes condiciones ambientales entre
24 el campo y el invernadero, y las diferencias biológicas entre las especies evaluadas podrían
25 explicar las inconsistencias encontradas a campo en cuanto a las respuestas de especies
26 nativas al aumento de nutrientes del suelo. Bajo condiciones de humedad controlada en
27 invernadero, el basurero de hormigas afectó positiva y significativamente a todos los rasgos
28 florales evaluados en *E. californica* (**capítulo 3**). Mientras que a campo las escasas
29 precipitaciones que caracterizan el Monte podrían limitar la movilización de los nutrientes
30 de los basureros impidiendo que las plantas puedan aprovecharlos (Austin *et al.* 2004).
31 Asimismo, a campo hay muchos más factores que podrían estar afectando la respuesta de

1 las plantas. Por ejemplo, en el caso que los nutrientes sean aprovechables, la herbivoría
2 podría contrarrestar los efectos positivos de los basureros. En algunos casos las plantas
3 mejor nutridas son más preferidas por los herbívoros (Altieri & Nicholls, 2003). Los
4 sistemas áridos poseen gran heterogeneidad temporal y espacial, que podrían afectar el
5 potencial de los basureros como fertilizantes. Por lo tanto, un tamaño de muestra mayor y
6 un seguimiento de los individuos a lo largo de varias temporadas podrían ser necesarios
7 para la detección de un patrón. Por otro lado, las especies evaluadas en el campo (i.e., *L.*
8 *divaricata*, *M. aphylla* y *G. chiloensis*) son arbustos nativos perennes de crecimiento lento.
9 *E. californica*, la especie utilizada en los experimentos de invernadero, es una especie
10 herbácea anual exótica de crecimiento rápido. En general, las especies con las
11 características de *E. californica*, suelen ser más eficientes en el aprovechamiento de los
12 recursos y suelen invertir mayor cantidad de recursos que las especies como las evaluadas
13 en el campo (Kozłowski 1992; Funk & Vitousek 2007). Además, el sistema radical de
14 estas especies podría afectar la accesibilidad a los nutrientes, que se encuentran en fuentes
15 superficiales, como el caso de los basureros. Aunque en general, los arbustos de los
16 sistemas áridos poseen estrategias para la obtención de nutrientes de capas poco profundas
17 (Bertiller *et al.* 1991). Asimismo, proporcionalmente el aporte de nutrientes de los
18 basureros en las macetas, posiblemente fue mayor que en el campo debido a la proporción
19 del volumen total de sustrato ocupado por los basureros. Cabe recordar, que las especies
20 con las que trabajé en el campo fueron seleccionadas por ser las más frecuentes en los
21 basureros. Sería interesante contar con información de los efectos de los basureros en
22 hierbas, anuales, nativas del Monte. Los resultados obtenidos en el invernadero ilustran el
23 efecto potencial de los basureros en el éxito reproductivo de las especies herbáceas con
24 ciclos de vida cortos que invierten gran parte de sus recursos en la reproducción
25 (Kozłowski 1992), aunque esto debe ser confirmado.

26 Este trabajo ilustra por primera vez cómo un aumento de nutrientes en el suelo
27 puede variar la forma de las flores. El efecto de nutrientes sobre la forma de una estructura
28 vegetal había sido comprobado anteriormente en hojas, pero nunca en flores (Gosler *et al.*
29 1994; Njoku 1957). Previamente, se demostró el uso beneficioso de los basureros de
30 hormigas cortadoras como fertilizantes en el cultivo orgánico de verduras de hojas (Santos
31 *et al.* 2017). Los resultados obtenidos en esta tesis bajo condiciones controladas, apoyan el

1 uso potencial de los basureros como fertilizante en el cultivo orgánico, sobre todo de
2 hierbas a pequeña escala ya que podrían mejorar el servicio de polinización favoreciendo la
3 producción de frutos. Su uso potencial podría ser de gran utilidad, sobre todo en prácticas
4 de floricultura y viverismo, ya que podrían ayudar a mejorar el aspecto de las flores e
5 incrementar su producción. Además, podría aplicarse en prácticas de restauración vegetal,
6 en sitios donde las hormigas cortadoras se encuentran naturalmente.

7 Aunque los resultados obtenidos en el campo no apoyan la hipótesis de un efecto
8 positivo de los basureros de hormigas sobre la vegetación del Monte, los resultados bajo
9 condiciones controladas demostraron el potencial que tienen los basureros como
10 mejoradores de la adecuación vegetal. Dado la gran heterogeneidad temporal y espacial de
11 las condiciones ambientales de los sistemas áridos, no hay que descartar que en años
12 lluviosos los basureros potencien la reproducción de las plantas polinizadas por insectos.
13 Finalmente, los aportes de este trabajo amplían el conocimiento del papel de las hormigas
14 cortadoras de hojas como ingenieras ecosistémicas en los ambientes naturales, resaltan la
15 importancia de los efectos indirectos de los disturbios sobre las interacciones planta-
16 insecto, y enfatizan la necesidad de complementar los estudios de invernadero con trabajos
17 a campo.

18

19

20

1 **Agradecimientos**

2 En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Guedi y Mari, porque ésta tesis
3 nos pertenece en parte a los tres. Por compartir sus ideas y conocimientos conmigo a lo
4 largo de estos 5 años. Especialmente, por todo su apoyo en ésta última etapa de la escritura.
5 El compromiso y rápida respuesta de sus correcciones fueron fundamentales para mi
6 supervivencia ;).

7 Les agradezco con todo mi corazón a mis padres, a Mauri, Jose, Antoine, Laurita,
8 Lauralins, May, Glo, Agustinita, Fer, Xime, Nacha y Candy por apoyarme e incentivar
9 en todo momento. Especialmente a Jose por bancarme incondicionalmente éstos últimos
10 meses ☺. Los quiero infinito punto rojo <3.

11 A todos los que fueron conmigo al campo al menos una vez, su compañía fue
12 muuuy valiosa para mí: Ivón, Mari, Jose, Luis, Pablo A., Martita y sobre todo a mi papá mi
13 ayudante preferido. Gracias!! Gracias!!

14 Muchas gracias a Santi A, Flor B y Patricia S, por ayudarme con las tareas del
15 invernadero.

16 Gracias al grupo de Ecología de la Polinización por facilitarme el uso del
17 microscopio de epifluorescencia.

18 Muchas gracias a todos los que compartieron conmigo parte de sus conocimientos,
19 experiencias y tiempo para resolver algunas de mis consultas: Marcelo Aizen, Matías
20 Baranzelli, Silvina Van der Molen, Aye Carro, Juan Andrés, Gilda, Juan Cabrera, Florencia
21 Baudino, Caro Quinteros, Marina Strelin, Damián Rajoy y especialmente a Agustín Saez
22 por la infinidad de veces que respondiste mis consultas estadísticas.

1 Muchas gracias a mis compañeros de oficina: Emi, Jime, Eri, Maru, May, Gin y
2 Facu. Por su compañía, ayuda, apoyo, los mates, los gusanos, las risas, ¡aiiii pero que lindo
3 fue trabajar con ustedes!!!

4 Muchas gracias a los Dres. Carolina Morales, Mariano Rodríguez Cabal y Diego
5 Medan por sus aportes y mirada crítica, ya que ayudaron a mejorar la calidad de esta tesis.

6 Gracias a CONICET por la beca y a los PICTs 2015 1304 y 2015-1319 otorgados a
7 G Pirk y a AG Farji-Brener, por financiar parte de los gastos de este trabajo.

8 Y por último, sacándome el sombrero quiero agradecer profundamente y con mucho
9 orgullo a la Universidad Pública.

1 **Bibliografía:**

- 2 Aguiar, Martín R, & Osvaldo E Sala. 1999. "Patch Structure, Dynamics and Implications
3 for the Functioning of Arid Ecosystems." *Tree* 14(7): 273–77.
- 4 Aizen, Marcelo A., & Lawrence D. Harder. 2007. "Expanding the Limits of the Pollen-
5 Limitation Concept: Effects of Pollen Quantity and Quality." *Ecology* 88(2): 271–81.
- 6 Aizen, Marcelo A., & Estela Raffaele. 1998. "Flowering-Shoot Defoliation Affects Pollen
7 Grain Size and Postpollination Pollen Performance in *Alstroemeria aurea*." *Ecology*
8 79(6): 2133–42.
- 9 Aizen, Marcelo A, Karen B Searcy, & David L Mulcahy. 1990. "Among- and within-
10 Flower Comparisons of Pollen Tube Growth Following Self- and Cross-Pollinations in
11 *Dianthus Chinensis* (Caryophyllaceae)." *American Journal of Botany* 77(5): 671–76.
- 12 Altieri, Miguel A., & Clara I. Nicholls. 2003. "Soil Fertility Management and Insect Pests:
13 Harmonizing Soil and Plant Health in Agroecosystems." *Soil and Tillage Research*
14 72(2): 203–11.
- 15 Ashman, Tia Lynn *et al.* 2004. "Pollen Limitation of Plant Reproduction: Ecological and
16 Evolutionary Causes and Consequences." *Ecology* 85(9): 2408–21.
- 17 Asikainen, Eija, & Pia Mutikainen. 2005. "Pollen and Resource Limitation in a
18 Gynodioecious Species." *American Journal of Botany* 92(3): 487–94.
- 19 Austin, Amy T. *et al.* 2004. "Water Pulses and Biogeochemical Cycles in Arid and
20 Semiarid Ecosystems." *Oecologia* 141(2): 221–35.
- 21 Barrett, Spencer C.H., & Lawrence D. Harder. 1996. "Ecology and Evolution of Plant
22 Mating." *Tree* 11(2): 73–79.
- 23 Barrett, Spencer. C. H. 2010. "Understanding Plant Reproductive Diversity." *Philosophical*
24 *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 99–109.
25 <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2009.0199>.
- 26 Bauer, Austin A., Murray K. Clayton, & Johanne Brunet. 2017. "Floral Traits Influencing
27 Plant Attractiveness to Three Bee Species: Consequences for Plant Reproductive

- 1 Success.” *American Journal of Botany* 104(5): 772–81.
- 2 Benítez, Hugo A., Héctor A. Vargas, & Thomas A. Püschel. 2015. “Left–right Asymmetry
3 and Morphological Consequences of a Host Shift in the Oligophagous Neotropical
4 Moth *Macaria mirthae* (Lepidoptera: Geometridae).” *Journal of Insect Conservation*
5 19(3): 589–98.
- 6 Bertiller, Monica B, Ana M Beeskow, & Fernando Coronato. 1991. “Seasonal
7 Environmental Variation and Plant Phenology in Arid Patagonia (Argentina).” *Journal*
8 *of Arid Environments* 21: 1–11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-1963\(18\)30722-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-1963(18)30722-5).
- 9 Bertiller, Mónica B, Alejandro J Bisigato, & Analía L Carrera. 2004. “Estructura de La
10 Vegetación y Funcionamiento de Los Ecosistemas Del Monte Chubutense.” *Boletín*
11 *Sociedad Argentina Botánica* 39(3–4): 139–58.
- 12 Bierzychudek, Paulette. 1981. “Pollinator Limitation of Plant Reproductive Effort.” *The*
13 *American Naturalist* 117(5): 838–40.
14 <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/283773>.
- 15 Bjerknes, Anne-line, Ørjan Totland, Stein Joar Hegland, & Anders Nielsen. 2007. “Do
16 Alien Plant Invasions Really Affect Pollination Success in Native Plant Species ?”
17 *Biological Conservation* 138: 1–12.
- 18 Bosch, Jordi, Javier Retana, & X Cerdà. 1997. “Flowering Phenology, Floral Traits and
19 Pollinators Composition in a Herbaceous Mediterranean Plant Community.”
20 *Oecologia* 109: 583–91.
- 21 Bot, A.N.M., C.R. Currie, A.G. Hart, & J.J. Boomsma. 2001. “Waste Management in Leaf-
22 Cutting Ants.” *Ethology Ecology & Evolution* 13(3): 225–37.
23 <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2001.9522772>.
- 24 Brown, Joel R, & Steve Archer. 1990. “Water Relations of a Perennial Grass and Seedling
25 vs Adult Woody Plants in a Subtropical Savanna, Texas.” *Oikos* 57(3): 366–74.
- 26 Burd, Martin. 1994. “Bateman’s Principle and Plant Reproduction: The Role of Pollen
27 Limitation in Fruit and Seed Set.” *The Botanical Review* 60(1): 83–139.

- 1 Burkart, R, N O Bárbaro, R O Sánchez, & D Gómez. 1999. Administración de Parques
2 Nacionales *Eco-Rregiones de La Argentina*.
- 3 Burkle, Laura A., & Rebecca E. Irwin. 2009. “The Effects of Nutrient Addition on Floral
4 Characters and Pollination in Two Subalpine Plants, *Ipomopsis aggregata* and *Linum*
5 *lewisii*.” *Plant Ecology* 203(1): 83–98.
- 6 Cabrera, A.L. 1976. “Regiones Fitogeográficas Argentinas.” En *Enciclopedia Argentina de*
7 *Agricultura y Jardinería*, Buenos Aires: Acme S.A, 85.
- 8 Cabrera, Angel. 1971. *Flora Patagónica, Tomo VII, Parte VII*. ed. Maevia Noemí Correa.
9 Buenos Aires: INTA.
- 10 Campbell, Diane R., & Kenneth J. Halama. 1993. “Resource and Pollen Limitations to
11 Lifetime Seed Production in a Natural Plant Population.” *Ecology* 74(4): 1043–51.
- 12 Campbell, N A, & William R Atchley. 1981. “The Geometry of Canonical Variate
13 Analysis.” *Syst. Zool* 30(3): 268–80.
- 14 Cardoza, Yasmin J., Gabriel K. Harris, & Christina M. Grozinger. 2012a. “Effects of Soil
15 Quality Enhancement on Pollinator-Plant Interactions.” *Psyche* 2012: 1–8.
16 <http://www.hindawi.com/journals/psyche/2012/581458/>.
- 17 ———. 2012b. “Effects of Soil Quality Enhancement on Pollinator-Plant Interactions.”
18 *Psyche: Journal of entomology*: 1–8.
19 <http://www.hindawi.com/journals/psyche/2012/581458/> (June 2, 2014).
- 20 Chen, Jen-Hshuan. 2006. “The Combined Use of Chemical and Organic Fertilizers and/or
21 Biofertilizer for Crop Growth and Soil Fertility.” *International Workshop on Sustained*
22 *Management* (October): 1–11.
- 23 Chesson, Peter *et al.* 2004. “Resource Pulses, Species Interactions, and Diversity
24 Maintenance in Arid and Semi-Arid Environments.” *Oecologia* 141(2): 236–53.
- 25 Coen, Enrico S., and Elliot M. Meyerowitz. 1991. “The War of the Whorls: Genetic
26 Interactions Controlling Flower Development.” *Nature* 353: 31–37.
- 27 Colwell, Robert K., Chang Xuan Mao, & Jing Chang. 2004. “Interpolating, Extrapolating,

- 1 and Comparing Incidence-Based Specie Accumulation Curves.” *Ecology* 85(10):
2 2717–27.
- 3 Cook, Stanton A. 1962. “Genetic System, Variation and Adaptation in *Eschscholzia*
4 *californica*.” *Evolution* 16(3): 278–99. <http://www.jstor.org/stable/2406277>.
- 5 Correa, Maevia Noemí. 1988. “Dicotiledoneas Dialipetalas (Oxalidaceae a Cornaceae).” En
6 *Flora Patagónica*, ed. Maevia Noemí Correa. Buenos Aires: INTA.
- 7 Corrêa, Michele M *et al.* 2010. “How Leaf-Cutting Ants Impact Forests: Drastic Nest
8 Effects on Light Environment and Plant Assemblages.” *Oecologia* 162: 103–15.
9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690891> (June 3, 2014).
- 10 Crain, Caitlin Mullan, & Mark D Bertness. 2006. “Ecosystem Engineering across
11 Environmental Gradients : Implications for Conservation and Management.”
12 *BioScience* 56(3): 211–18.
- 13 Delph, Lynda F. 1986. “Factors Regulating Fruit and Seed Production in the Desert Annual
14 *Lesquerella gordonii*.” *Oecologia* 69(3): 471–76.
- 15 Denslow, Julie Sloan. 1980. “Patterns of Plant Species Diversity during Succession under
16 Different Disturbance Regimes.” *Oecologia* 46(1): 18–21.
- 17 Dregne, H.A. 1977. *Soil Science Soils of Arid Regions*. Texas (U.S.A): Elsevier.
18 <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00010>
19 [694-197703000-00017](http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00010).
- 20 Eckhart, Vincent M. 1991. “The Effects of Floral Display on Pollinator Visitation Vary
21 among Populations of *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae).” *Evolutionary Ecology* 5:
22 370–84.
- 23 Ehrlen, Johan, Sofia Kack, & Jon Agren. 2002. “Pollen Limitation, Seed Predation and
24 Scape Length in *Primula farinosa*.” *Oikos* 97(1): 45–51.
25 <http://www.jstor.org/stable/3547591>.
- 26 Evert, Ray F, and Susan E Eichhorn. 2013. “Plant Nutrition and Soils.” In *Raven Biology of*
27 *Plants*, United States of America: Peter Marshall, 919.

- 1 Fabbro, Thomas, & Christian Körner. 2004. "Altitudinal Differences in Flower Traits and
2 Reproductive Allocation." *Flora* 199: 70–81.
- 3 Farji-Brener, Alejandro G., & Luciana Ghermandi. 2004. "Seedling Recruitment in a Semi-
4 Arid Patagonian Steppe: Facilitative Effects of Refuse Dumps of Leaf-Cutting Ants."
5 *Journal of Vegetation Science* 15(6): 823–30. [http://doi.wiley.com/10.1658/1100-
6 9233\(2004\)015\[0823:SRIASP\]2.0.CO;2](http://doi.wiley.com/10.1658/1100-9233(2004)015[0823:SRIASP]2.0.CO;2).
- 7 ———. 2008. "Leaf-Cutting Ant Nests near Roads Increase Fitness of Exotic Plant Species
8 in Natural Protected Areas." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*
9 275: 1431–40.
- 10 Farji-Brener, Alejandro G., Natalia Lescano, & Luciana Ghermandi. 2010. "Ecological
11 Engineering by a Native Leaf-Cutting Ant Increases the Performance of Exotic Plant
12 Species." *Oecologia* 163(1): 163–69.
- 13 Farji-Brener, Alejandro G., & Mariana Tadey. 2009. "Contributions of Leaf-Cutting Ants
14 to Soil Fertility: Causes and Consequences." En *Soil Fertility*, eds. D.P. Lucero and
15 J.E. Boggs. Nova Science Publishers, Inc., 81–91.
16 <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.polisci.3.1.251>.
- 17 Farji-Brener, Alejandro G., & Victoria Werenkraut. 2015. "A Meta-Analysis of Leaf-
18 Cutting Ant Nest Effects on Soil Fertility and Plant Performance." *Ecological*
19 *Entomology* 40(2): 150–58.
- 20 Farji-brener, Alejandro G. 2000. "Leaf-Cutting Ant Nests in Temperate Environments:
21 Mounds, Mound Damages and Nest Mortality Rate in *Acromyrmex Lobicornis*."
22 *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 35: 131–38.
- 23 Farji-brener, Alejandro G., & Luciana Ghermandi. 2000. "Influence of Nests of Leaf-
24 Cutting Ants on Plant Species Diversity in Road Verges of Northern Patagonia."
25 *Journal of Vegetation Science* 11: 453–60.
26 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2307/3236638/full> (June 13, 2014).
- 27 Farji-brener, Alejandro G., & Adriana Ruggiero. 1994. "Leaf-Cutting Ants (*Atta* and
28 *Acromyrmex*) Inhabiting Argentina: Patterns in Species Richness and Geographic

- 1 Range Sizes.” *Journal of Biogeography* 21(4): 391–99.
2 <http://www.jstor.org/stable/2845757> Accessed:
- 3 Fernandez, Anahí, Alejandro G. Farji-Brener, & Patricia Satti. 2014a. “Factores Que
4 Infuyen Sobre La Actividad Microbiana En Basureros de Hormigas Cortadoras de
5 Hojas.” *Ecologia Austral* 24(1): 103–10.
- 6 ———. 2014b. “Moisture Enhances the Positive Effect of Leaf-Cutting Ant Refuse Dumps
7 on Soil Biota Activity.” *Austral Ecology* 39(2): 198–203.
- 8 Ferreiro, Gabriela, Matías C Baranzelli, Alicia N Sérsic, and Andrea A Cocucci. 2015.
9 “Clinal Variability of Oil and Nectar Rewards in *Monttea Aphylla* (Plantaginaceae):
10 Relationships with Pollinators and Climatic Factors in the Monte Desert.” *Botanical
11 Journal Of The Linnean Society* 178: 314–28.
- 12 Fischer, R. A., & Neil C Turner. 1978. “Plant Productivity in the Arid and Semiarid
13 Zones.” *Annual Review of Plant Physiology* 29(1): 277–317.
14 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.29.060178.001425>.
- 15 Fishbein, Mark, & D. Lawrence Venable. 1996. “Diversity and Temporal Change in the
16 Effective Pollinators of *Asclepias tuberosa*.” *Ecology* 77(4): 1061–73.
- 17 Funk, Jennifer L., & Peter M. Vitousek. 2007. “Resource-Use Efficiency and Plant
18 Invasion in Low-Resource Systems.” *Nature* 446(7139): 1079–81.
- 19 Gandullo, Ricardo, Juliana Gastiazoro, Adriana Bünzli, and Cecilia Coscaron Arias. 2004.
20 *Flora Típica de Las Bardas Del Neuquén y Sus Alrededores*. 1°. Petrobras.
- 21 Gardener, Mark. C., & Michael P. Gillman. 2001. “The Effects of Soil Fertilizer on Amino
22 Acids in the Floral Nectar of Corncockle, *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae).”
23 *Oikos* 92(1): 101–6.
- 24 Gómez, José M. *et al.* 2008a. “Association between Floral Traits and Rewards in *Erysimum
25 mediohispanicum* (Brassicaceae).” *Annals of Botany* 101(9): 1413–20.
- 26 ———. 2008b. “Spatial Variation in Selection on Corolla Shape in a Generalist Plant Is
27 Promoted by the Preference Patterns of Its Local Pollinators.” *Proceedings of the*

- 1 *Royal Society B: Biological Sciences* 275: 2241–49.
- 2 Gosler, A. G., C. K. Kelly, & J.K. Blakey. 1994. “Phenotypic Plasticity in Leaf
3 Morphology of *Crataegus monogyna* (Rosaceae): An Experimental Study with
4 Taxonomic Implications.” *Botanical Journal Of The Linnean Society* 115: 211–19.
- 5 Grindeland, J. M., N. Sletvold, & R. A. Ims. 2005. “Effects of Floral Display Size and
6 Plant Density on Pollinator Visitation Rate in a Natural Population of *Digitalis*
7 *purpurea*.” *Functional Ecology* 19(3): 383–90.
- 8 Haig, David, & Mark Westoby. 1988. “On Limits to Seed Production.” *The American*
9 *Naturalist* 131(5): 757–59. <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/284817>.
- 10 Harder, Lawrence D., & Spencer. C. H. Barrett. 1996. “Patterns, Pollen Dispersal and
11 Mating Plants, in Animal-Pollinated.” In *Floral Biology*, eds. David G Lloyd &
12 Spencer. C. H. Barrett. International Thomson Publishing, 140–190.
- 13 Herrera, Carlos M. 1993. “Selection on Floral Morphology and Environmental
14 Determinants of Fecundity in a Hawk Moth-Pollinated Violet.” *Ecological*
15 *Monographs* 63(3): 251–75.
- 16 ———. 2002. “Interaction of Pollinators and Herbivores on Plant Fitness Suggests a
17 Pathway for Correlated Evolution of Mutualism- and Antagonism-Related Traits.”
18 *PNAS* 99(26): 16823–28.
19 <http://sipi.usc.edu/database/database.php?volume=misc&image=20#top>.
- 20 Herrera, Carlos M. 1988. “Variation in Mutualisms: The Spatio- Temporal Mosaic of a
21 Pollinator Assemblage.” *Biological Journal of the Linnean Society* 35: 95–125.
- 22 Hiscock, Simon J., & David A. Tabah. 2003. “The Different Mechanisms of Sporophytic
23 Self-Incompatibility.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological*
24 *Sciences* 358: 1037–45.
- 25 Horwath, William. 2007. “Carbon Cycling and Formation of Soil Organic Matter.” In *Soil*
26 *Microbiology and Biochemistry*, ed. Paul E Eldor. United States of America: Elsevier,
27 535.

- 1 Hunziker, Juan H. 1975. "On the Geographical Origin of *Larrea divaricata*
2 (Zygophyllaceae)." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62(2): 497–500.
3 <http://www.jstor.org/stable/2395211>.
- 4 Jacobsen, Deidra J., & Robert A. Raguso. 2018. "Lingering Effects of Herbivory and Plant
5 Defenses on Pollinators." *Current Biology* 28(19): R1164–69.
6 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.010>.
- 7 Jobbágy, Esteban G, and Robert B Jackson. 2001. "The Distribution of Soil Nutrients with
8 Depth : Global Patterns and the Imprint of Plants." *Biogeochemistry* 53: 51–77.
- 9 Johnson, S. G., L. F. Delph, & C. L. Elderkin. 1995. "The Effect of Petal-Size
10 Manipulation on Pollen Removal, Seed Set, and Insect-Visitor Behavior in
11 *Campanula americana*." *Oecologia* 102(2): 174–79.
- 12 Jones, Clive G, John H Lawton, & Moshe Shachak. 1994. "Organisms as Ecosystem
13 Engineers." *Oikos* 69: 373–86.
- 14 Jones, Clive G., John H. Lawron, & Moshe Shachak. 1997. "Positive and Negative Effects
15 of Organisms as Physical Ecosystem Engineers." *Ecology* 78(7): 1946–57.
- 16 Kearns, Carol A., David W. Inouye, & Nickolas M. Waser. 1998. "Endangered
17 Mutualisms: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions." *Annual Review of*
18 *Ecology and Systematics* 29(1): 83–112.
19 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83>.
- 20 Kearns, Carol Ann, & David William Inouye. 1993. *Techniques for Pollination Biologists*.
21 Niwot, Colorado: Univerisity press of Colorado.
22 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169534794901953>.
- 23 Kelly, Dave, Jenny J. Ladley, & Alastair W. Robertson. 2007. "Is the Pollen-Limited
24 Mistletoe *Peraxilla tetrapetala* (Loranthaceae) Also Seed Limited?" *Austral Ecology*
25 32(8): 850–57.
- 26 Kirkpatrick, H. Elizabeth. 1998. "Factors Affecting the Success of California Poppy
27 (*Eschscholzia Californica*) Introduced into Western Washington State." *Northwest*
28 *Science* 72(3): 180–89.

- 1 Klingenberg, C. P., S. Duttke, S. Whelan, & M. Kim. 2012. “Developmental Plasticity,
2 Morphological Variation and Evolvability: A Multilevel Analysis of Morphometric
3 Integration in the Shape of Compound Leaves.” *Journal of Evolutionary Biology*
4 25(1): 115–29.
- 5 Klingenberg, Christian Peter. 2011. “MorphoJ: An Integrated Software Package for
6 Geometric Morphometrics.” *Molecular Ecology Resources* 11(2): 353–57.
- 7 ———. 2015. “Analyzing Fluctuating Asymmetry with Geometric Morphometrics:
8 Concepts, Methods, and Applications.” *Symmetry* 7(2): 843–934.
- 9 Klingenberg, Christian Peter, & Jesús Marugán-Lobón. 2013. “Evolutionary Covariation in
10 Geometric Morphometric Data: Analyzing Integration, Modularity, and Allometry in a
11 Phylogenetic Context.” *Systematic Biology* 62(4): 591–610.
- 12 Klingenberg, Christian Peter, & S. McIntyre. 1998. “Geometric Morphometrics of
13 Developmental Instability : Analyzing Patterns of Fluctuating Asymmetry with
14 Procrustes Methods Author (s): Christian Peter Klingenberg and Grant S . McIntyre
15 Published by : Society for the Study of Evolution Stable URL : Http.” 52(5): 1363–75.
- 16 Knight, Tiffany M. *et al.* 2005. “Pollen Limitation of Plant Reproduction: Pattern and
17 Process.” *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36(1): 467–97.
18 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.36.102403.115320>.
- 19 Kozłowski, Jan. 1992. “Optimal Allocation of Resources to Growth and Reproduction:
20 Implications for Age and Size at Maturity.” *Trends in Ecology and Evolution* 7(1):
21 15–19.
- 22 Larson, Brendon M H, & Spencer C H Barrett. 2000. “A Comparative Analysis of Pollen
23 Limitation in Flowering Plants.” *Botanical Journal Of The Linnean Society* 69: 503–
24 20.
- 25 Lau, Tak-Cheung, X Lu, & Andrew G Stephenson. 1995. “Effects of Soil Fertility and
26 Mycorrhizal Infection on Pollen Production and Pollen Grain Size of *Cucurbita pepo*
27 (*Cucurbitaceae*).” *Plant, Cell and Environment* 18(2): 169–77.
- 28 Lau, Tak-Cheung, & Andrew Stephenson. 1994. “Effects of Soil Phosphorus on Pollen

- 1 Production , Pollen Size , Pollen Phosphorus Content , and the Ability to Sire Seeds in
2 *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae).” *Sex. Plant. Reprod* 7: 215–20.
- 3 Lescano, María Natalia, Alejandro G. Farji-Brener, Ernesto Gianoli, & Tomás A. Carlo.
4 2012. “Bottom-up Effects May Not Reach the Top: The Influence of Ant-Aphid
5 Interactions on the Spread of Soil Disturbances through Trophic Chains.” *Proceedings*
6 *of the Royal Society B: Biological Sciences* 279(1743): 3779–87.
- 7 Lia, Veronica V., Viviana A. Confalonieri, Cecilia I. Comas, & Juan H. Hunziker. 2001.
8 “Molecular Phylogeny of *Larrea* and Its Allies (Zygophyllaceae): Reticulate
9 Evolution and the Probable Time of Creosote Bush Arrival to North America.”
10 *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(2): 309–20. 10.1006/mpev.2001.1025.
- 11 Lloyd, David G, and Daniel J Schoen. 1992. “Self- and Cross-Fertilization in Plants. I.
12 Functional Dimensions.” *Int. J. Plant Sci.* 153(3): 358–69.
- 13 Marco, Diana E., Ana A. Calviño, & Sergio A. Páez. 2000. “Patterns of Flowering and
14 Fruiting in Populations of *Larrea divaricata* in Dry Chaco (Argentina).” *Journal of*
15 *Arid Environments* 44(3): 327–46.
- 16 Martin, Noland H. 2004. “Flower Size Preferences of the Honeybee (*Apis mellifera*)
17 Foraging on *Mimulus Guttatus* (Scrophulariaceae).” *Evolutionary Ecology Research*
18 6(5): 777–82.
- 19 Mclaughlin, Steven P *et al.* 2000. “Allocation of Resources to Flowering and Fruit
20 Production in *Hesperaloe Funifera* (Agavaceae).” *Journal of Arid Environments* 45:
21 99–110.
- 22 Meyer, Sebastian T., Inara R. Leal, Marcelo Tabarelli, & Rainer Wirth. 2011. “Ecosystem
23 Engineering by Leaf-Cutting Ants: Nests of *Atta cephalotes* Drastically Alter Forest
24 Structure and Microclimate.” *Ecological Entomology* 36(1): 14–24.
- 25 Miranda, Victoria *et al.* 2018. “Subterranean Desert Rodents (Genus *Ctenomys*) Create Soil
26 Patches Enriched in Root Endophytic Fungal Propagules.” *Microbial ecology*.
- 27 Mitteroecker, Philipp, & Philipp Gunz. 2009. “Advances in Geometric Morphometrics.”
28 *Evolutionary Biology* 36: 235–47.

- 1 Møller, Anders Pape, & Mats Eriksson. 1995. "Pollinator Preference for Symmetrical
2 Flowers and Sexual Selection in Plants." *Oikos* 73(1): 15–22.
- 3 Monteiro, Leandro R. 1999. "Multivariate Regression Models and Geometric
4 Morphometrics : The Search of Causal Factors in the Analysis of Shape." *System*
5 *Biology* 48(1): 192–99.
- 6 Morales, Carolina Laura, & Anna Traveset. 2009. "A Meta-Analysis of Impacts of Alien vs
7 . Native Plants on Pollinator Visitation and Reproductive Success of Co-Flowering
8 Native Plants." *Ecology Letters* 12: 716–28.
- 9 Muñoz, Alejandro A., Constanza Celedon-Neghme, Lohengrin A. Cavieres, & Mary T.K.
10 Arroyo. 2005. "Bottom-up Effects of Nutrient Availability on Flower Production,
11 Pollinator Visitation, and Seed Output in a High-Andean Shrub." *Oecologia* 143: 126–
12 35.
- 13 Mutikainen, Pia, & Lynda F Delph. 1996. "Effects of Herbivory on Male Reproductive
14 Success in Plants." *Oikos* 75(3): 353–58. <http://www.jstor.org/stable/3545874>.
- 15 Neal, Paul R., Amots Dafni, & Martin Giurfa. 1998. "Floral Symmetry and Its Role in
16 Plant-Pollinator System: Terminology, Distribution, and Hypothesis." *Annual Review*
17 *of Ecology and Systematics* 29(1): 345–73.
18 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.345>.
- 19 Nilsson, L. Anders. 1988. "The Evolution of Flowers with Deep Corolla Tubes." *Nature*
20 334(6178): 147–49.
- 21 Njoku, E. 1957. "The Effect of Mineral Nutrition and Temperature on Leaf Shape in
22 *Ipomoea Caerulea*." *New Phytologist*: 154–71.
- 23 Obeso, José Ramon. 2002. "The Costs of Reproduction in Plants." *New Phytologist* 155:
24 321–48.
- 25 Ohara, M, & S. Higashi. 1994. "Effects of Inflorescence Size on Visits from Pollinators and
26 Seed Set of *Corydalis ambigua* (Papaveraceae)." *Oecologia* 98: 25–30.
- 27 Ohashi, K., & T. Yahara. 2002. "Visit Larger Displays but Probe Proportionally of Nectar-

- 1 Collecting Behaviour Counterintuitive Flowers : Bumble Bees Achieves an Ideal Free
2 Distribution.” *Functional Ecology* 16(4): 492–503.
3 <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2435.2002.00644.x>.
- 4 Olivieri, Isabelle, Denis Couvet, & Montgomery Slatkin. 1994. “Allocation of
5 Reproductive Effort in Perennial Plants under Pollen Limitation.” *The American*
6 *Naturalist* 144(3): 373–94.
- 7 Pattison, R. R., G. Goldstein, & A. Ares. 1998. “Growth, Biomass Allocation and
8 Photosynthesis of Invasive and Native Hawaiian Rainforest Species.” *Oecologia*
9 117(4): 449–59.
- 10 Pitelka, Louis F. 1977. “Energy Allocations in Annual and Perennial Lupines (*Lupinus*:
11 Leguminosae).” *Ecology* 58(5): 1055–65. <https://www.jstor.org/stable/1936925>.
- 12 Poulton, Jennifer L., Roger T. Koide, and Andrew G. Stephenson. 2001. “Effects of
13 Mycorrhizal Infection and Soil Phosphorus Availability on in Vitro and in Vivo Pollen
14 Performance in *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae).” *American Journal of Botany*
15 88(10): 1786–93.
- 16 Primack, Richard B. 1979. “Reproductive Effort in Annual and Perennial Species of
17 Plantago (Plantaginaceae).” *The American Naturalist* 114(1): 51–62.
18 <https://www.jstor.org/stable/1936925>.
- 19 Rasmussen, Claus, & Jens M Olesen. 2000. “Oil Flowers and Oil-Collecting Bees.”
20 *Scandinavian Association for Pollination Ecology Honours Knut Faegri* 39: 23–31.
- 21 Reichman, O. J., & Eric W. Seabloom. 2002. “The Role of Pocket Gophers as Subterranean
22 Ecosystem Engineers.” *Trends in Ecology and Evolution* 17(1): 44–49.
- 23 Robertson, G. P., & P.M Groffman. 2007. “Nitrogen Transformations.” In *Soil*
24 *Microbiology and Biochemistry*, ed. Paul E Eldor. United States of America: Elsevier,
25 535.
- 26 Rodríguez, M Victoria, Mónica B Bertiller, & Alejandro Bisigato. 2007. “Are Fine Roots
27 of Both Shrubs and Perennial Grasses Able to Occupy the Upper Soil Layer ? A Case
28 Study in the Arid Patagonian Monte with Non-Seasonal Precipitation.” *Plant soil* 300:

- 1 281–88.
- 2 Rohlf, James F, & Leslie F Marcus. 1993. “A Revolution in Morphometrics.” *Trends in*
3 *ecology & evolution* 8(4): 129–32.
- 4 Roig, F. A., S. Roig-Juñent, & V. Corbalán. 2009. “Biogeography of the Monte Desert.”
5 *Journal of Arid Environments* 73(2): 164–72.
- 6 Roitman, German G. 1995. “Comportamiento Reproductivo de *Grindelia chiloensis*
7 (Asteraceae).” *Darwiniana* 33(1/4): 21–26. <http://www.jstor.org/stable/23222987>.
- 8 Rosas-Guerrero, Víctor *et al.* 2010. “Influence of Pollination Specialization and Breeding
9 System on Floral Integration and Phenotypic Variation in *Ipomoea*.” *Evolution* 65(2):
10 350–64.
- 11 Rossi, B. E., G. O. Debandi, I. E. Peralta, & E. Martinez Palle. 1999. “Comparative
12 Phenology and Floral Patterns in *Larrea* Species (Zygophyllaceae) in the Monte
13 Desert (Mendoza, Argentina).” *Journal of Arid Environments* 43(3): 213–26.
- 14 Santos, Rafaella Santana, Marcelo Braga Bueno Guerra, Bianca Giuliano Ambrogi, &
15 Leandro Sousa-Souto. 2017. “Nest Refuse of Leaf-Cutting Ants as a Growing
16 Substrate for Organic Farming Systems.” *organic agriculture*.
- 17 Schenk, H Jochen, & Robert B Jackson. 2002. “Rooting Depths , Lateral Root Spreads and
18 below-Ground / above-Ground Allometries of Plants in Water-Limited.” *Journal of*
19 *Ecology* 90: 480–94.
- 20 Schiestl, Florian P., & Steven D. Johnson. 2013. “Pollinator-Mediated Evolution of Floral
21 Signals.” *Trends in Ecology and Evolution* 28(5): 307–15.
22 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.019>.
- 23 Seavey, Steven R., & Kamaljit S. Bawa. 1986. “Late-Acting Self-Incompatibility in
24 Angiosperms.” *Botanical Review* 52(2): 195–219.
- 25 Shipley, Bill. 2000a. “A New Inferential Test for Path Models Based on Directed Acyclic
26 Graphs.” *Structural Equation Modeling* 7(2): 206–18.
- 27 ———. 2000b. *Cause and Correlation in Biology*. first. Sherbrooke: Cambridge
28 University.

- 1 ———. 2009. “Confirmatory Path Analysis in a Generalized Multilevel Context.” *Ecology*
2 90(2): 363–68.
- 3 Simpson, Beryl B. 1977. “Breeding Systems of Dominant Perennial Plants of Two Disjunct
4 Warm Desert Ecosystems.” *Oecologia* 27(3): 203–26.
- 5 Simpson, Beryl B, John L Neff, & Gregg Dieringer. 1990. “The Production of Floral Oils
6 by *Monttea* (Scrophulariaceae) and the Function of Tarsal Pads in *Centris* Bees.”
7 *Plant Systematics and Evolution* 173(3–4): 209–22.
- 8 Sousa-souto, Leandro *et al.* 2011. “Increased CO² Emission and Organic Matter
9 Decomposition by Leaf-Cutting Ant Nests in a Coastal Environment.” *Soil Biology*
10 *and Biochemistry*: 1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.09.008>.
- 11 Sousa-Souto, Leandro, José H. Schoederer, Carlos Ernesto G. R. Schaefer, & Washington
12 L. Silva. 2008. “Ant Nests and Soil Nutrient Availability: The Negative Impact of
13 Fire.” *Journal of Tropical Ecology* 24(06): 639–46.
14 http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0266467408005464 (June 16, 2014).
- 15 Sousa, Wayne P. 1984. “The Role of Disturbance in Natural Communities.” *Annual*
16 *Reviews in Ecological Systems* 15: 353–91.
- 17 Stanton, Maureen L., Allison A. Snow, & Steven N. Handel. 1986. “Floral Evolution:
18 Attractiveness to Pollinators Increases Male Fitness.” *Science* 232(4758): 1625–27.
- 19 Stephenson, Andrew G., Steven E. Travers, Jorge I. Mena-Ali, & James A. Winsor. 2003.
20 “Pollen Performance before and during the Autotrophic-Heterotrophic Growth
21 Transition.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*
22 358(1434): 1009–18.
- 23 Tadey, Mariana. 2011. “Reproductive Biology of *Monttea aphylla* (Scrophulariaceae).”
24 *Australian Journal of Botany* 59: 713–18.
- 25 Tadey, Mariana, & Marcelo A. Aizen. 2001. “Why Do Flowers of a Hummingbirds-
26 Pollinated Mistletoe Face Down?” *Functional Ecology* 15: 782–90.
- 27 Tadey, Mariana, & Alejandro G. Farji-brener. 2007. “Indirect Effects of Exotic Grazers:
28 Livestock Decreases the Nutrient Content of Refuse Dumps of Leaf-Cutting Ants

- 1 through Vegetation Impoverishment.” *Journal of Applied Ecology* 44: 1209–18.
- 2 Tadey, Mariana, & Alejandro G. Farji-Brener. 2016. “Consequences of Leaf-Cutting Ants
3 on Plant Fitness: Integrating Negative Effects of Herbivory and Positive Effects from
4 Soil Improvement.” *Insectes Sociaux*.
- 5 Tadey, Mariana, & Cintia P. Souto. 2016. “Unexpectedly, Intense Livestock Grazing in
6 Arid Rangelands Strengthens the Seedling Vigor of Consumed Plants.” *Agronomy for
7 Sustainable Development* 36(4): 1–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-016-0400-z>.
- 8 Tadey, Mariana, Jorge C Tadey, & Natalia Tadey. 2009. “Reproductive Biology of Five
9 Native Plant Species from the Monte Desert of Argentina.” *Botanical Journal Of The
10 Linnean Society* 161(2): 190–201.
11 http://apps.isiknowledge.com/InboundService.do?product=WOS&action=retrieve&SrcApp=Papers&UT=000270958200008&SID=3Acbe28OLjgg7fFngC2&Init=Yes&SrcAuth=mekentosj&mode=FullRecord&customersID=mekentosj&DestFail=http%3A%2F%2Faccess.isiproducts.com%2Fcustom_imag.
- 15 Thompson, Ken A., & Marc T.J. Johnson. 2016. “Antiherbivore Defenses Alter Natural
16 Selection on Plant Reproductive Traits.” *Evolution* 70(4): 796–810.
- 17 Thomson, James D. 2001. “Using Pollination Deficits to Infer Pollinator Declines : Can
18 Theory Guide Us ?” *Conservation Ecology* 5(1).
19 <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art6/>.
- 20 Tibbett, M. 2000. “Roots, Foraging and the Exploitation of Soil Nutrient Patches: The Role
21 of Mycorrhizal Symbiosis.” *Functional Ecology* 14(3): 397–99.
- 22 Totland, Ørjan *et al.* 1998. “Variation in Pollen Limitation among Plants and Phenotypic
23 Selection on Floral Traits in an Early-Spring Flowering Herb.” *Oikos* 82(3): 491–501.
24 <http://www.jstor.org/stable/3546370?origin=crossref>.
- 25 Valla, Juan J. 1979. *Botánica: Morfología de Las Plantas Superiores*. 1°. Buenos Aires:
26 Editorial hemisferio sur.
- 27 Voroney, R. P. 2007. “The Soil Habitat.” In *Soil Microbiology and Biochemistry*, ed. Paul
28 Eldor. United States of America: Elsevier, 25–49.

- 1 Wagner, D. (1997). The influence of ant nests on *Acacia* seed production, herbivory and
2 soil nutrients. *British Ecological Society*, 85(1), 83–93.
- 3 Ward, David, Kerstin Wiegand, & Stephan Getzin. 2013. “Walter ’ s Two-Layer
4 Hypothesis Revisited : Back to the Roots!” *Oecologia* 172: 617–30.
- 5 White, Peter S. 1979. “Pattern, Process, and Natural Disturbance in Vegetation.” *The*
6 *Botanical Review* 45(3): 229–99.
- 7 Wootton, J Timothy. 1994. “The Nature and Consequences of Indirect Effects in Ecological
8 Communities.” *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 443–66.
- 9 Yoshihara, Y. *et al.* 2010. “Pollinators Are Attracted to Mounds Created by Burrowing
10 Animals (Marmots) in a Mongolian Grassland.” *Journal of Arid Environments* 74(1):
11 159–63. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140196309001724> (August 29,
12 2014).
- 13 Young, Helen J., & Maureen L. Stanton. 1990. “Influence of Environmental Quality on
14 Pollen Competitive Ability in Wild Radish.” *Science* 248(4963): 1631–33.
15 <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.248.4963.1631>.
- 16 Zelditch, Miriam Leah, Barbara L. Lundrygan, & Theodore Garland Jr. 2004.
17 “Developmental Regulation of Skull Morphology I: Ontogenetic Dynamics of
18 Variance.” *Evolution & development* 6(3): 194–206.
19 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1525-142X.2004.04025.x/full>.
- 20
- 21

Refuse attracts? Effect of refuse dumps of leaf-cutting ants on floral traits

ANAHÍ FERNANDEZ,*  MARIANA TADEY  AND ALEJANDRO G. FARJI-BRENER 

Laboratorio Ecotono, Inibionta-Conicet, Pasaje Gutiérrez 1125, Bariloche 8400, Argentina (Email: anahi.r.fernandez@gmail.com)

Abstract The nutrient-rich organic waste generated by ants may affect plant reproductive success directly by enhancing fruit production but also indirectly, by affecting floral traits related with pollinator attraction. Understanding how these soil-nutrient hot spots influence floral phenotype is relevant to plant–pollination interactions. We experimentally evaluated whether the addition of organic waste from refuse dumps of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae: Attini) alters floral traits associated with pollinator attraction in *Eschscholzia californica* (Ranunculales: Papaveraceae), an entomophilous herb. We analysed flower shape and size using geometric morphometric techniques in plants with and without the addition of refuse-dumps soil, under greenhouse conditions. We also measured the duration of flowering season, days with new flowers, flower production and floral display size. Plants growing in refuse-dumps soil showed higher flower shape diversity than those in control soil. Moreover, plants in refuse-dumps soil showed bigger flower and floral display size, longer flowering season, higher number of flowering days and flower production. As all these variables may potentially increase pollinator visits, plants in refuse-dumps soil might increase their fitness through enhanced attraction. Our work describes how organic waste from ant nests may enhance floral traits involved in floral attraction, illustrating a novel way of how ants may indirectly benefit plants.

Key words: *Acromyrmex lobicornis*, floral traits, geometric morphometric, leaf-cutting ants, soil nutrients.

INTRODUCTION

Floral traits are fundamental for ensuring reproductive success in plants that rely on biotic pollination. Pollinators can associate floral colour, size and/or shape with nutritional rewards like nectar, pollen or oils (Tadey 2012; Schiestl & Johnson 2013). For example, greater corolla sizes enhance visual attraction and, therefore, pollinator visitation frequency in several plant species (Grindeland *et al.* 2005; Gómez *et al.* 2008a). On the other hand, floral morphology may also facilitate the landing and contact between reproductive parts of the plants and floral visitors (Nilsson 1988; Tadey & Aizen 2001). Accordingly, changes in corolla shape among related species and, even, within the same plant species often attract different kinds of pollinators (Gómez *et al.* 2008b). As the expression of most of floral traits depends on nutritional plant level (Gardener & Gillman 2001), understanding how changes in the surrounding environmental conditions influence floral phenotype is particular relevant to plant–pollination interactions.

Soil nutrients may affect floral traits directly increasing the number of flowers, but also indirectly influencing the interactions of plants with their pollinators (Campbell & Halama 1993). For example,

fertilized plants of *Ipomopsis aggregata* produced flowers with wider corolla, more nectar and longer periods of blooming than non-fertilized plants, receiving more floral visitors (Burkle & Irwin 2009). Similarly, plants of *Chuquiraga oppositifolia* under nitrogen-enrichment treatments produced more flowers per individual than control plants, enhancing pollinator visitation frequency (Muñoz *et al.* 2005). However, these works used artificial fertilizers instead of natural nutrient sources, such as nutrient-enriched soil as a consequence of the accumulation and decomposition of organic matter (Peinemann 1998; Voroney & Heck 2007). Experiments using natural organic matter are thus more realistic than the addition of commercial fertilizers (Tibbett 2000). Despite this, few studies use naturally enriched substrates to study the effect of nutrient addition on floral traits. For example, plants of *Cucumis sativus* growing on soils enriched with vermicomposting had heavier flowers and pollen with higher protein content than control plants, receiving more and longer pollinators visits per flower (Cardoza *et al.* 2012). In sum, more studies using natural nutrient sources are needed to understand what really happens in nature and how we can improve floral attraction in agricultural fields.

One of the major natural sources of soil nutrients in the Neotropics is the organic waste produced by leaf-cutting ants (Farji-Brener & Werenkraut 2015).

*Corresponding author.

Accepted for publication July 2018.

These ants collect vegetable material to feed a symbiotic fungus, which is the main food source for their larvae (Hölldobler & Wilson 1990). The vegetable material not processed by the fungus is accumulated in internal specific chambers or in external piles on the soil surface (Farji-Brener *et al.* 2016). Several studies have shown that this organic waste (hereafter, refuse dump) have more nutrients than adjacent soils (reviewed in Farji-Brener & Werenkraut 2015), which is accessible to neighbouring plants (da S L Sternberg *et al.* 2007; Farji-Brener & Ghermandi 2008). Consequently, plants growing on, or near external refuse dumps, and those that reach internal refuse chambers through their root system often show higher growth, biomass and reproduction rate than those plants growing on adjacent, control soils (Farji-Brener & Werenkraut 2015).

The enhanced fitness in plants associated with refuse-dump soil can be a direct consequence of a higher assignation of nutrients to flower and fruit production (Farji-Brener & Ghermandi 2008). However, increased plant fitness may also be an indirect consequence of changes in floral traits involved in floral attraction, enhancing pollinator visitation rate. Here, we hypothesize that a natural nutrient source affects the attractiveness of floral traits. To test this, we experimentally added refuse-dump soil of the leaf-cutting ant, *Acromyrmex lobicornis* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Attini), on plants of *Eschscholzia californica* Cham. (Ranunculales: Papaveraceae), an insect pollinated herb. We have focused our study in floral traits that are associated with pollinators attraction and that can be potentially affected by nutrient addition (Campbell & Halama 1993; Muñoz *et al.* 2005; Cardoza *et al.* 2012), particularly in flower shape, a less studied floral trait that play a key role in pollination (Gómez *et al.* 2008b). Previous studies found that leaf shape varies in response to the addition of fertilizers (Njoku 1957; Gosler *et al.* 1994). Given that petals (and sepals) are modified leaves (Coen & Meyerowitz 1991), increasing nutrient content may affect flower shape. Specifically, we predict that plants growing in refuse-dump soil will produce bigger flowers with different shapes, than the plants growing on control soil. At plant level, we also expect that the access to a nutrient-rich substrate produces plants with more extended flowering season, increases flower production and enlarges floral display, all enhancing visual traits that potentially attract flower visitors.

METHODS

Study species

Eschscholzia californica, California poppy, is an annual herb native to North America that is well adapted to disturbed

areas of Patagonian steppes (Correa 1984). In the study area, it is commonly found growing near or even in the refuse dumps of leaf-cutting ants (personal observation, Appendix S1). This species is partially self-compatible but depends on biotic pollination. Honeybees, bumblebees and some solitary hymenopterans are its main pollinators (Cook 1962). We consider this herb to be a good model to test our hypothesis because it is well adapted to poor soils like those where *A. lobicornis* colonies are found (Kirkpatrick 1998). In addition, unlike most Patagonian herbs, *E. californica* has fast growth and large flowers, which enable us to grow it in greenhouse conditions and manipulate the flowers to apply geometric morphometric techniques (Fig. 1a).

Acromyrmex lobicornis is the only leaf-cutting ant inhabiting Patagonia and is frequent to find it in disturbed roadside areas of Patagonian steppe (Farji-Brener & Ruggiero 1994). It constructs dome-shaped nest mounds (1 m high and wide) made of dry twigs and soil. Nearby the dome, the ants place a few flat piles of refuse dumps (hereafter RD), accessible to neighbouring plants (Farji-Brener & Ghermandi 2000). These RD have a higher content of organic matter and nutrients; water retention capacity and microbial activity than adjacent soils (Table 1) (Tadey & Farji-Brener 2007; Fernandez *et al.* 2014).

Greenhouse experiment

During April of 2015, we sowed seeds of *E. californica* under two substrate treatments: control soils (C) and ant refuse-dump soil (RD). We collected both substrates from a steppe region near S. C. Bariloche city (40° 53'40" S 71° 02'12" W). We randomly selected 10 nests of *A. lobicornis* and collected samples of their refuse-dump and control soils that were at least 2 m away from each ant nests. Levels of nutrient enrichment of the refuse-dump samples showed relatively low levels of variation among them (Table 1). Therefore, we pooled all the refuse-dump soil samples in a single composed sample and compared it with a composed sample from control areas. Then, we used those composed samples to sow the seeds of *E. californica*. A total of 74 seeds (one per pot, 37 per treatment) were sown in pots of 1.6 L and regularly watered.

Floral traits

In the greenhouse, 7 months after sowing, we measured the floral traits. In each plant, at flower level we measured flower shape and size using geometric morphometric methods. We took pictures of all the flowers under standardized conditions to avoid scale and co-planarity errors at moment of digitalization (Zelditch *et al.* 2004). We cut the flowers, flattened and adhered them to a white cardboard sheet located horizontally at 50 cm below a digital camera on a tripod. This technique is very useful to perform flower measurements, however, is partially destructive (i.e. flowers are cut from the plant), which together with the fact that plants were growing in a greenhouse, prevented us to estimate pollinator visitation frequency. On the other hand, at plant level, we registered: duration of flowering season



Fig. 1. Flower shape of *Eschscholzia californica*: (a) flower in nature; (b) planar picture of the flower with schematic representation of the 16 landmarks (LMs) (black dots) used in this study. The LMs were depicting the following criteria: LMs 1 and 5 are the points of maximum curvature at the middle of superior petals, whereas LMs 3 and 7 are for the inferior petals; LMs 9, 10, 11, 12, 13, 15 and 16 are the points of maximum curvature on petal sides; LMs 2, 4, 6 and 8 are the intersection points between adjacent petals.

Table 1. Mean nutrients concentration (\pm SE) for control (C) and refuse dumps from *Acromyrmex lobicornis* nest (RD) substrates. *F* and *P* values correspond to MANOVA, univariate results

	C	RD	<i>F</i>	<i>P</i>
C (%)	0.34 \pm 0.03	21.56 \pm 2.14	98.4	<0.001
N (%)	0.03 \pm 0.00	2.4 \pm 0.42	31.8	<0.001
P (μ g g ⁻¹ substrate)	6.22 \pm 1.1	223.5 \pm 29.1	55.7	<0.001
K (g kg ⁻¹ substrate)	0.17 \pm 0.01	4.9 \pm 0.47	103.5	<0.001

(numbers of days between the first and last day with flowers), days with new open flowers, total flower production and size of floral display (i.e. number of open flower per day). Once, flowering season was over, we weighed vegetative biomass of all individuals.

Data analysis

The methodology of geometric morphometry allows the statistical analysis of the shape of biological structures independently of their orientation, position or size, through a superimposition method (Rohlf & Marcus 1993). This methodology represents the shape of these structures through the configuration of Cartesian landmarks coordinates in two- or three-dimensional spaces (Mitteroecker & Gunz 2009). We defined a configuration of 16 landmarks (LM) to represent the flower shape of *E. californica* (Fig. 1b). To plot the LMs on our specimens (i.e. flowers) we used the free software tpsDigver 2. All LMs were plotted by the same person to minimize potential biases of visual perception. We used 'centroid size' (CS) as estimator of size, defined as the square root of the summed squared distances of each landmark from the centre of the flower (Mitteroecker & Gunz 2009). For morphometric analysis, we used free software MorphoJ 1.06 d (Klingenberg 2011). To detect a possible allometry effect (i.e. shape variations owing to size variations), we fitted a multivariate regression model (i.e. shape *vs.* size) (Monteiro 1999). For further analysis, we used regression residuals to avoid allometry effect

(Klingenberg & Marugán-Lobón 2013). We used a Principal Components Analysis (PCA) to describe patterns of shape dispersion in both treatments (Klingenberg 2011) and discriminant analysis to detect statistical differences between them (Campbell & Atchley 1981).

To compare the effect of refuse-dump soil on flower size (CS), total production of flowers, length of flowering season and number of days with new flowers, we performed a multivariate analysis of variance (MANOVA) with substrate type as a fixed factor. We tested normality by a Shapiro–Wilk test and variance homogeneity by a Levene's test. Data were log transformed when necessary. To analyse the effect of both substrates on display size along flowering season, we used a repeated measures analysis of variance (ANOVA), using the mean display size per week calculated from the second week of October to the first week of April.

RESULTS

Flowering season started in October 2015 and ended in April 2016, 100% of RD and 85% of C individuals produced at least one flower along the flowering season.

Floral traits at flower level

We obtained 75 digital pictures of flowers from 32 plants growing on RD and 51 flowers of 27 plants

growing on C treatments, to analyse their size and shape with geometric morphometric techniques. Flowers of RD plants were larger ($F_{(1, 52)} = 5$, $P = 0.02$, Fig. 3a) than C flowers, however, only 12.3% of the total shape variation was due to the size (i.e. allometry effect ($P < 0.001$)). When analysing the residuals with a PCA, the first two axes explained 70% of the total variance (59% and 11% respectively). Along axis 1, flower shape was associated with the variation in the position of LMs depicting petals intersections (i.e. LMs = 2, 4, 6 and 8; Fig. 2a). Towards the left of Axis 1, LMs 2, 4, 6 and 8 were near the centroid of the shape while towards the right, LMs were closer to flower perimeter (Fig. 2a). Along Axis 2, the shape varied inconsistently without a clear pattern (Fig. 2a). In addition, neither of both substrate treatments affected the floral symmetry (Appendix S1). In addition, the shape of the flowers produced by RD plants showed higher dispersion than those in C plants (Fig. 2a). Despite some overlapping, flowers from RD plants showed different shapes than flowers from C plants ($T^2 = 60.4$, $P = 0.03$, Fig. 2b). Furthermore, some of the shapes were only found in one substrate type (Fig. 2b). Overall, flowers from C plants showed LMs of petal intersection more closer to the centroid than those from RD (Fig. 2b).

Floral traits at plant level

Refuse-dump soil affected all floral traits measured at plant level (MANOVA, Wilk's $\lambda = 0.51$, $F_{(4, 49)} = 12.3$, $P < 0.001$). RD plants showed greater floral display (i.e. number of open flower per day; $F_{(1, 70)} = 53.9$, $P < 0.001$, Fig. 4), longer flowering season ($F_{(1, 52)} = 8.2$, $P = 0.05$, Fig. 3b), greater number of days with new flowers ($F_{(1, 52)} = 40.7$, $P < 0.001$, Fig. 3c) and higher flower production than C plants ($F_{(1, 52)} = 43.1$, $P < 0.001$, Fig. 3d). The higher floral display of RD plants was observed in four intervals of flowering season ($F_{\text{week } (24, 70)} = 16.5$, $P < 0.001$, Fig. 4). There was also an interaction between the substrate and the interval of flowering season (i.e. week) ($F_{(24, 70)} = 12.3$, $P < 0.001$, Fig. 3), RD plants showed four prominent flowering peaks, whereas the floral display by C plants was similar during all the flowering season (Fig. 4). In addition, vegetative biomass for individual growing on RD was higher than C plants ($t_{(35)} = 8.9$, $P < 0.001$) (Appendix S1).

DISCUSSION

Our work describes how organic waste from ant nests change floral traits associated with pollinators

attraction, illustrating an indirect novel effect of ants on plants (Campbell & Halama 1993; Gardener & Gillman 2001). Specifically, we experimentally demonstrated that the addition of *A. lobicornis* refuse dumps (RD), a nutrient-rich substrate, greatly affects the floral traits of *E. californica* both at flower and plant level. At flower level, plants growing in RD showed higher variation in shape and produced 1.1-fold larger flowers than control plants. At plant level, individuals growing in RD substrate showed 1.5-fold longer flowering season length, 3.4 higher flower production and up to 7.4 larger floral display size than plants growing in control soils. All these traits affect pollinator assemblage composition and their foraging behaviour, with potential consequences on plant reproduction.

Plants attractiveness may occur at flower level by changes in shape, size, scent, colour and/or rewards (Galen & Newport 1988; Rosas-Guerrero *et al.* 2014). The addition of nutrients may allow the plant to allocate more resources for improving flower attraction (Muñoz *et al.* 2005; Burkle & Irwin 2009). We found that the addition of RD significantly varied flower shape and increased its size. Previous works have observed that bigger flowers are preferred by both of the mainly pollinators of *E. californica*, *Apis mellifera* and *Bombus* sp. (Johnson *et al.* 1995; Martin 2004). Moreover, flower size is positively associated with rewards availability, explaining the increased pollinator visitation frequency to larger flowers (Campbell *et al.* 1991; Gómez *et al.* 2008a). Although less studied, flower shape is also an important trait for pollinator attraction because it may affect the detection capacity (i.e. visual cue) and efficiency (i.e. increasing contact) of different floral visitors. Hymenopterans can detect intraspecific variations in floral shape, and their preference over it varies among different functional groups (Gómez *et al.* 2008b). Interestingly, we found that the addition of RD produced greater variation in flower shape, potentially enhancing the range of different floral visitors respect to C plants. In general, RD shapes have larger petal area with smaller gaps between them, leading to a more spherical flower shape than control ones, whose shapes were more star like (Fig. 2b). This more spherical shape could be more visible for pollinators at long distance than star-like shape. Overall, the change in flower shape and size found in this work may affect the identity and visitation frequency of pollinators (Gómez *et al.* 2008b).

Floral attractiveness is also influenced by floral traits at plant level. A higher flower production along an extended flowering season may enhance pollination effectiveness through the visitation of a wider range of pollinator abundance and richness (Appendix S1) (Herrera 1988; Fishbein & Venable 1996; Bosch *et al.* 1997). In addition, a larger number

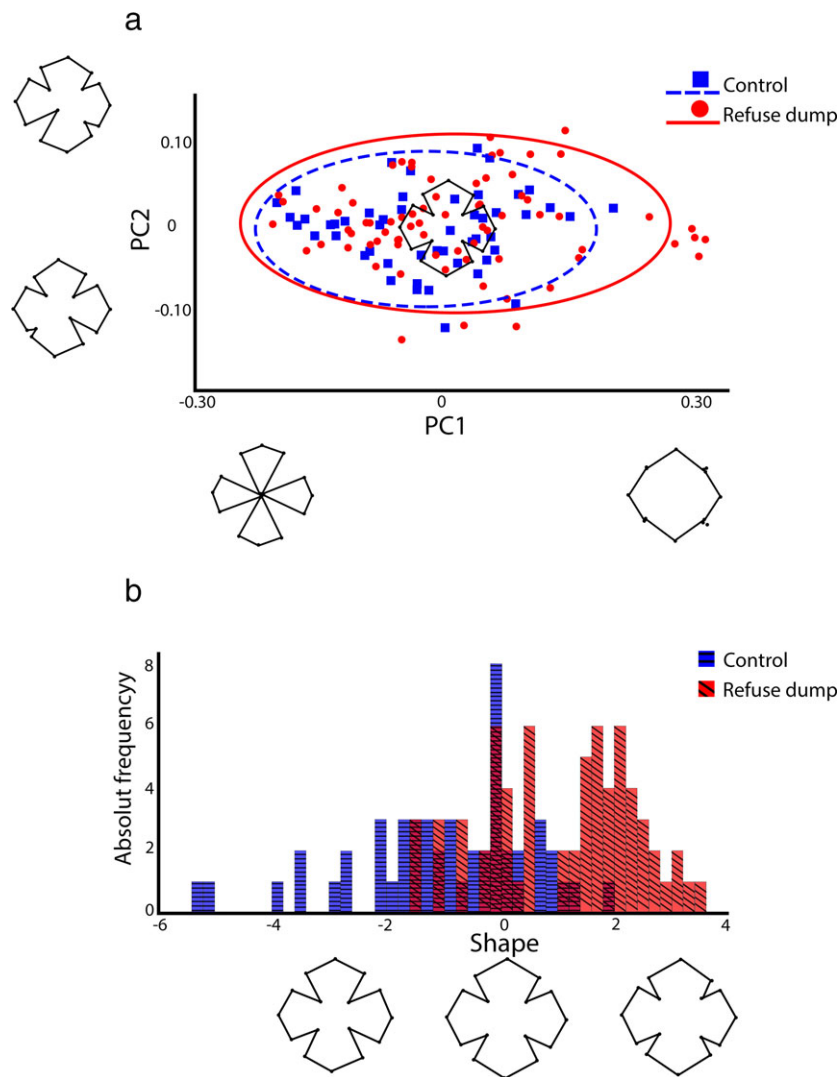


Fig. 2. (a) Scatterplot of the two-first Principal Components that explained 70% the total variance of floral shape (59% and 11% respectively). Floral schemes in the centre of points cloud represent the mean flower shape (i.e. consensus flower) and schemes at the end of the axes (PC1 and PC2) represent the extreme variations in flower shape along them. Circle points represent flowers from plants that grew on refuse dump and square points were from plants growing on control soil. Ellipses depict the 95% confidence intervals, dotted line corresponds to C treatment and continuous line to RD treatment. (b) Histograms showing the absolute frequency of different shapes produced by individuals of *Eschscholzia californica* growing under two substrate treatments; control soil (C, bars with horizontal lines) and refuse dump from *Acromyrmex lobicornis* nest (RD, bars with diagonal lines). Below horizontal axis, the central floral scheme represents the mean shape (i.e. consensus flower), whereas the scheme at left represents the shapes that are found only in Control plants and at right those only found in RD plants. Both treatments (RD *vs.* C) showed a significantly different flower shape.

of flowers per plant may increment flower fecundity and seed production through increased visitation frequency (Ohara & Higashi 1994). From a pollinator perspective, an extended blooming may lead to better opportunities of reward availability, both in quantity and quality, considering that bees and bumblebees are able to learn the locations of good resources (Chittka *et al.* 1999). In this way, plants with more open flowers usually receive more pollinator's visits (Grindeland *et al.* 2005). On the other hand,

hymenopterans are usually more attracted to bigger floral display because of its conspicuousness and visual impact. Moreover, bigger floral display offers higher amount of rewards than smaller floral display reducing foraging costs (Eckhart 1991; Ohara & Higashi 1994). Although we were not able to register pollinator visitation frequency in our sampling plants because of experimental limitations, as they were growing in greenhouse conditions, it is known that the floral traits discussed above enhance pollinator

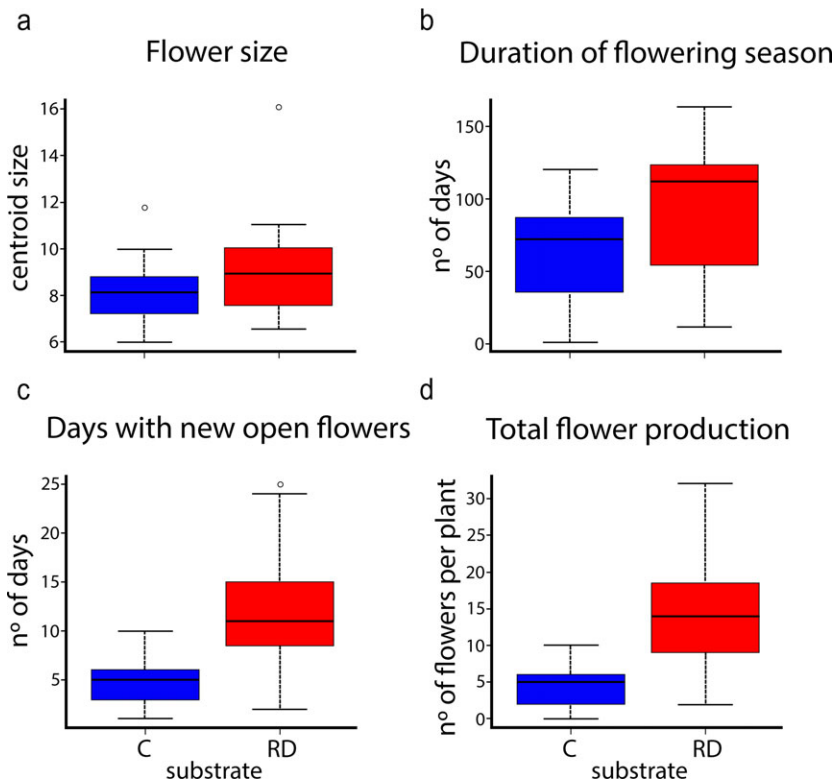


Fig. 3. Effect of substrate treatments, controls soil (C) and refuse dump (RD) on the median and interquartile ranges (empty circles are outliers) of the following response variables measured in *Eschscholzia californica*: (a) flower size estimated as centroid size (CS), defined as the square root of the summed squared distances of landmarks from the centre of the form; (b) duration of flowering season (number of days between the first and last day with new flowers); (c) days with new flower; (d) total number of flower produced along flowering season.

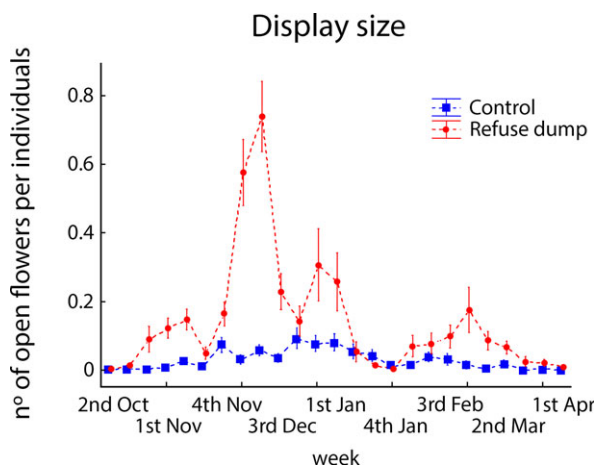


Fig. 4. Mean display size \pm SE for both substrates treatments, control soil (C, square points) and refuse dump from *Acromyrmex lobicornis* nest (RD, circle points). Display size is defined as the number of open flower per individual of *Eschscholzia californica* in the same day, and was measured along the flowering season from the 2nd week of October to the 1st week of April (spring to autumn).

attraction and reproductive success of plants (Herrera 1993; Grindeland *et al.* 2005). Future field experiments should confirm whether these changes in floral traits effectively affect pollinator visitation frequency and plant fitness in *E. californica*.

In natural conditions, plants growing on, or near, ant nests often show a higher reproductive success than plants growing far from them (Farji-Brener & Werenkraut 2017). The most common explanation of this pattern is that plants are able to allocate the nutrients obtained from refuse-dump soil to increase the production of flowers and fruits (Farji-Brener & Ghermandi 2008). Our results suggest another indirect way by which ants, through the production of nutrient-rich organic waste, may benefit plants: promoting changes in floral traits associated with pollinator attraction. Therefore, plants accessing ant organic waste not only can increase their flower and fruit production but also show flowers more attractive to pollinators. The relative importance of these two complementary effects deserves further studies. Overall, our results may have conceptual and applied implications. First, they illustrate how indirect effects

may act in nature, emphasizing that an ecological pattern may be consequence of several complementary processes. Secondly, the use of refuse-dump soil as a natural fertilizer can be useful in restorations practices that need to enhance pollinator services, especially in poor soil ecosystems.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to Florencia Baudino, Santiago Aisen and Patricia Suarez for their collaboration in greenhouse tasks.

REFERENCES

- Bosch J., Retana J. & Cerdá X. (1997) Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous Mediterranean plant community. *Oecologia* **109**(4), 583–91.
- Burkle L. A. & Irwin R. E. (2009) The effects of nutrient addition on floral characters and pollination in two subalpine plants, *Ipomopsis aggregata* and *Linum lewisii*. *Plant Ecol.* **203**(1), 83–98.
- Campbell N. A. & Atchley W. R. (1981) The geometry of canonical variate analysis. *Syst. Biol.* **30**(3), 268–80.
- Campbell D. R. & Halama K. J. (1993) Resource and pollen limitations to lifetime seed production in a natural plant population. *Ecology* **74**(4), 1043–51.
- Campbell D. R., Waser N. M., Price M. V., Lynch E. A. & Mitchell R. J. (1991) Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* **45**(6), 1458–67.
- Cardoza Y. J., Harris G. K. & Grozinger C. M. (2012) Effects of soil quality enhancement on pollinator-plant interactions. *Psyche* **2012**, 1–8.
- Chittka L., Thomson J. D. & Waser N. M. (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* **86**(8), 361–77.
- Coen E. S. & Meyerowitz E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**(6339), 31.
- Cook S. A. (1962) Genetic system, variation, and adaptation in *Eschscholzia californica*. *Evolution* **16**(3), 278–99.
- Correa M. N. (1984) Dicotyledoneas daliapetales (Salicacea a Cruciferae). In: *Flora Patagónica* (ed M. N. Correa). INTA, Buenos Aires.
- Eckhart V. M. (1991) The effects of floral display on pollinator visitation vary among populations of *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evol. Ecol.* **5**(4), 370–84.
- Farji-Brener A. G. & Ghermandi L. (2000) The influence of nests of leaf-cutting ants on plant species diversity in road verges of northern Patagonia. *J. Veg. Sci.* **11**, 453–60.
- Farji-Brener A. G. & Ghermandi L. (2008) Leaf-cutting ant nests near roads increase fitness of exotic plant species in natural protected areas. *Proc. R. Soc. B.* **275**, 1431–40.
- Farji-Brener A. G. & Ruggiero A. (1994) Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sizes. *J. Biogeogr.* **21**, 391–9.
- Farji-Brener A. G. & Werenkraut V. (2015) A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. *Ecol. Entomol.* **40**(2), 150–8.
- Farji-Brener A. G. & Werenkraut V. (2017) The effects of ant nests on soil fertility and plant performance: a meta-analysis. *J. Anim. Ecol.* **86**(4), 866–77.
- Farji-Brener A. G., Elizalde L., Fernández-Marín H. & Amador-Vargas S. (2016) Social life and sanitary risks: evolutionary and current ecological conditions determine waste management in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. B.* **283**(1831), 1–7.
- Fernandez A., Farji-Brener A. G. & Satti P. (2014) Moisture enhances the positive effect of leaf-cutting ant refuse dumps on soil biota activity. *Austral Ecol.* **39**(2), 198–203.
- Fishbein M. & Venable D. L. (1996) Diversity and temporal change in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*. *Ecology* **77**(4), 1061–73.
- Galen C. & Newport M. E. A. (1988) Pollination quality, seed set, and flower traits in *Polemonium viscosum*: complementary effects of variation in flower scent and size. *Am. J. Bot.* **75**, 900–5.
- Gardener M. C. & Gillman M. P. (2001) The effects of soil fertilizer on amino acids in the floral nectar of corncockle, *Agrostemma githago* (Caryophyllaceae). *Oikos* **92**, 101–6.
- Gómez J. M., Bosch J., Perfectti F., Fernández J. D., Abdelaziz M. & Camacho J. P. M. (2008a) Association between floral traits and rewards in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *Ann. Bot.* **101**(9), 1413–20.
- Gómez J. M., Bosch J., Perfectti F., Fernández J. D., Abdelaziz M. & Camacho J. P. M. (2008b) Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proc. R. Soc. B.* **275**(1648), 2241–9.
- Gosler A. G., Kelly C. K. & Blakey J. K. (1994) Phenotypic plasticity in leaf morphology of *Crataegus monogyna* (Rosaceae): an experimental study with taxonomic implications. *Bot. J. Linn. Soc.* **115**(3), 211–9.
- Grindeland J. M., Sletvold N. & Ims R. A. (2005) Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Funct. Ecol.* **19**(3), 383–90.
- Herrera C. M. (1988) Variation in mutualisms: the spatiotemporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biol. J. Linn. Soc.* **35**(2), 95–125.
- Herrera C. M. (1993) Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. *Ecol. Monogr.* **63**(3), 251–75.
- Hölldobler B. & Wilson E. O. (1990). *The Ants*. Belknap, Harvard University Press, Cambridge. *Science*, **248** (4957), 897–8.
- Johnson S. G., Delph L. F. & Elderkin C. L. (1995) The effect of petal-size manipulation on pollen removal, seed set, and insect-visitor behavior in *Campanula americana*. *Oecologia* **102**, 174–9.
- Kirkpatrick H. E. (1998). Factors affecting the success of California poppy (*Eschscholzia californica*) introduced into western Washington State. *Northwest Sci.* **72**(3), 180–9.
- Klingenberg C. P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**(2), 353–7.
- Klingenberg C. P. & Marugán-Lobón J. (2013) Evolutionary covariation in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in a phylogenetic context. *Syst. Biol.* **62**(4), 591–610.

- Martin N. (2004) Flower size preferences of the honeybee (*Apis mellifera*) foraging on *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *Evol. Ecol. Res.* **6**, 777–82.
- Mitteroecker P. & Gunz P. (2009) Advances in geometric morphometrics. *Evol. Biol.* **36**(2), 235–47.
- Monteiro L. R. (1999) Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Syst. Biol.* **48**(1), 192–9.
- Muñoz A. A., Celedon-Neghme C., Cavieres L. A. & Arroyo M. T. K. (2005) Bottom-up effects of nutrient availability on flower production, pollinator visitation, and seed output in a high-Andean shrub. *Oecologia* **143**, 126–35.
- Nilsson L. A. (1988) The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* **334**(6178), 147–9.
- Njoku E. (1957) The effect of mineral nutrition and temperature on leaf shape in *Ipomoea caerulea*. *New Phytol.* **56**(2), 154–71.
- Ohara M. & Higashi S. (1994) Effects of inflorescence size on visits from pollinators and seed set of *Corydalis ambigua* (Papaveraceae). *Oecologia* **98**(1), 25–30.
- Peinemann N. (1998). *En: Conceptos de Edafología y Nutrición Mineral*. Edi UNS, Bahía Blanca, Argentina. pp. 4–40.
- Rohlf F. J. & Marcus L. F. (1993) A revolution morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* **8**(4), 129–32.
- Rosas-Guerrero V., Aguilar R., Martén-Rodríguez S. *et al.* (2014) A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecol. Lett.* **17**(3), 388–400.
- da S L Sternberg L., Pinzon M. C., Moreira M. Z., Moutinho P., Rojas E. I. & Herre E. A. (2007) Plants use macronutrients accumulated in leaf-cutting ant nests. *Proc. R. Soc. B.* **274**(1608), 315–21.
- Schiestl F. P. & Johnson S. D. (2013) Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends Ecol. Evol.* **28**(5), 307–15.
- Tadey M. (2012) Reproductive biology of *Monttea aphylla* (Scrophulariaceae). *Aust. J. Bot.* **59**(8), 713–8.
- Tadey M. & Aizen M. A. (2001) Why do flowers of a hummingbird-pollinated mistletoe face down? *Funct. Ecol.* **15**(6), 782–90.
- Tadey M. & Farji-Brener A. G. (2007) Indirect effects of exotic grazers: livestock decreases the nutrient content of refuse dumps of leaf-cutting ants through vegetation impoverishment. *J. Appl. Ecol.* **44**(6), 1209–18.
- Tibbett M. (2000) Forum. *Funct. Ecol.* **14**(3), 397–9.
- Voroney R. P. & Heck R. J. (2007) The soil habitat. In: *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, 4th edn (ed E. A. Paul) pp. 25–49. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D. & Fink W. L. (2004) Landmarks. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer* pp. 23–50. Elsevier Academic Press, New York and London.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Appendix S1. Supporting Information.