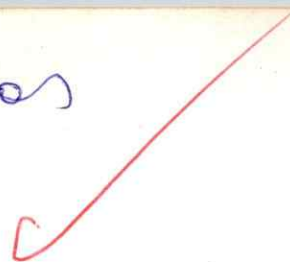


UCH-FC  
MAG-B  
B451

Poner Materias



CARACTERISTICAS DE LA SECRECION DE NECTAR EN  
ECCREMOCARPUS SCABER R. et P. (BIGNONIACEAE) EN RELACION  
A LOS HABITOS DE SUS POLINIZADORES

Tesis  
presentada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas con mención en  
Botánica

por

ELIANA BELMONTE SCHWARZBAUM



SANTIAGO DE CHILE, 1988

02286

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N  
T E S I S   D E   M A G I S T E R

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

MERCEDES ELIANA BELMONTE SCHWARZBAUM

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica.

Directores de Tesis

Prof. Mary T. Kalin Arroyo

Prof. Liliana Cardemil

Comisión Informante de Tesis

Prof. Miren Alberdi

Prof. Juan Armesto

Prof. Luis Contreras

Prof. Gloria Montenegro

Mary T. Kalin Arroyo  
Liliana Cardemil

Miren Alberdi  
Juan Armesto  
Luis Contreras  
Gloria Montenegro

Tesis dirigida por:

Dra. Mary T. Kalin Arroyo & Dra. Liliana Cardemil,  
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad  
de Chile, Santiago.

A mis padres,  
a quienes les debo la vida  
y a mis hijas,  
en quienes la prolongo.

Y a mis tutoras, Mary y Liliana que con su dedicación permanente y generosidad de entrega, lograron traspasarme su infinito amor por la botánica.

Agradezco muy especialmente a Gloria Montenegro, Juan Armento, Paulina Uslar, Francisco Squeo, Inés Casassa, Carolina Villagrán, Michel Sallaberry, Mario Rosenmann, Juan Fernández, Oriana Zamora, Ana María Mujica, Víctor Monasterio, Francisco Bozinovic, Melica Muñoz, Sonia Gatica, Angélica Vega y tantos otros que me entregaron elementos valiosos para la realización de este trabajo.

A la Dirección de Investigación de la Universidad de Chile, al laboratorio de Botánica de la Pontificia Universidad Católica y a las autoridades de la Universidad de Tarapacá, mis agradecimientos por las facilidades otorgadas.

## INDICE.-

LISTA DE TABLAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	x
I. INTRODUCCION	
i). Efectos evolutivos de interacciones entre organismos .....	1
ii). La interacción planta-polinizador .....	3
iii). Tres planteamientos específicos .....	5
iv). Objetivos específicos .....	10
II. ANTECEDENTES SOBRE LOS ORGANISMOS INTERACTUANTES	
i). <u>Eccremocarpus scaber</u> R. et P. (Bignoniaceae) .....	12
ii). <u>Patagona gigas gigas</u> Vieillot (Trochilidae) .....	21
iii). <u>Sephanoides galeritus</u> Molina (Trochilidae) .....	25
iv). <u>Bombus dahlbomi</u> Guér. (Apidae) .....	26
v). Requerimientos energéticos de los picaflores .....	27
III. MATERIALES Y METODOS	
i). Muestreo de los visitantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	33

ii).	Morfología externa y anatomía del nectario .....	34
iii).	Ultraestructura del nectario .....	37
iv).	Composición de azúcares del néctar .....	38
v).	Patrón de acumulación de néctar y capacidad secretora total del nectario de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	41
vi).	Patrón diario de secreción de néctar en flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	44
IV. RESULTADOS		
i).	Organismos que visitan flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	46
a).	Comportamiento de los visitantes de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	46
b).	Número de visitas realizadas .....	59
c).	Rol relativo de <u>Patagona gigas</u> y <u>Sephanoides galeritus</u> , polinizadores principales de <u>Eccremocarpus scaber</u> ....	62
ii).	El nectario de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	63
a).	Morfología externa del nectario .....	63
b).	Anatomía del nectario .....	70
c).	Ultraestructura del nectario .....	84
iii).	Capacidad secretora del nectario y composición del néctar de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	96
a).	Patrón de acumulación de néctar .....	96
b).	Variación en secreción entre flores ....	104

c).	Composición de azúcares del néctar .....	106
d).	Valor energético del néctar de <u>Eccremocarpus scaber</u> .....	109
e).	Reabsorción de azúcares .....	112
iv).	Patrón diurno de actividad de los polinizadores y patrón diario de secreción del nectario .....	115
a).	Actividad diurna de los polinizadores .....	115
b).	Patrón diario de secreción de néctar .....	131
c).	Factores exógenos en la secreción de néctar .....	139
V.	DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	146
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	165

## LISTA DE TABLAS.-

Tabla	1	Frecuencia de visitas de los visitantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> de 1983 y 1984. .....	47
Tabla	2	Aspectos del comportamiento de los visitantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	53
Tabla	3	Néctar residual en flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> medido después de visitas de <u>Patagona gigas</u> y <u>Bombus dahlbomi</u> . .....	57
Tabla	4	Porcentajes relativos de visitas efectuadas y tasas de visitas de los visitantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	60
Tabla	5	Diámetro promedio, volumen promedio y relación vacuola citoplasma de las células de los tejidos del nectario, según estado de desarrollo. .....	73
Tabla	6	Tamaño de estructuras celulares según tejido y estado de desarrollo del nectario. .....	75
Tabla	7	Características del néctar acumulado en flores según su estado de desarrollo. .....	97
Tabla	8	Azúcares componentes del néctar de flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> en el estado de activa secreción. .....	98
Tabla	9	Estimación del valor energético potencial del néctar secretado durante la vida de una flor de <u>Eccremocarpus scaber</u> , y del néctar disponible. .....	99
Tabla	10	Requerimientos energéticos de los polinizadores principales de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	110



Tabla 11	Cuentas de $^{14}\text{C}$ -Sacarosa en tres flores del estado 3 de desarrollo, 24 horas después de contaminado el néctar. .....	113
Tabla 12	Porcentaje relativo de visitas en los tres períodos del día efectuado por los organismos antófilos de <u>Eccremocarpus scaber</u> (1984). .....	130
Tabla 13	Volumen, concentración de azúcares, cantidad de azúcares y de agua del néctar de <u>Eccremocarpus scaber</u> secretado a intervalos de 6 horas, a lo largo de 24 horas. .....	132
Tabla 14	Características del néctar secretado en las horas del día (6 AM - 6 PM) versus la noche (6 PM - 6 AM). .....	136
Tabla 15	Regresiones de volumen de agua en cantidad de azúcar por flor, del néctar de <u>Eccremocarpus scaber</u> secretado a diferentes horas del día. .....	141

## LISTA DE FIGURAS.-

Figura 1	Inflorescencia de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	13
Figura 2	Distribución latitudinal en Chile de <u>Eccremocarpus scaber</u> , <u>Patagona gigas</u> y <u>Sephanoides galeritus</u> . .....	15
Figura 3	Esquema de las relaciones filogenéticas de las tribus de la familia Bignoniaceae. .....	18
Figura 4	Aspecto general de los tres organismos reporta- dos como visitantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	22
Figura 5	Requerimiento calórico diario (12 h) de distin- tas especies de picaflor para, según peso. .....	28
Figura 6	Requerimiento calórico nocturno (12 h) de distintas especies de picaflor, sin y con so- por, según peso. .....	30
Figura 7	Meses de actividad de los visitantes de flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> y porcentaje de días de observación con actividad. .....	48
Figura 8	Distribución de frecuencias de números de flores visitadas por avistamiento, de los visi- tantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	51
Figura 9	Distribución de frecuencias del tiempo inverti- do por flor, de los visitantes de las flores de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	54
Figura 10	Corte longitudinal de la corola de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	64

Figura 11	Superficie del nectario y del ovario en estado de secreción. .....	66
Figura 12	Complejo estomático en epidermis externa del nectario. .....	68
Figura 13	Nectario en estado de secreción. .....	71
Figura 14	Elementos xilemáticos con engrosamientos anulares en el parénquima fundamental del nectario. .....	76
Figura 15	Tejido epidérmico del nectario en estado 1 de desarrollo (preantesis). .....	78
Figura 16	Ultraestructura de la epidermis y parénquima secretor del nectario en estado 3 de desarrollo (activa secreción). .....	80
Figura 17	Ultraestructura del parénquima secretor del nectario en estado 1 (preantesis) y 4 (senescente) de desarrollo. .....	82
Figura 18	Parénquima fundamental del nectario en estado 1 de desarrollo (preantesis). .....	88
Figura 19	Vacuola de las células del parénquima fundamental del nectario en estado 2-3 (activa secreción) y 4 (senescente) de desarrollo. .....	90
Figura 20	Ultraestructura del haz vascular del parénquima secretor del nectario en estado 3 de desarrollo (activa secreción). .....	93
Figura 21	Volumen y cantidad de azúcares de néctar acumulado según estado de desarrollo de las flores. .....	100
Figura 22	Concentración de néctar según estado de desarrollo de la flor. .....	102

Figura 23	Cromatografía en capa fina de los componentes del néctar de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	107
Figura 24	Patrón de visita diurno de <u>Patagona gigas</u> , <u>Sephanoides galeritus</u> , <u>Bombus dahlbomi</u> y <u>Tatochila mercedis</u> en siete fechas, en la época de floración de <u>Eccremocarpus scaber</u> . .....	116
Figura 25	Patrón diurno de visitas generado a base del total de visitas efectuadas por <u>Patagona gigas</u> , <u>Sephanoides galeritus</u> , <u>Bombus dahlbomi</u> y <u>Tatochila mercedis</u> en los cinco días de muestreo de 1984. .....	124
Figura 26	Patrón de visita diurno de <u>Bombus dahlbomi</u> generado de dos días de muestreo en Diciembre de 1983. .....	128
Figura 27	Promedio de néctar y agua secretado, concentración del néctar y cantidad de azúcares, según hora del día. .....	133
Figura 28	Relación entre la cantidad de azúcar y agua secretada por flor en <u>Eccremocarpus scaber</u> en cuatro períodos diferentes de seis horas del día. .....	142
Figura 29	Relación entre néctar máximo y biomasa floral para plantas con distintos vectores de polinización. .....	149
Figura 30	Diagrama ternario que sitúa especies según la proporción relativa de sacarosa, fructosa y glucosa del néctar. .....	158

## RESUMEN

Las características de la secreción de néctar en Eccremocarpus scaber R. et P. (Bignoniaceae) en Chile central, y los hábitos de sus polinizadores fueron estudiados con el propósito de determinar: (1) en que medida los requerimientos energéticos de estos últimos han influido sobre la estructura del nectario, y la composición y cantidad del néctar secretado y (2) si el patron diario de actividad de los polinizadores ha influido sobre el horario de secreción de néctar.

Mediante observaciones de terreno durante dos temporadas se comprobó que las flores tubulares, rojo-anaranjadas de Eccremocarpus scaber reciben visitas de un número limitado de especies: dos especies de picaflor, Patagona gigas y Sephanoides galeritus (Trochilidae), una especie de abejorro Bombus dahlbomi (Apidae) y una especie de mariposa Tatochila mercedis (Pieridae). Los patrones de visita, la fidelidad de los visitantes en el tiempo, su comportamiento durante la colecta de néctar, junto a aspectos del acoplamiento morfológico de los visitantes y las flores indican que Patagona gigas (17 - 18 g) y Sephanoides galeritus (5 - 6 g) son los polinizadores más efectivos de Eccremocarpus scaber. Patagona gigas, fue responsable de la mayor proporción de visitas efectuadas por los pica-

flores y, por lo tanto, puede considerarse como el polinizador más importante de E. scaber.

El néctar en Eccremocarpus scaber es secretado por un disco anular ubicado en el fondo del tubo de la corola, en la base del ovario. El nectario está constituido por tres tejidos: epidermis con estomas, parénquima secretor y parénquima fundamental. Los últimos dos tejidos están atravesados por haces vasculares ramificados. La estructura del nectario permite la acumulación eficiente de los componentes del prenéctar y la secreción rápida de elevados volúmenes de néctar. Amiloplastos que presentan muchos puntos de cristalización, se encuentran en todos los tejidos desde muy temprano en el desarrollo del nectario. Estudios ultraestructurales muestran amiloplastos degradados dentro de vacuolas fagocitarias que aumentan notoriamente en volumen durante el desarrollo del nectario (vacuolas con estas características no han sido reportado previamente para nectarios de angiospermas). Las células del parénquima secretor y fundamental están frecuentemente separadas por espacios intercelulares. En el parénquima asociado a los haces vasculares se detectó material fibrilar ultraestructuralmente similar a la proteína-P del floema. En muchos aspectos el nectario de E. scaber es convergente con el de las especies de Passiflora.

El inicio de la secreción del néctar está sincronizado con la antésis y continúa a medida que crecen las flores.

Los azúcares encontrados en el néctar de Eccremocarpus scaber son glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa. La presencia de maltosa en el néctar sugiere que los monosacáridos provienen de la degradación del almidón en el nectario. Ensayos controlados para evitar visitas de los polinizadores, muestran que a lo largo de la vida cada flor secreta un promedio de 11.5 mg de azúcar (46 calorías). Flores en la etapa máxima de secreción secretan 5 mg de azúcar (21 calorías) en un período de 24 h. De acuerdo con estimaciones de los requerimientos energéticos de los picaflores, y el valor energético del néctar de E. scaber, Patagona gigas debería visitar como mínimo, entre 500-800 flores diarias, y Sephanoides galeritus alrededor de la mitad, para satisfacer sus demandas energéticas.

Los patrones de visita diario de los picaflores fueron muy irregulares, con una tendencia general hacia tres máximos diarios: uno en la mañana (8 - 9 AM), otro a media tarde (2 - 3 PM) y un tercero durante las últimas horas de luz (6 - 7 PM). Los dos picaflores en conjunto efectúan más visitas en las horas de la tarde comparado con las de la mañana, siendo Patagona gigas el principal responsable de dicha tendencia. El patrón general de visita no guarda relación con el patrón de secreción de néctar. Durante las últimas horas de la noche antes del amanecer, la secreción de néctar es muy reducida y la concentración de azúcares muy alta. La secreción aumenta muy rápidamente con la lle-

gada de la luz, produciéndose cantidades similares de néctar menos concentrado en horas de la mañana y tarde. Después del crepúsculo, la secreción de néctar decae, aumentando nuevamente la concentración.

El bajo aporte de sacarosa relativo a las hexosas en el néctar de Eccremocarpus scaber es semejante a las especies de plantas polinizadas por murciélagos y paserinas. La capacidad secretora del nectario de las flores de Eccremocarpus scaber es alta en comparación a la mayoría de las especies polinizadas por picaflores estudiadas hasta la fecha. E. scaber se ubica entre las especies de plantas polinizadas por picaflores de tamaño corporal más típico, y murciélagos o paserinas. Estas tendencias, junto con los notables cambios estructurales internos del nectario, apoyan la hipótesis de una fuerte influencia de los polinizadores en el proceso de secreción de néctar en E. scaber.



## ABSTRACT

Nectar secretion characteristics and pollinator habits were studied in Eccremocarpus scaber (Bignoniaceae) in central Chile in order to assess whether the energy requirements of pollinators have influenced nectary structure, nectar composition and the quantities of sugar secreted, whether daily pollinator activity patterns have influenced the timing of nectar secretion.

Observations over two flowering seasons revealed a highly restricted set of visitors on the morphologically specialized, red-orange tubular flowers of Eccremocarpus scaber, which included two species of hummingbirds, Patagona gigas and Sephanoides galeritus (Trochilidae), one species of bumblebee, Bombus dahlbomi (Apidae) and one species of butterfly, Tatochila mercedis (Pieridae). Visitation patterns, constancy of visitors over time and foraging and flower handling behaviour indicates that Patagona gigas (largest known hummingbird species) and Sephanoides galeritus (average sized species) are the most effective pollinators of E. scaber. The greater energy demanding Patagona gigas effected proportionately more of the hummingbird visits to E. scaber flowers than the smaller Sephanoides galeritus, and it may be considered the principal pollinator of E. scaber.

Nectar in Eccremocarpus scaber is secreted from a large annular disc, located at the base of the ovary deep in the corolla tube, composed of three tissues: epidermis with stomata, secretory parenchyma, and ground parenchyma. The entire nectary is well supplied with vascular bundles which terminate in the secretory parenchyma. The nectary is structured for efficient accumulation of prenectar components and rapid secretion of large nectar volumes. Large amyloplasts with multiple crystallization points are found in all tissues from the very early stages of development, indicating a phase of storage of prenectar components well in advance of secretion. Ultrastructural studies indicate that starch degradation occurs in phagocytic vacuoles which increase greatly in volume during development (vacuoles of this kind have not been reported previously in the angiosperm nectary). Other notable features of the mature nectary include large intercellular spaces and the presence of fibrillar material in the parenchyma associated with the vascular bundles, resembling phloem P-protein. All tissues, upon termination of secretion contain, very large vacuoles occupying 90 % of the cell volume that remain intact. The Eccremocarpus scaber nectary is remarkably convergent in many aspects with that of Passiflora spp. pollinated by hummingbirds and bees.

Nectar secretion initiation is synchronized with

anthesis and continues as corolla growth proceeds. Sugars found in Eccremocarpus scaber nectar are glucose, fructose, sucrose and maltose. The presence of maltose suggests that the monosaccharides are derived from starch degradation. Flowers controlled to exclude pollinator visits secreted a mean of 11.5 mg of sugar (46 calories). Flowers at the maximum stage of secretion produce 5 mg sugar (21 calories) over a 24 hour period. Published estimates of the energy requirements for hummingbirds and the caloric value of standing crop nectar indicate that Patagona gigas must visit between 500-800 flowers daily to satisfy its energy demands minimally, while Sephanoides galeritus must visit approximately half as many flowers.

No evidence was obtained for a bimodal pattern of activity in the hummingbird species; on the contrary, visitation patterns were highly irregular daily, with an overall general tendency (considering all visits effected during the season) for three maxima per day: one in the morning (8-9 h), a second in the mid hours of the afternoon (14-15 h) and a third during the last hours of daylight (18-19 h). The hummingbirds effected more visits in the afternoon period relative to the morning hours, the tendency being especially notable in Patagona gigas. This general visitation pattern bore no relation to the daily nectar secretion pattern. Nectar secretion was strongly reduced and nectar highly concentrated in the dark hours of

the morning. Secretion increased rapidly after daybreak, equal amounts of less concentrated nectar being produced in the morning and afternoon hours. After the twilight hours, nectar secretion diminished again, and concentration increased. The concentration differences between night and day suggest that nectar secretion might be partially determined by transpiration levels.

The low proportion of sucrose in the nectar of Eccremocarpus scaber places it towards the range known species pollinated by bats and passerine birds. The high secretory capacity of the nectary in comparison with published results for other hummingbird pollinated species, again situates E. scaber towards the range known for species of plants pollinated by some of the most energy demanding pollination vectors in the angiosperms. These tendencies, together with major reorganizational changes in the nectary, suggest that the pollinators of E. scaber have had a strong selective effect on nectar secretion characteristics in E. scaber.

## I. INTRODUCCION.-

### i). EFECTOS EVOLUTIVOS DE INTERACCIONES ENTRE ORGANISMOS.-

La teoría Darwiniana de la evolución se basa en la selección natural actuando sobre las diferencias individuales. La selección natural actúa sobre cada organismo a través del ambiente total, entendiéndose por esto, la sumatoria de los factores abióticos y bióticos.

Cuando el sustrato selectivo de un organismo es otro(s) organismo(s), caben dos tipos de respuestas evolutivas: coevolución y adaptación unilateral. El reconocimiento de que la presencia de compuestos secundarios en ciertas especies de plantas (la fase biótica del ambiente) ha influido en la selección de fuentes alimenticias por las larvas de mariposas y, que estas han influido recíprocamente en la evolución de dichos compuestos en las plantas, llevó a Ehrlich & Raven (1964) a introducir el concepto de "coevolución". Algunas definiciones de coevolución aceptadas en la actualidad son la de Smith (1975), quien la usa para referirse a los cambios en dos o más especies que actúan como fuerzas selectivas recíprocas, y la de Roughgarden (1983), quien considera la coevolución como la evolución simultánea de poblaciones que interactúan ecológicamente. Janzen (1980) define la coevolución en forma más estrecha, admitiendo sólo los casos en que una característica en una

especie particular ha evolucionado como respuesta a otra característica en una segunda especie y vice versa. Frecuentemente se emplea el término "coevolución difusa" (ej. Gilbert & Raven, 1975; Fox, 1981; Herrera, 1982; Feinsinger, 1983) para describir las coadaptaciones particulares desarrolladas en una o mas especies en respuesta a una o varias características de otro grupo de especies.

La particularidad de la coevolución es que ambos organismos (o grupo de ellos) actúan como variables dependientes en el proceso selectivo. Por ejemplo, si una población predadora ejerce selección para el desarrollo de defensas mas efectivas en su presa, el cambio en la constitución genética de la presa seleccionará en el predador la generación de mecanismos o comportamiento mas efectivos de captura de las presas. Este mismo fenómeno de retroalimentación se puede aplicar a dos especies que compiten por la misma fuente de alimentos. A medida que una especie desarrolla adaptaciones que aumentan su capacidad para explotar el recurso, la disminución del recurso disponible para la segunda especie seleccionará las características para que dicha especie sea mas efectiva en la explotación del recurso común (Smith, 1975).

En la segunda clase de respuesta entre organismos (o grupos de organismos) denominada "adaptación unilateral", uno de los organismos constituye una variable dependiente, mientras que el segundo actúa como variable independiente, el primero desarrolla coadaptaciones como respuesta al se-

gundo y el segundo se mantiene evolutivamente estático con respecto a la interacción en cuestión.

La diferencia entre la coevolución y la adaptación unilateral es más bien de grado que de fondo. Los cambios resultantes de la coevolución no son necesariamente iguales en intensidad, ni siempre son producidos simultáneamente en el tiempo (Roughgarden, 1983). Muchas situaciones definidas como adaptaciones unilaterales probablemente constituyen casos de coevolución críptica, en que las respuestas de uno de los organismos pasan desapercibidas debido a su pequeña magnitud.

#### ii). LA INTERACCION PLANTA-POLINIZADOR.-

La mayoría de las angiospermas, a diferencia de otros grupos de plantas filogenéticamente más antiguos, dependen exclusivamente de animales para su polinización (Faegri & van der Pijl, 1971). En las angiospermas primitivas, los polinizadores eran insectos no especializados, tales como coleópteros (Crepet, 1984), los que fueron atraídos por el alto contenido proteico y lipídico del polen. Dentro de las angiospermas se observa una clara tendencia hacia la evolución de órganos especializados (los nectarios) que secretan néctar como un recurso adicional o alternativo al polen y que los polinizadores metabolizan más fácilmente que el polen (Simpson & Neff, 1983). Concomitantemente, la selección natural ha favorecido la evolución de características

florales que condicionan el comportamiento de los polinizadores para un transporte de polen más eficiente. En el transcurso de su asociación con las angiospermas, algunos grupos de animales involucrados en la polinización (ej. himenópteros, lepidópteros, troquilidos, microquirópteros) han llegado a depender total o parcialmente de las flores para su alimentación.

Si las características generales de las flores de las angiospermas son el resultado de una coevolución con sus polinizadores, se podría esperar que esto se refleje en los caracteres de grupos específicos de especies que interactúan en un momento determinado en el tiempo. La prueba conclusiva de la evolución de coadaptaciones en un organismo como respuesta a otro, requiere que se demuestre que el segundo efectivamente produce un cambio en una característica del primero (Roughgarden, 1983). En el caso de la polinización biótica, esta proposición es difícil de comprobar porque las características más importantes asociadas con la polinización biótica (estructura del nectario, composición del néctar), no se conservan en el registro fósil. Una manera alternativa de poner a prueba la hipótesis de efectos selectivos de los polinizadores en las plantas es desde una perspectiva comparativa. Si, por ejemplo, las plantas responden continuamente a las presiones de los polinizadores que las visitan, y asumiendo que los miembros de un determinado grupo taxonómico ejercen las presiones selectivas similares, se podría esperar conver-



gencia en algunas de las características florales de especies visitadas por un mismo tipo de vector, independientemente del origen filogenético de cada especie de planta. Vale la pena destacar que esta hipótesis es análoga a la de convergencia entre especies vegetales que se desarrollan bajo condiciones climáticas similares (ej. Mooney et al., 1977). En el caso particular de las plantas polinizadas bióticamente, "el polinizador" es el equivalente del clima.

### iii). TRES PLANTEAMIENTOS ESPECIFICOS.-

El propósito de esta tesis es examinar tres hipótesis en relación a la secreción de néctar que se derivan de la hipótesis general mencionada arriba. Para ello se ha seleccionado a Eccremocarpus scaber R. et P. (Bignoniaceae), una especie de enredadera de Chile central. Esta planta es visitada por los picaflores Patagona gigas Vieillot (picaflor gigante) y Sephanoides galeritus Molina (picaflor), en el sector precordillerano de Chile central (Uslar, 1982). Uslar (1982) también reportó que el abejorro Bombus dahlbomi Guér. ocasionalmente retira néctar de las flores de E. scaber a través de perforaciones que efectúa en la base de la corola. En particular, uno de los visitantes de E. scaber, P. gigas sobrepasa a todas las otras especies de picaflores en cuanto a sus requerimientos energéticos (ver capítulo II). De la misma manera, el requerimiento energético de los abejorros es alto en relación a las abejas en general (Heinrich, 1979). Por lo tanto, cualquier efecto

selectivo de P. gigas o de B. dahlbomi en las características del néctar sería muy evidente. Por otra parte, el género Eccremocarpus es básicamente ornitofílico y se sugiere que la ornitofilia se adquirió independientemente de su presencia en otros géneros de la familia (ver capítulo II). Este hecho minimizará el riesgo de que cualquier característica asociada con la polinización por picaflor en E. scaber hubiese sido adquirida en relación a interacciones que se produjeron anteriormente en la historia de la familia.

PLANTEAMIENTO 1: El néctar básicamente es una solución de azúcares simples que deriva del flujo floemático. La sacarosa procedente del floema sufre modificaciones en composición y concentración en el nectario mismo antes de la secreción (Wergin et al., 1975; Durkee, 1983). El producto final contiene fundamentalmente los monosacáridos glucosa y fructosa, y los disacáridos sacarosa y ocasionalmente maltosa, en cantidades que varían de una especie a otra (Baker & Baker, 1983). Por otra parte pueden estar presentes en cantidades mas reducidas oligosáridos, rafinosa, melobiosa, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, iones minerales, fosfatos, vitaminas y sacarosas (transglucosidasas y transfructosidasas) (Lüttge, 1977; Gunning & Steer, 1975; Baker & Baker, 1980; 1983). También se han detectado glicósidos tóxicos y alcaloides (Fahn, 1979a).

Si los polinizadores han ejercido un efecto selectivo

sobre las plantas que polinizan, la cantidad de azúcar en el néctar de una flor debe estar correlacionada positivamente con las demandas energéticas de los polinizadores (Baker & Baker, 1983; Carpenter, 1983). El exceso de néctar debe estar controlado selectivamente debido al alto costo energético del mismo (Carpenter, 1983). Los animales exotérmicos tales como hormigas y muchos dípteros, requieren cantidades mínimas de néctar para mantenerse (Hickman, 1974). Aunque el metabolismo basal de los animales endotérmicos como los himenópteros, picaflores, paserinas y murciélagos decrece por unidad de peso (MacNab, 1983), sus requerimientos energéticos totales aumentan según el orden indicado, debido a diferencias en su peso total. En general, el valor energético del néctar de especies polinizadas por picaflores debería encontrarse entre el valor del néctar de las especies polinizadas por himenópteros y el de especies polinizadas por paserinas (Brown et al., 1978). En nuestro caso particular, dependiendo del rol relativo de Patagona gigas, Sephanoides galeritus y Bombus dahlbomi en la polinización de Eccremocarpus scaber, la cantidad y calidad energética del néctar podría ubicarse cerca del rango propio de especies polinizadas por paserinas. Alternativamente, debido a su dependencia de B. dahlbomi, podría ubicarse cerca del rango de los picaflores y abejas.

PLANTEAMIENTO 2: Estudios de las interacciones entre plantas y polinizadores han dado poca importancia al hecho que la cantidad y composición final de nectar en una flor,

están en gran medida determinadas por las características del nectario mismo.

Los nectarios son altamente variables en cuanto a ubicación en la flor, anatomía y mecanismos de secreción de néctar. Fahn (1979) reconoce nectarios perigonales (en tépalos y en pétalos), estaminales, del receptáculo, discoidales (que rodean la base del ovario), oviales (que recubren la superficie total del ovario), estilares y estigmáticos. En los pocos nectarios estudiados ultraestructuralmente hasta la fecha (Lonicera japonica; Fahn & Rachmilevitz, 1970; Abutilon sp. -Findlay & Mercer, 1971; Citrus sinensis y Vinca spp. -Rachmilevitz & Fahn, 1973; Tropaeolum majus -Rachmilevitz & Fahn, 1975; Musa paradisiaca -Fahn & Benouaiche, 1979; Passiflora spp. -Durkee et al., 1981), se ha observado una variación notable en el desarrollo del retículo endoplasmático, en la actividad de los dictiosomas y también en cuanto a la presencia y cantidad de almidón en las células secretoras. Se ha postulado dos mecanismos de secreción denominados, granulocrino y ecrino respectivamente. En el mecanismo granulocrino se supone que los azúcares son transportados en vesículas al plasmalema de la célula secretora con descarga del néctar hacia el apoplasto (Lüttge & Schnepf, 1976). En el ecrino, las moléculas individuales de azúcar serían transportadas a través de la membrana de la célula secretora, posiblemente gracias a un transportador de la molécula (Schnepf, 1964; Figier, 1968). Sin embargo, y debido a una

falta de estudios integrados, el sentido biológico de esta diversidad no ha sido explorado hasta el momento. Arroyo (1976a) y Walker (1976) han postulado que la variación en la exina de los granos de polen es el resultado de la selección por el polinizador. Considerando que existen diferencias entre los polinizadores en cuanto a la cantidad de néctar requerida, se esperarían variaciones análogas en el nectario. Pensamos, por lo tanto, que sería interesante investigar si la estructura del nectario de Eccremocarpus scaber guarda relación con los altos requerimientos energéticos de sus polinizadores.

PLANTEAMIENTO 3: Se puede postular que las plantas deberían ofrecer néctar preferentemente a las horas del día en que sus polinizadores estén más activos (Carpenter, 1983). La falta de correspondencia entre las horas de secreción y consumo podría ocasionar pérdida de componentes importantes de la dieta del animal (ej. agua a través de evaporación). De no ser así, además corren el riesgo que visitantes no efectivos retiren el néctar.

Los picaflores y los abejorros se alimentan exclusivamente durante las horas de luz. En el caso de los picaflores la capacidad de almacenamiento de alimentos es muy reducida debido al tamaño pequeño de su estómago (Hainsworth, 1981). En consecuencia, los picaflores han evolucionado sopor nocturno. En el estado de sopor se reduce la actividad metabólica de tal manera que el requerimiento e-

nergético es menor que en el día (Kruger et al., 1982). Debido a su necesidad de reponer la energía consumida durante la noche, se esperaría que los picaflores se alimenten muy activamente en la primeras horas de la mañana. Tanto para los picaflores como para los abejorros, las primeras horas del día, junto con las del crepúsculo, serían períodos en que los requerimientos energéticos aumentan (Carpenter & MacMillen, 1976). Se ha documentado que muchas aves nectarívoras están activas preferentemente en la madrugada y en el atardecer (Carpenter & MacMillen, 1976). Este comportamiento, podría traducirse primero, en una tendencia de la planta a secretar néctar en las horas de la madrugada y luego, nuevamente, en horas de la tarde, con una reducción en las primeras horas de la tarde. De ser así, se esperaría un patrón bimodal de secreción de néctar (Carpenter, 1983).

#### iv). OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

- a). Cuantificar la actividad de los visitantes de Eccremocarpus scaber.
- b). Determinar el rol relativo de los polinizadores efectivos de Eccremocarpus scaber.
- c). Estudiar la morfología externa y anatomía del nectario de Eccremocarpus scaber y caracterizar la ultraestructura de las células de dicho órgano, desde el estado preantésis hasta la senescencia de la flor, dando énfasis especial a la e-

tapa de secreción.

- d). Identificar y cuantificar los monosacáridos y disacáridos presentes en el néctar de Eccremocarpus scaber.
- e). Determinar el patrón de acumulación de néctar en la flor y la capacidad secretora total del nectario de Eccremocarpus scaber y las variaciones en las cantidades de agua y azúcares en el néctar secretado.
- f). Determinar el patrón diurno y de visitas de Patagona gigas y Sephanoides galeritus a Eccremocarpus scaber.
- g). Determinar el patrón de secreción de néctar a lo largo de un período de 24 horas.

II. ANTECEDENTES SOBRE LOS ORGANISMOS  
INTERACTUANTES.-

i). Eccremocarpus scaber R. et P. (Bignoniaceae) (Fig. 1).

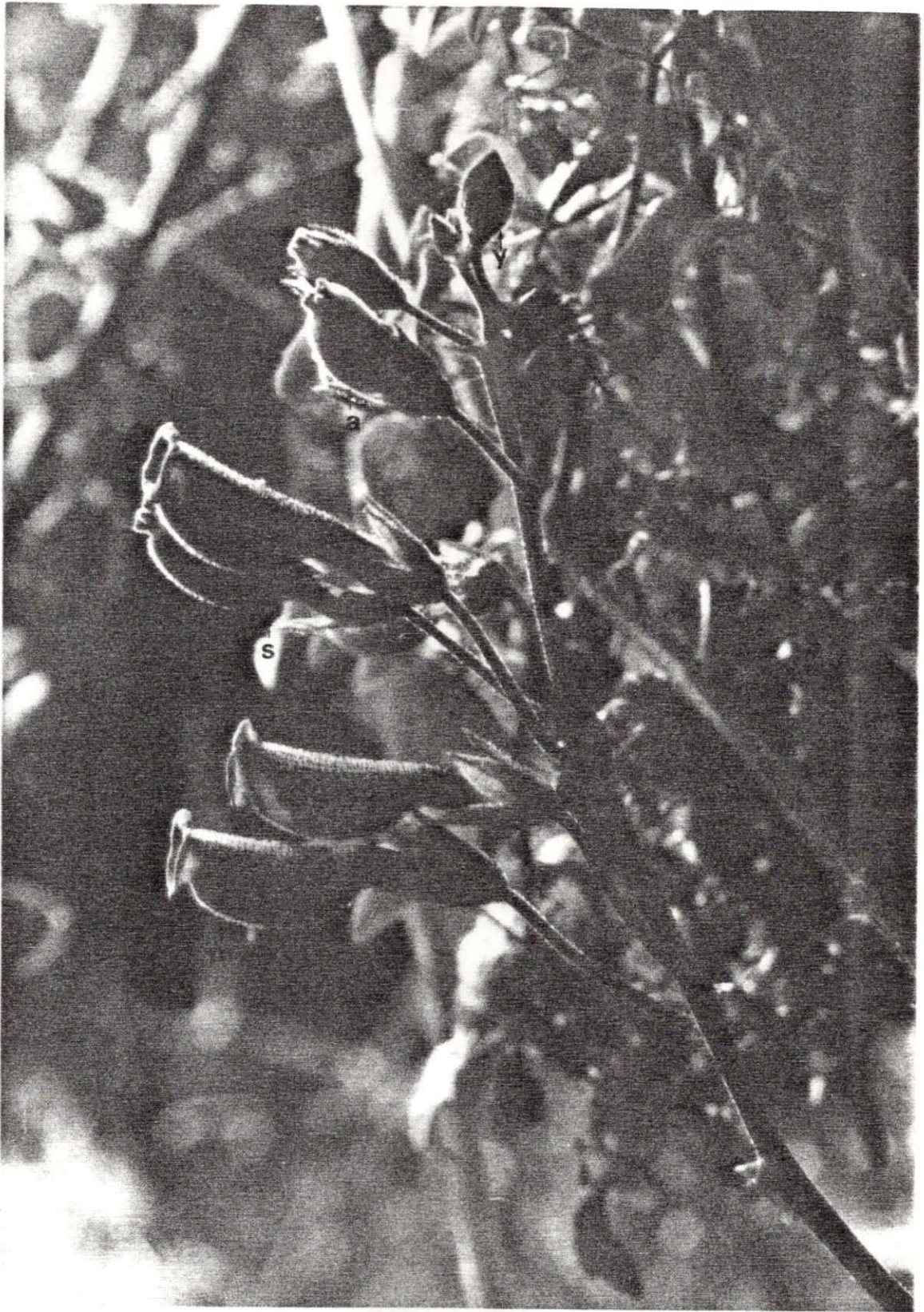
El género Eccremocarpus, compuesto de plantas trepadoras semi-leñosas, contiene 6 especies distribuidas en los Andes de Sudamérica (Gentry & Tomb, 1979). Cinco se encuentran a las latitudes tropicales del Perú, mientras que Eccremocarpus scaber R. et P. está restringida a la zona templada, distribuyéndose en Chile y Argentina (Navas, 1979; Gentry & Tomb, 1979; Hunziker, 1984). En Chile, E. scaber se distribuye desde las provincias de Aconcagua hasta Valdivia y en Argentina, en la provincia de Chubut (Fig. 2), encontrándose en las cordilleras bajas, desde 400-1900 m.s.n.m., preferentemente en quebradas abiertas. Es especialmente abundante en la zona central de Chile. Florece desde Noviembre hasta Enero (Uslar, 1982). El rasgo más notable de Eccremocarpus scaber son sus flores rojo-anaranjadas, tubulares (Fig. 1), que en activa secreción miden 23-29 mm. Los 4 estambres están ocultos dentro del tubo angosto de la corola. Las anteras se encuentran al lado opuesto del ensanchamiento de la corola, de tal forma que las del par de estambres más largos llegan a 2-3 mm de la apertura de la corola. El estilo curvo está desplazado hacia el lado superior de la corola (Grant & Grant, 1968). El



## FIGURA 1.-

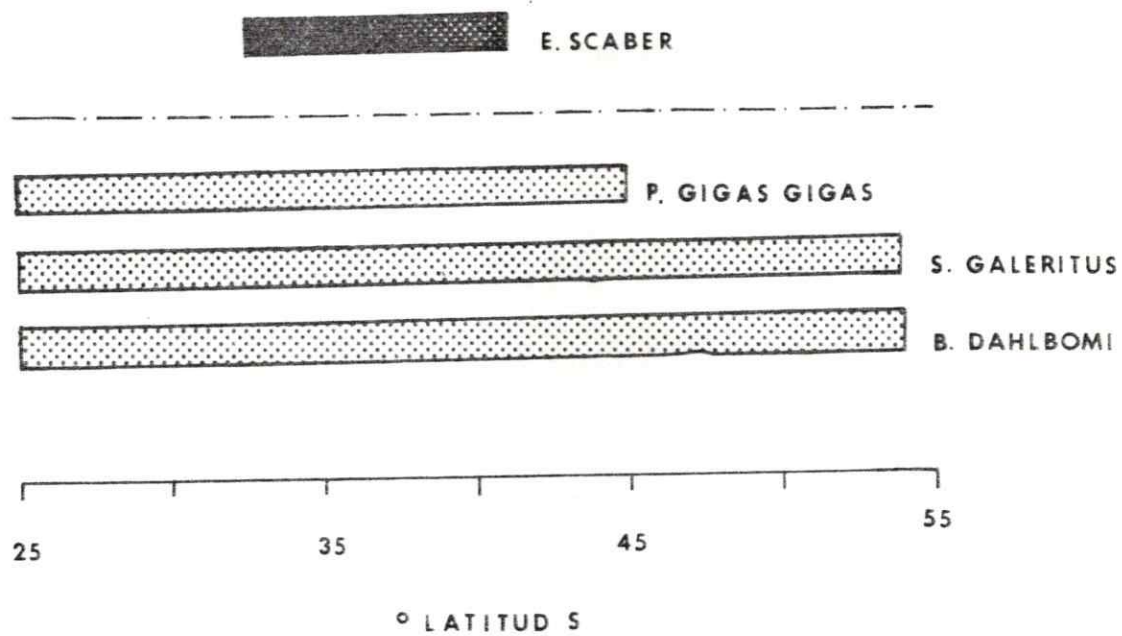
Inflorescencia de Eccremocarpus scaber (Bignoniaceae).  
Yema floral (y); inicio de antesis (a); flor en estado de  
secreción activa (s); flor madura (m). x 3.





## FIGURA 2.-

Distribución latitudinal en Chile de Eccremocarpus scaber, Patagona gigas gigas y Sephanoides galeritus, los principales organismos interactuantes. Para la distribución de E. scaber se consultó las muestras de herbario del Museo Nacional de Historia Natural del Santiago, y obras florísticas. Distribución de P. gigas gigas de Goodall et al. (1946); Ortiz-Crespo (1974); Contreras (1978). Distribución de S. galeritus según Barros (1952). Distribución de Bombus dahlbomi de Herbst (1921).



estigma se ubica profundamente en la corola, a 9-10 mm de la apertura.

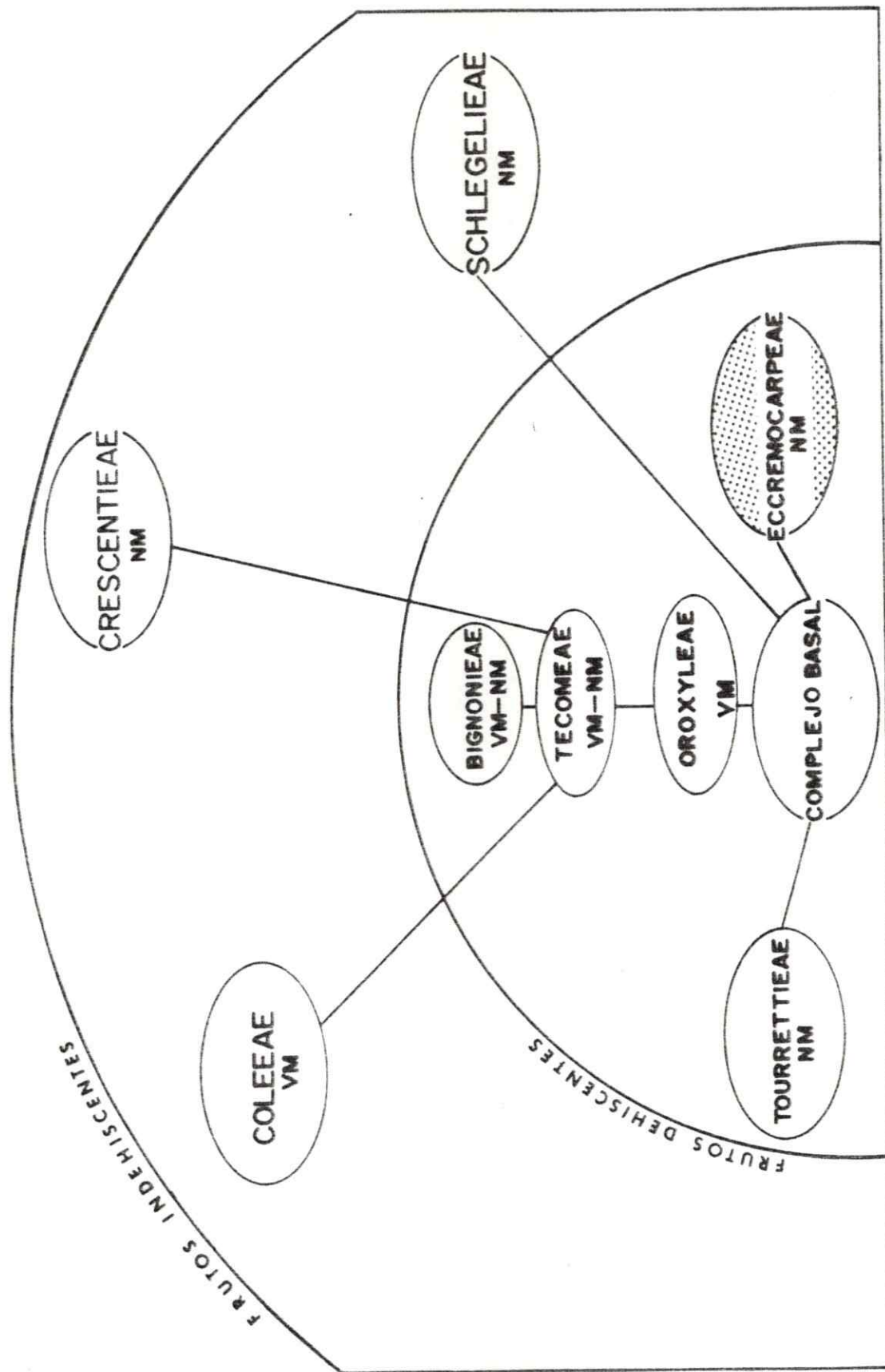
El género Eccremocarpus pertenece a la familia Bignoniaceae. Esta familia está constituida por ocho tribus (Gentry, 1980) (Fig. 3) con aproximadamente 800 especies y 100 géneros, concentrados en los trópicos del Viejo y Nuevo Mundo (Cronquist, 1981). Eccremocarpus pertenece a la tribu monogénica, Eccremocarpeae.

Las relaciones filogenéticas de la familia son muy complejas y aún no están esclarecidas (Gentry, 1974; Gentry & Tomb, 1979). Según Gentry & Tomb (1979), Eccremocarpeae es una tribu taxonómicamente aislada (Fig. 3) puesto que es la única con placentación parietal (Cronquist, 1981). El tipo de polen más primitivo en la familia es 3-colpado, finamente reticulado y caracteriza a Tecomeae (Gentry & Tomb, 1979). Eccremocarpeae presenta polen 3-colpado, psilado (Gentry & Tomb, 1979). Según Gentry (com. pers.), la tribu Eccremocarpeae no está directamente relacionada con ninguna de las restantes tribus actuales y se habría derivado directamente de un complejo basal de la familia (Fig. 3).

Miembros de la familia Bignoniaceae son polinizados exclusivamente por animales. La familia es muy diversa en cuanto a agentes de polinización (Gentry, 1974). La mayoría de los géneros tropicales de la tribu Tecomeae, como de Bignoniaceae, son polinizados principalmente por himenópteros pertenecientes a géneros de abejas tropicales, tales como

## FIGURA 3.-

Esquema de las relaciones filogenéticas de las tribus de la familia Bignoniaceae de acuerdo con Gentry (1974), Gentry & Tomb (1979) y Gentry (1980). VM = viejo mundo; NM = nuevo mundo.



Xylocopa, Eulaema y Trigona, indicando que el mecanismo de polinización básico en la familia habría sido la melitofilia. En especies tropicales aisladas de Tecomeae, sin embargo, se ve una primera tendencia hacia la ornitofilia, con los picaflores perforando la base de la corola, retirando así el néctar de las flores, sin constituirse en polinizadores efectivos. Un género templado de Tecomeae, Campsis es polinizado por picaflor (Bertin, 1982; Heyneman, 1983; Baker & Baker, 1983). En Bignoniaceae, nuevamente hay una cierta tendencia hacia la ornitofilia efectiva con especies de los géneros Martinella y Pirostegia dependiendo principalmente de colibríes para su polinización (Gentry, 1974). Los tres géneros que constituyen la tribu Crescentieae, son quiropterofílicos (polinización por murciélagos). Ocasionalmente reciben visitas de Sphingidae (mariposas nocturnas) o de colibríes que "roban" néctar. Polinización por murciélagos es también conocida en Kigelia de la tribu Coleeae. Gentry (1974) estima que la ornitofilia es probable en Turretieae. No existe información en cuanto a la polinización de Schlegelieae.

Especies de Eccremocarpus de la tribu Eccremocarpeae monogénica, según Gentry & Tomb (1979) son exclusivamente polinizadas por picaflores. Si aceptamos que el mecanismo de polinización del complejo basal de la familia que dio origen a Eccremocarpeae habría sido la melitofilia, la evolución de la ornitofilia en Eccremocarpus indudablemente ocurrió independientemente de su aparición en las restantes



tribus. El cambio de melitofilia hacia ornitofilia es común a lo largo de gradientes altitudinales en las montañas tropicales (Cruden, 1972). La presente asociación de Eccremocarpus scaber con Patagona gigas en particular, por otra parte, muy posiblemente se produjo en la región templada de la distribución del género. Ortiz-Crespo (1974), en su lista de las fuentes de néctar del picaflor gigante a lo largo de su distribución geográfica, no hace mención de otras especies del género Eccremocarpus aparte de E. scaber. Tampoco se mencionan otros miembros de la familia Bignoniaceae entre las fuentes de néctar de Patagona gigas (Ortiz-Crespo, 1974).

ii). Patagona gigas Vieillot (Trochilidae) (Fig. 4).-

Patagona gigas (picaflor gigante) se distribuye en la vertiente occidental de los Andes desde Ecuador hasta Aysén, desde el nivel del mar hasta la zona andina, y en la vertiente oriental de los Andes en Argentina, en Jujuy, Tucumán, Catamarca, La Rioja y Mendoza (Contreras, 1978; Ortiz-Crespo, 1974). Para Argentina, también hay algunos registros en la costa Atlántica, en el área de La Plata (Ortiz-Crespo, 1974) y probablemente también más al Sur de Mendoza por la cordillera (L. Contreras, com. pers.).

Se reconocen dos subespecies: Patagona gigas peruviana y P. gigas gigas; esta última se encuentra desde las latitudes de Atacama hasta Aysén (Goodall et al., 1946), mien-

## FIGURA 4.-

Aspecto general de los tres organismos reportados como visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber. Ejemplar hembra de Patagona gigas gigas (Trochilidae) (Pgg); ejemplar hembra de Sephanoides galeritus (Trochilidae) (Sg); Bombus dahlbomi (Apidae)- sexo no identificado (Bd).

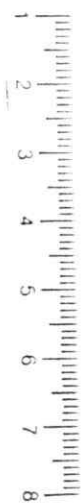
Bd



Sg



Pgg



tras P. gigas peruviana se distribuye desde el extremo norte de Chile hasta Ecuador (Goodall et al., 1946; Ortiz-Crespo, 1974). En el lado Argentino se han reconocido las dos subespecies (Contreras, 1978). La distribución de P. gigas gigas se sobrepone con la de Eccremocarpus scaber, excepto en la provincia de Chubut (Fig. 2) y en el Norte.

Patagona gigas gigas, tal como la subespecie peruviana (Carpenter, 1976), está descrita como migratoria (Goodall et al., 1946; Ortiz-Crespo, 1974). Aparece en la precordillera de Chile central desde Agosto, permaneciendo allí hasta Marzo, aunque se sospecha que existan algunas poblaciones permanentes en las condiciones mas oceánicas, en la Cordillera de la Costa (M. Sallaberry, com. pers.). La postura se realiza a fines de Septiembre y durante Octubre en la Cordillera de la Costa y en el interior, desde fines de Octubre hasta principios de Noviembre, período que se sobrepone con la época de floración de Eccremocarpus scaber. Se desconocen los lugares de migración durante el invierno.

Las fuentes de néctar de Patagona gigas en Chile, además de E. scaber, incluyen especies de Puya (Bromeliaceae), Lobelia (Campanulaceae), Tropaeolum (Tropaeolaceae), Fuchsia (Onagraceae), Lapageria (Philesiaceae), Tristerix (Loranthaceae) y Sophora (Papilionaceae) (Ortiz-Crespo, 1974).

La característica más notable de Patagona gigas es su tamaño corporal, que sobrepasa todas las otras especies de Trochilidae (Grant & Grant, 1968). La subespecie peruviana

puede llegar a 22 cm de largo y hasta 24 g de peso (Contreras, 1978). La subespecie gigas que nos interesa en esta tesis, mide hasta 21-22 cm (Goodall et al., 1946) y pesa un promedio de 17 g. (M. Sallaberry, datos no publicados); el pico mide un promedio de 34 mm de largo (Goodall et al., 1946). Patagona gigas es más de 9 veces más pesado que el picaflor más pequeño conocido (Calypte helenae) que pesa 1.8 g, y más de 3 veces más pesado que un picaflor promedio (5.0 g; Hainsworth, 1981).

iii). Sephanoides galeritus Molina (Fig. 4).-

Esta especie (picaflor) se encuentra únicamente en el lado occidental de Sudamérica en Chile y Argentina, así como en las Islas Juan Fernández (Barros, 1952) (Fig. 2). En Chile se distribuye desde Atacama hasta Tierra del Fuego, donde se encuentra desde la costa hasta los 2000 m.s.n.m., incluyendo las islas de Chiloé y Mocha. En Argentina, abarca desde la latitud de Mendoza hasta el extremo sur. Su amplia distribución incluye la de Eccremocarpus scaber (Fig. 2).

Sephanoides galeritus es facultativamente migratoria. Se desplaza altitudinal y latitudinalmente, sin embargo, en Chiloé es residente permanente (Barros, 1952). Las poblaciones de Atacama se establecen únicamente en invierno y son de procedencia desconocida. La postura se realiza en Octubre o Noviembre, período que corresponde con la época

de floración de Eccremocarpus scaber. Las fuentes de néctar señaladas para S. galeritus en Chile, aparte de E. scaber, incluyen Embothrium (Proteaceae), Tristerix (Loranthaceae), Lobelia (Campanulaceae) (Barros, 1952), Tropaeolum (Tropaeolaceae), Hippeastrum (Amaryllidaceae) (Uslar, 1982). Esta lista probablemente esté muy incompleta, considerando que incluye pocas especies del sur de Chile donde esta especie de picaflor es muy común.

Sephanoides galeritus en promedio mide 11 cm de largo (Goodall et al., 1946) y pesa 5.8 g (M. Sallaberry, datos no publicados); cae en el rango modal más frecuente para los picaflores. Su pico mide un promedio de 14 mm.

iv). Bombus dahlbomi Guér. (Fig. 4).-

Este himenóptero es la única especie social de Chile (Herbst, 1921). Su distribución en Chile abarca desde la latitud 25°S hasta Tierra del Fuego (J.C. Torres, com. pers.). En la colonia fundada por una reina en primavera, nacen inicialmente obreras cuya actividad forrajera consiste en cosechar polen y néctar que almacenan independientemente en celdillas del nido terrestre (Montealegre, 1931). De las obreras fecundadas nacen machos partenogenéticos que aparecen en Santiago, en Diciembre (Joseph, 1926). Todos los individuos de la colonia mueren entre Marzo o Abril y las reinas fecundadas permanecen hibernando hasta la primavera (Joseph, 1926).

Las fuentes de néctar de Bombus dahlbomi son numerosas

especies a lo largo de Chile. Ha sido citado como visitante de Eucryphia cordifolia (Eucryphaceae), Myrtus sp. (Myrtaceae) (Joseph, 1926), como también de Cerastium arvense (Caryophyllaceae), Chuquiraga oppositifolia, Mutisia sinuata, Nassauvia pungens, Senecio bustillosianus (Compositae), Phacelia secunda (Hydrophyllaceae), Stachys albicaulis (Labiatae), Calophora coronata, Loasa heterophylla (Loasaceae) (Arroyo et al., 1982) en Chile central.

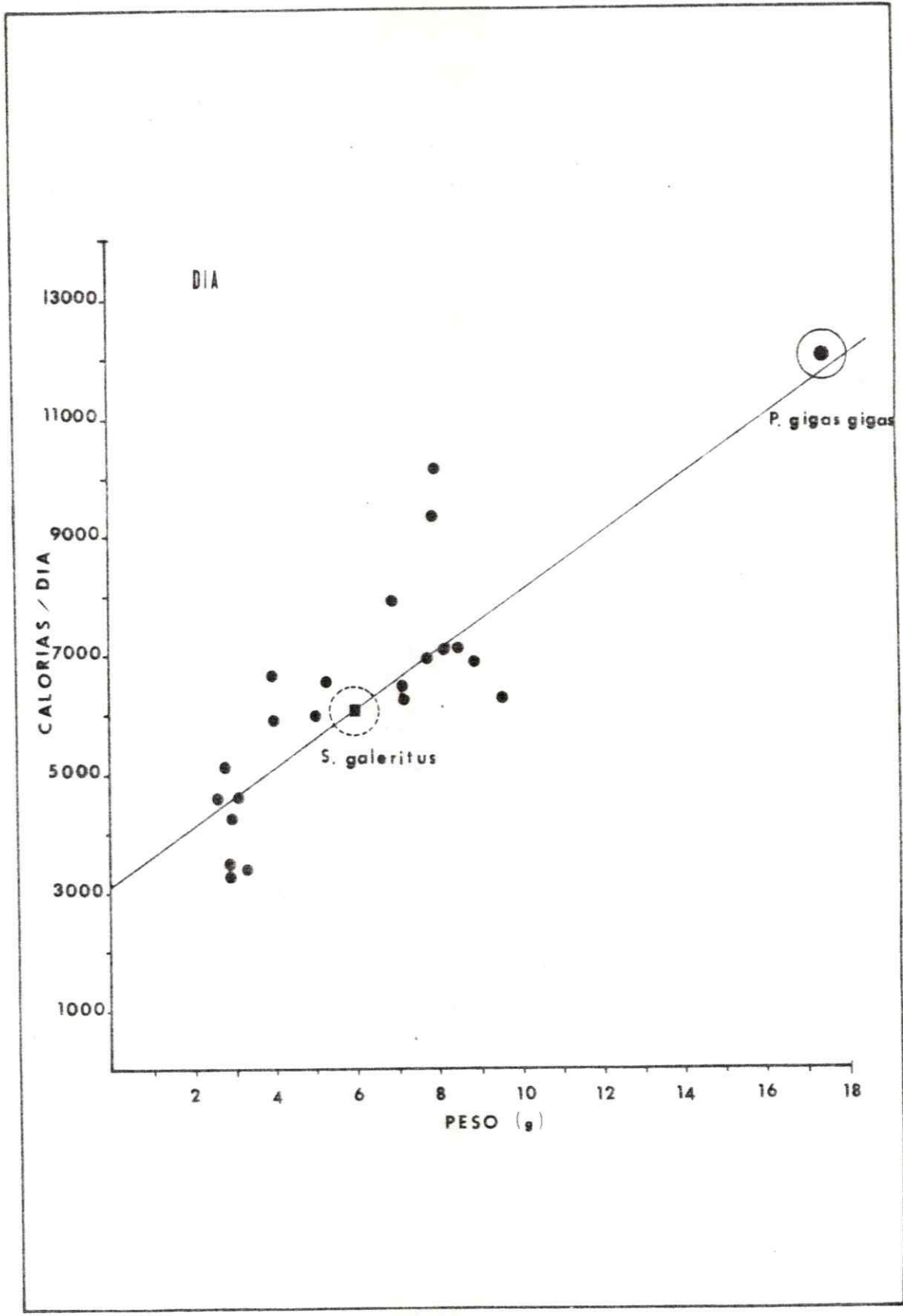
v). REQUERIMIENTOS ENERGETICOS DE LOS PICAFLORES.-

Kruger et al., (1982) determinaron, en condiciones de laboratorio, los requerimientos energéticos por gramo de peso de especies de picaflores de un amplio rango de tamaños, incluyendo Patagona gigas. Su estimación se basa en el consumo de oxígeno y producción de anhídrido carbónico. Las determinaciones las realizaron para las horas del día (incluyendo períodos de descanso y vuelo), de la noche sin entrar en sopor y de la noche, en el estado de sopor, según temperatura ambiente. Estos datos nos permitieron calcular la cantidad de calorías requeridas por los picaflores de diferentes tamaños, tanto para el día como para la noche, sin y con sopor (Fig. 5, 6A y 6B). A partir de los datos de Kruger et al., (1982) obtuvimos regresiones lineales significativas para el consumo energético durante las horas del día y de la noche sin sopor, que nos permitieron estimar el

## FIGURA 5.-

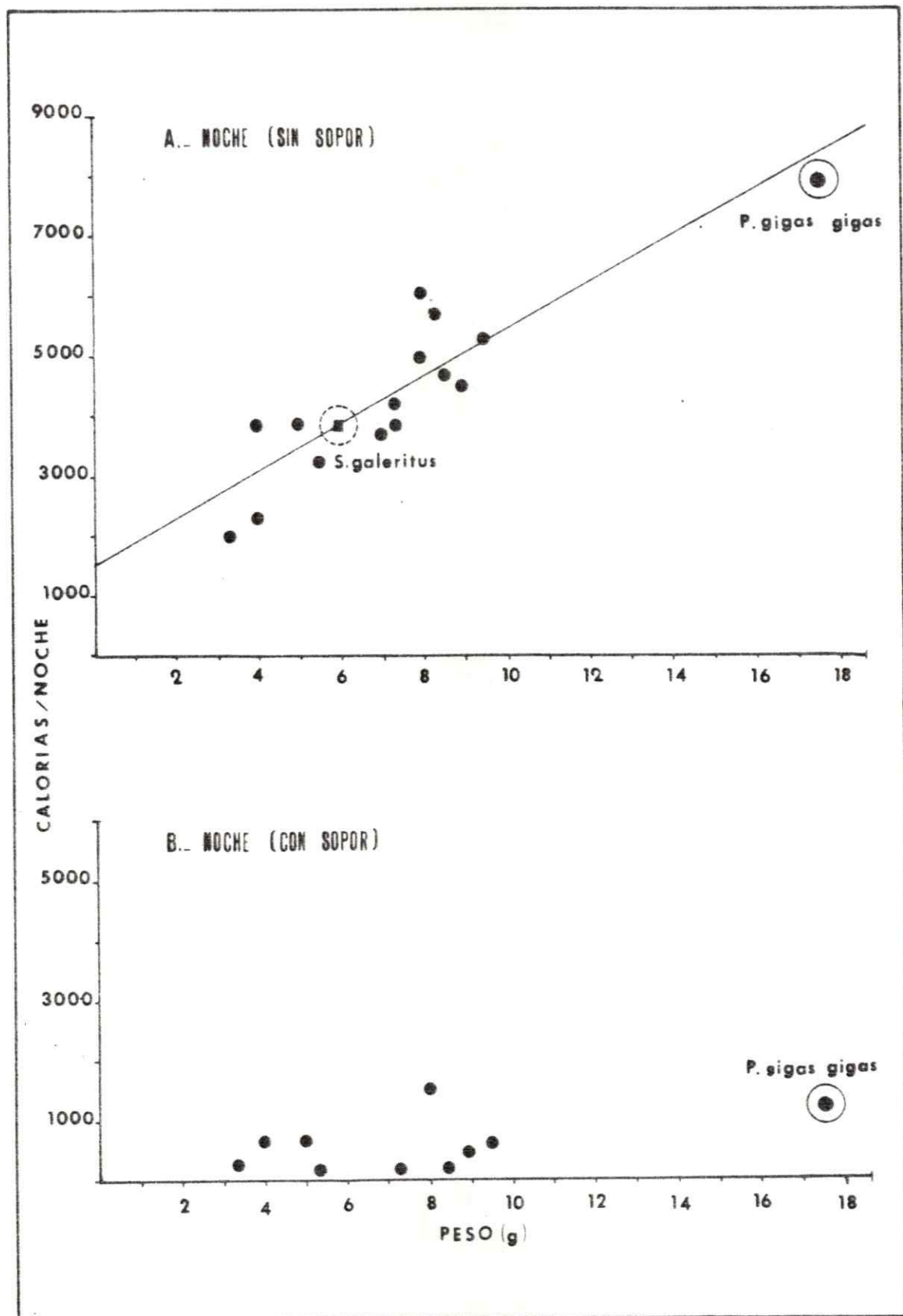
Requerimiento calórico diario (12 h) de distintas especies de picaflor, según su peso, a una temperatura promedio de 15°C, calculada de datos experimentales de Kruger et al. (1982). El valor de Patagona gigas es el experimental; el de Sephanoides galeritus fue estimado de la línea de regresión. Ecuación de regresión ( $y = 521x + 3161.3$ ;  $F = 51.18$ ; d.f. = 20;  $p < 0.001$ ).





## FIGURA 6.-

Requerimiento calórico nocturno (12 h) de distintas especies de picaflor según peso, con y sin sopor, a una temperatura promedio de 10°C, calculado de datos experimentales proporcionados de Kruger et al. (1982). Los valores de Patagona gigas son experimentales; el valor de Sephanoides galeritus, en el caso de la noche sin sopor, fue calculado de la línea de regresión ( $y = 385.11x + 1600.42$ ;  $F = 90.84$ ; d.f. = 19;  $p < 0.001$ ). La regresión en el caso de la noche con sopor ( $y = 37.02x + 376.73$ ;  $F = 2.53$ ; d.f. = 14 ;  $p = 0.134$ ) no es significativa.



requerimiento energético de Sephanoides galeritus.

Patagona gigas consume 12 046 cal en el día, 7 930 cal en la noche sin sopor y 1 255 cal en la noche con sopor. Estos valores son el doble de la energía requerida por un picaflor de peso promedio. Las calorías estimadas para Sephanoides galeritus son, 6 184 en el día y 3 834 en la noche sin sopor. No se pudo estimar la energía consumida por la última especie en el estado de sopor por falta de una regresión significativa; los requerimientos parecen ser independientes del tamaño (Fig. 6B). Los requerimientos energéticos en un período de 24 h de los picaflores (sin sopor) que visitan Eccremocarpus scaber podrían ser tan altos como 20 000 cal en el caso de P. gigas y 10 000 cal en el caso de S. galeritus, considerando que se piensa que, durante el período reproductivo las hembras de los picaflores no entran en sopor (Carpenter, 1974; 1976; Wolf & Gill, 1986). Estas cifras probablemente subestiman la demanda real de los picaflores, porque las condiciones experimentales no permitieron vuelo sostenido (Kruger et al., 1982). Para averiguar esto, se comparó el requerimiento energético de Calypte anna (4 g) según Pearson (1954) basado en la distribución real de sus actividades en un período de 24 h contra los valores generados por las curvas basadas en los datos de Kruger et al. (1982). Los requerimientos energéticos diarios de C. anna (10 320 cal sin sopor y 7 550 cal con sopor) citados por Pearson (1954) son un 20 % mayores que los calculados con las ecuaciones de regresión.

## III. MATERIALES Y METODOS.-

i). MUESTREO DE LOS VISITANTES DE LAS FLORES DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

Se cuantificó la actividad de visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber a lo largo del día en varias fechas durante la estación de floración en poblaciones naturales de la especie ubicadas en la cuenca del Río San Francisco, a orillas del Estero de la Yerba Loca, Villa Paulina (1700 m.s.n.m; 33°20'S, 70°20'W). Este sitio se eligió por encontrarse en el centro del rango altitudinal de la especie en Chile Central, por la abundancia local de ella, por la existencia de antecedentes de la fenología de floración y vectores de polinización (Uslar, 1982) y por su cercanía a Santiago. En esta localidad, E. scaber forma enramadas densas de aproximadamente 2 m de altura sobre especies como Escallonia myrtoidea y Lithraea caustica. En dichas enramadas frecuentemente se encuentran también Mutiicifolia y Tropaeolum tricolor.

A intervalos de 10 min a lo largo de las horas de luz (6 AM - 9 PM) se registró el número de visitas de cada vector y el tiempo de permanencia del visitante en cada flor en un área fija con alta densidad de individuos de Eccremocarpus scaber, con un número conocido de flores abiertas cada día de observación (cf. Arroyo et al., 1985).

El total de intervalos de 10 min observados sumaron entre 8 y 12 h de observación directa cada día, salvo un día en que la lluvia suspendió la observación a las 16 horas. Concomitantemente, se anotó cualquier otra especie de planta visitada por los organismos polinizadores de E. scaber. Las observaciones se realizaron cada 15 días (8-10 m de radio) en el intervalo comprendido entre fines de Octubre (inicio de la floración) hasta fines de Diciembre (fecha en que la floración comienza a declinar notoriamente) de 1983 y 1984. Los resultados se expresan como el porcentaje de visitas totales por polinizador y promedio de visitas por flor por hora (tasa de visita). El porcentaje de visitas proporciona un índice de la importancia relativa de los vectores, en relación al número total de fecundaciones esperadas. La tasa de visita señala la importancia del vector en relación al número de flores abiertas en una fecha determinada.

#### ii). MORFOLOGIA EXTERNA Y ANATOMIA DEL NECTARIO.-

Se estudió la superficie del nectario, usando microscopio electrónico de barrido, mediante la técnica descrita por Montenegro et al. (1980). Los nectarios de flores maduras fueron colectados en terreno de las poblaciones señaladas en III.i. El material fue transferido a tetróxido de osmio al 1 % y mantenido en la oscuridad por 30 min a 1 h; luego se lavó en agua destilada durante 5 min, con cambios sucesivos.

El material fue deshidratado en una batería de acetona (30-40-50-75-100 %), manteniendo toda la noche en acetona al 75 % y completando la deshidratación al día siguiente con acetona 100 % durante 30 min. Finalmente, el material fue llevado a secado de punto crítico, usando  $\text{CO}_2$  como líquido de transferencia por acetona. El punto crítico del  $\text{CO}_2$  se alcanza a 1080 libras de presión y  $31.5^\circ\text{C}$ . Finalmente, el material se cubrió con una capa de oro, de aproximadamente 300 Å de espesor, para ser observado en un microscopio electrónico de barrido SIEMENS.

La anatomía del nectario fue estudiada durante el desarrollo de la flor, a través de cortes transversales y radiales. El material fue colectado de flores de las mismas poblaciones naturales descritas anteriormente, entre Noviembre y Diciembre (época de máxima floración). Se definieron los siguientes estados de desarrollo:

1. Estado 1 (preantesis).-

Corresponde a yemas florales, etapa en la que aún no ha comenzado la secreción de néctar. Los nectarios midieron 1.0-2.2 mm de diámetro.

2. Estado 2 (antesis reciente).-

Corresponde a flores recién abiertas, etapa en que comienza la secreción. Los nectarios midieron 3.0-3.2 mm de diámetro.

3. Estado 3 (flores maduras).-

Corresponde a flores que se caracterizan por la intensa secreción. Los nectarios midieron 3.2-4.5 mm de diámetro.

4. Estado 4 (flores senescentes).-

Corresponde a flores en etapa de finalización de la secreción. Los nectarios midieron sobre 5 mm de diámetro.

El material fue fijado en FAA (alcohol etílico:ácido acético glacial:formaldehído:agua - 50:5:10:35) y deairado por vacío, en el mismo fijador por 24 h; se deshidrató en una batería de alcoholes, hasta llegar a alcohol butílico terciario al 100 %, trabajando a 60°C para evitar que este cristalice. Posteriormente, el material fue incluido en paraplast, de donde se obtuvieron cortes de 7-10  $\mu$ m. Los cortes se tiñeron con safranina-fast green o con azul de bromofenol.

Con el objeto de caracterizar el crecimiento y desarrollo celular de cada uno de los 4 estados definidos, se calculó el volumen celular de acuerdo a la metodología señalada por Dengler et al. (1986) de 100-200 células de cada tejido que conforma el nectario (epidermis, parénquima secretor y parénquima fundamental). En forma simultánea se midió el tamaño de los espacios intercelulares (aumento de 40 x) a lo largo de una línea imaginaria que atravesaba ca-



da uno de los tejidos. Posteriormente, se calculó la relación entre volumen de las células y tamaño de los espacios intercelulares, en cada uno de los tejidos.

### iii). ULTRAESTRUCTURA DEL NECTARIO.-

Cortes del nectario de las flores en los 4 estados de desarrollo señalados anteriormente fueron observados con el microscopio electrónico de transmisión.

Se colectó material fresco, de las mismas poblaciones señaladas en III.i. Por ser material biológico desconocido, se emplearon dos protocolos de fijación: (a) fijación en glutaraldehído al 2 %, en buffer fosfato pH 7, por 2 h a temperatura ambiente y (b) fijación en Karnovsky, en buffer cacodilato 0.2 M, pH 7.4. Posteriormente, el material fue post-fijado en tetróxido de osmio al 1 %, en buffer fosfato pH 7, por 90 min en oscuridad. Luego, se deshidrató en una batería de acetona, de concentraciones crecientes 30-50-70-90-95-100 %, realizando 3 cambios en esta última concentración, de 1 h cada una.

Se embebió en Spurr-acetona, trabajando al vacío todas las etapas de imbibición. La imbibición se realizó en 4 etapas, cada una de 30 min. La primera contenía 2 partes de acetona de 100 % y 1 parte de Spurr, la segunda, partes iguales de Spurr-acetona de 100 %, la tercera, 2 partes de Spurr y 1 de acetona de 100 % y la cuarta, solamente Spurr. La inclusión se realizó en un molde, donde se orientó el

material convenientemente para obtener cortes transversales medios. Se dejó toda la noche en Spurr a 70°C, para que la resina de inclusión polimerizara, paulatinamente.

Cortes gruesos de 1  $\mu$ m permitió seleccionar el área a estudiar al microscopio electrónico; las zonas seleccionadas fueron dejadas en el extremo del bloque que se talló, en forma de pirámide truncada. Se hicieron cortes finos, de 200-300 Å (color de interferencia gris o blanco), con ultramicrotomo marca Sorvall MT-2 Porter-Blum y se montaron directamente sobre rejillas de cobre, de 2.3 mm de diámetro y 0.2 mm de espesor. Las secciones se tiñeron por inmersión en una solución de acetato de uranilo al 4 % y citrato de plomo al 2 % (Cardemil & Jordan, 1982). El material fue observado en un microscopio Philips M-300.

#### iv). COMPOSICION DE AZUCARES DEL NECTAR.-

Los azúcares del néctar de Eccremocarpus scaber fueron analizados cualitativa y cuantitativamente por técnica de cromatografía en capa fina (TLC) y técnica colorimétrica de Antrona, que cuantifica azúcares totales (Dische, 1962). Una cierta cantidad de néctar fresco se obtuvo de la secreción floral, con microcapilares de volumen calibrado, de unas 200 flores en el estado 3 (flores maduras) en terreno, en la localidad señalada en III.i.

La solución de néctar fue diluida 20 veces y 1  $\mu$ l de esta dilución fue sembrado al lado de los azúcares estandar en una placa cromatográfica de celulosa. Los cromatogramas

fueron corridos por 5 veces consecutivas y secados entre cada corrida. El solvente estaba compuesto de etil acetato: ácido acético:ácido fórmico:agua (18:3:1:4).

Los cromatogramas fueron revelados para azúcares reductores (glucosa y maltosa) y no-reductores (sacarosa y fructosa). Para los reductores, se usó KOH 0.5 N y 0.5 ml de solución saturada de nitrato de plata, en 100 ml de acetona. La tinción de plata fue fijada con solución de tiosulfato de sodio al 10 %. Los azúcares no-reductores, fueron detectados en la placa cromatográfica con solución de resorcinol y ácido clorhídrico 1:5, calentando la placa a 60-70°C por unos minutos, hasta que aparecieran las manchas.

Una vez identificados los azúcares de acuerdo a los Rf calculados, se procedió a cuantificarlos. Para ello, placas cromatográficas sembradas 2 veces con azúcares estándares y 2 veces con las muestras de néctar (en forma de imagen de espejo), fueron corridas en el solvente y sólo una mitad revelada con tinción de plata o resorcinol. Los azúcares de la mitad no revelada, fueron extraídas de la placa por raspado de la mezcla celulósica del área correspondiente. Luego, el polvo celulósico fue diluido en 1 ml de agua destilada y calentado a baño maría a 70°C, por 15 min; posteriormente, se centrifugó en microcentrífuga por 10 min. A las soluciones resultantes se les agregó 2 ml de reactivo fresco de Antrona (200 mg de Antrona disuelto en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado; Dische, 1962); se leyó la

absorbancia de cada muestra a 620 nm en un Spectronic 20 Bausch & Lomb. La absorbancia fue convertida en mg de azúcar usando una curva de calibración confeccionada a partir de concentraciones conocidas de azúcares.

Se investigó la posible reabsorción de azúcares del néctar al nivel del nectario y del ovario de la flor usando  $^{14}\text{C}$ -sacarosa. Se trabajó con inflorescencias completas, bien desarrolladas, que presentaban flores en todos sus estados de desarrollo, obtenidas en terreno en la localidad señalada en III.i. Una vez retiradas, las inflorescencias fueron transferidas inmediatamente a cajas de hielo (aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$ ) y transportadas rápidamente al laboratorio, donde se colocaron con el tallo sumergido en agua para no paralizar la secreción de néctar.

El néctar de 3 flores en estado 4 (flores senescentes) fue contaminado con  $^{14}\text{C}$ -sacarosa, de radioactividad específica de  $4.4 \times 10^6$  cpm/mmol. Para esto, 5  $\mu\text{l}$  de solución de sacarosa de radioactividad específica señalada, se depositaron con una jeringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$ , en el néctar acumulado de flores, teniendo cuidado de no dañar su corola y nectario. Las inflorescencias fueron inmediatamente cubiertas por una campana de vidrio para mantener uniformes las condiciones de humedad.

Después de 24 h, el néctar de cada una de las tres flores fue retirado con microcapilares y su radioactividad determinada. En seguida, los ovarios y nectarios fueron disectados separadamente y lavados dos veces consecutivas con

1 ml de agua desionizada, por 30 min a temperatura ambiente. Los trozos de tejidos fueron posteriormente sometidos a 3 extracciones etanólicas, con 1 ml de etanol 80 % a 60°C, la primera duró toda la noche y las otras dos, 30 min cada una. Para detectar la radioactividad de los ovarios y nectarios, se mezcló cada una de las extracciones etanólicas con 10 ml de líquido de contador de centelleo (una solución de 4 g/l de PPO (2,5 difeniloxazol) y 50 mg/l de POPOP (2,2-p-fenilen-bis [feniloxazol], disueltos en tolueno-triton X-100 [2:1, v/v], con una eficiencia de 80-90 %). Al mismo tiempo, se comprobó que el néctar fue adecuadamente contaminado, determinando el nivel de radioactividad específica de una mezcla que contenía todo el néctar presente en las flores y 10 ml del líquido de contador de centelleo. Las cuentas fueron determinadas en un contador de centelleo para líquidos, marca Philips.

v). PATRON DE ACUMULACION DE NECTAR Y CAPACIDAD SECRETORA TOTAL DEL NECTARIO DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

Se determinó tanto el patrón de acumulación de néctar durante la vida de una flor, como la capacidad secretora total del nectario de Eccremocarpus scaber, mediante observaciones realizadas en flores aisladas de la actividad de polinizadores u otros organismos. Se trabajó con plantas de poblaciones muy extensas, ubicadas en la misma localidad a la señalada en III.i, entre fines de Octubre hasta fines

de Diciembre.

La gran variación observada en la cantidad de néctar que secreta una flor (ej. Cruden et al., 1983; Carpenter, 1983), hace indispensable hacer mediciones de muchas flores para poder detectar las tendencias con confianza. Con el objetivo de disponer de varias réplicas de los diferentes estados de desarrollo floral que intervienen en la secreción, se marcaron yemas florales cerradas de varios tamaños provenientes de 57 inflorescencias. Posteriormente, grupos de inflorescencias con yemas marcadas fueron aisladas de visitas de polinizadores con mallas plásticas, de rejilla de 1 mm x 2 mm, que cubrían totalmente las plantas.

Siete días después (período en el que todas las yemas marcadas abrieron y entraron en la etapa de secreción), se midió el largo de la corola y se extrajo el néctar acumulado en las flores, con microcapilares de 1, 5, 10, 20 y 25  $\mu$ l (Drummond, Corning), registrando primero el volumen y luego la concentración del néctar con un refractómetro manual (Bausch & Lomb). Las extracciones se efectuaron por un período de 24 h, eligiendo aleatoriamente las inflorescencias a muestrear. El muestreo aleatorio de las inflorescencias aseguró que ningún estado de desarrollo de las flores estuviese sujeto a condiciones ambientales diferentes a las demás en cuanto a temperatura y humedad relativa en el día de muestreo. Se complementó esta observación con un muestreo del néctar disponible en la población, que corresponde al néctar presente en flores abiertas, no

cubiertas con malla. Para dicho propósito, a las 14 h se extrajo néctar de todas las flores abiertas de 29 inflorescencias, a fines de Diciembre de 1983. De esta manera se aseguró que todas las etapas de desarrollo estuviesen representadas.

Se calcularon las cantidades de los dos componentes del néctar mas relevantes para la dieta de un polinizador biótico (azúcares y agua), según la etapa de desarrollo de la flor. Para los azúcares se usó el factor de corrección de Cruden et al., (1983) que estandariza las concentraciones del refractómetro a valores peso/volumen:

$$y = 0.0046 x + 0.9946$$

donde  $y$  es mg de azucar y  $x$ , la concentración del néctar (peso de soluto respecto a peso de solución - valor del refractómetro).

Para estimar el contenido de agua en el néctar, se restó de los volúmenes de néctar registrados en terreno, el volumen correspondiente a la cantidad de azúcares presente. El volumen ocupado por una cantidad conocida de azúcares fue determinado previamente en el laboratorio. Para determinar el valor energético del néctar se convirtieron las cantidades de azúcares a calorías (1 mg de azucar = 4.0 cal Heinrich & Pantle, 1975).

vi). PATRON DIARIO DE SECRECION DE NECTAR EN FLORES DE  
ECCREMOCARPUS SCABER.-

Se investigó el patrón diario de secreción de néctar determinando la cantidad de azúcar y agua secretada, y la concentración del néctar a intervalos de 6 h a lo largo de un período de 24 h. A las 6 PM del día de muestreo, se marcaron flores abiertas del tamaño correspondiente al estado 3 (activa secreción; 22-26 mm de largo) con anteras no perturbadas (sin evidencia de actividad de polinizadores), provenientes de varios individuos de una población densa de Eccremocarpus scaber, ubicada en la ribera del valle del Río San Francisco, ca. 6 km de la intersección del camino a la Mina La Disputada Las Condes y Farellones, 1600 m.s.n.m. Las observaciones se realizaron durante el período de máxima floración de la especie (mediados de Noviembre), trabajando en días soleados, libres de neblina y sin viento.

De cada flor marcada, se retiró y desechó el volumen de néctar acumulado hasta el momento de las observaciones, con microcapilares (Drummond) de 1, 5 y 30  $\lambda$ . Luego, para asegurar que el nuevo néctar secretado no se contaminara con polen, como también para facilitar la manipulación de las flores, se retiraron cuidadosamente con pinzas, las anteras de cada flor. En seguida, se taparon las plantas usando mallas plásticas (rejilla de 1 mm x 2 mm) para impedir que el néctar acumulado fuera extraído por polinizador-



res u otros organismos.

Seis horas después de tapadas las flores (a las 12 PM) nuevamente usando microcapilares de volumen calibrado, se extrajo cuidadosamente todo el néctar acumulado en cada flor individual, registrando el volumen presente. El néctar de cada flor fue transferido a frascos independientes que contenían 50  $\mu$ l de agua destilada. Se repitió este mismo procedimiento con el néctar acumulado entre las 12 PM - 6 AM, 6 AM - 12 AM y 12 AM - 6 PM respectivamente, completando así un ciclo de 24 h. Se mantuvo registros de la temperatura ambiental a intervalos de 1 h para la mayoría de las horas en el ciclo de 24 h. Posteriormente se determinó la concentración del néctar colectado por flor con un refractómetro marca Zeiss, rango 0-95 %, en equivalentes de sacarosa. Para las determinaciones de concentración, se eliminó aquellas muestras de néctar cuyo volumen era igual o inferior a 1  $\mu$ l, debido a que la presencia de residuos de tejido del nectario en el néctar podrían introducir un error apreciable en los datos en volúmenes tan pequeños.

Para el néctar acumulado en cada intervalo de seis horas, se determinó la cantidad de azúcar y de agua presente según la metodología descrita en III.v.

## IV. RESULTADOS.-

i). ORGANISMOS QUE VISITAN FLORES DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

En el total de 388 períodos de 10-minutos de observación efectuados en los dos años de estudio, cuatro organismos (Tabla 1) visitaron las flores de Eccremocarpus scaber: los picaflores Patagona gigas y Sephanoides galeritus (Trochilidae) reportados previamente por Uslar (1982), el abejorro Bombus dahlbomi (Apidae), también reportado por Uslar (1982), pero en calidad de "ladrón de néctar", y una mariposa no reportada anteriormente, Tatochila mercedis (Pieridae).

a). COMPORTAMIENTO DE LOS VISITANTES DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

Ambos picaflores visitaron Eccremocarpus scaber en los dos años de estudio (Fig 7). Patagona gigas se alimentó del néctar de E. scaber desde Octubre hasta Diciembre (Fig. 7A), estando presente en el 100 % de los días de registro en 1983, y en el 80 % en 1984 (Fig. 7B). Sephanoides galeritus comenzó su actividad en E. scaber más tarde que P. gigas, a partir de mediados de Noviembre, presentándose en el 60-66 % de los días de observación (Fig 7A y B). La intensidad de visitas de ambos picaflores es baja (Tabla 1;

Tabla 1. Frecuencia de visitas de los visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber basada en 388 intervalos de 10-minutos de observación (92 horas) de 1983 y 1984.

Visitante	Presencia respecto al número total de periodos de 10-min registrados.	Presencia respecto al número total de horas registradas.	Presencia respecto al total de periodo con visitas.
	(%)	(%)	(%)
P. gigas	6.19	22.82	80.13
S. galeritus	3.61	14.13	14.10
B. dahlbomi	18.81	29.35	8.97
T. mercedis	1.29	4.35	3.21

## FIGURA 7.-

Meses de actividad (A) de los visitantes de flores de Eccremocarpus scaber y porcentaje de días de observación con actividad (B) en cada caso.

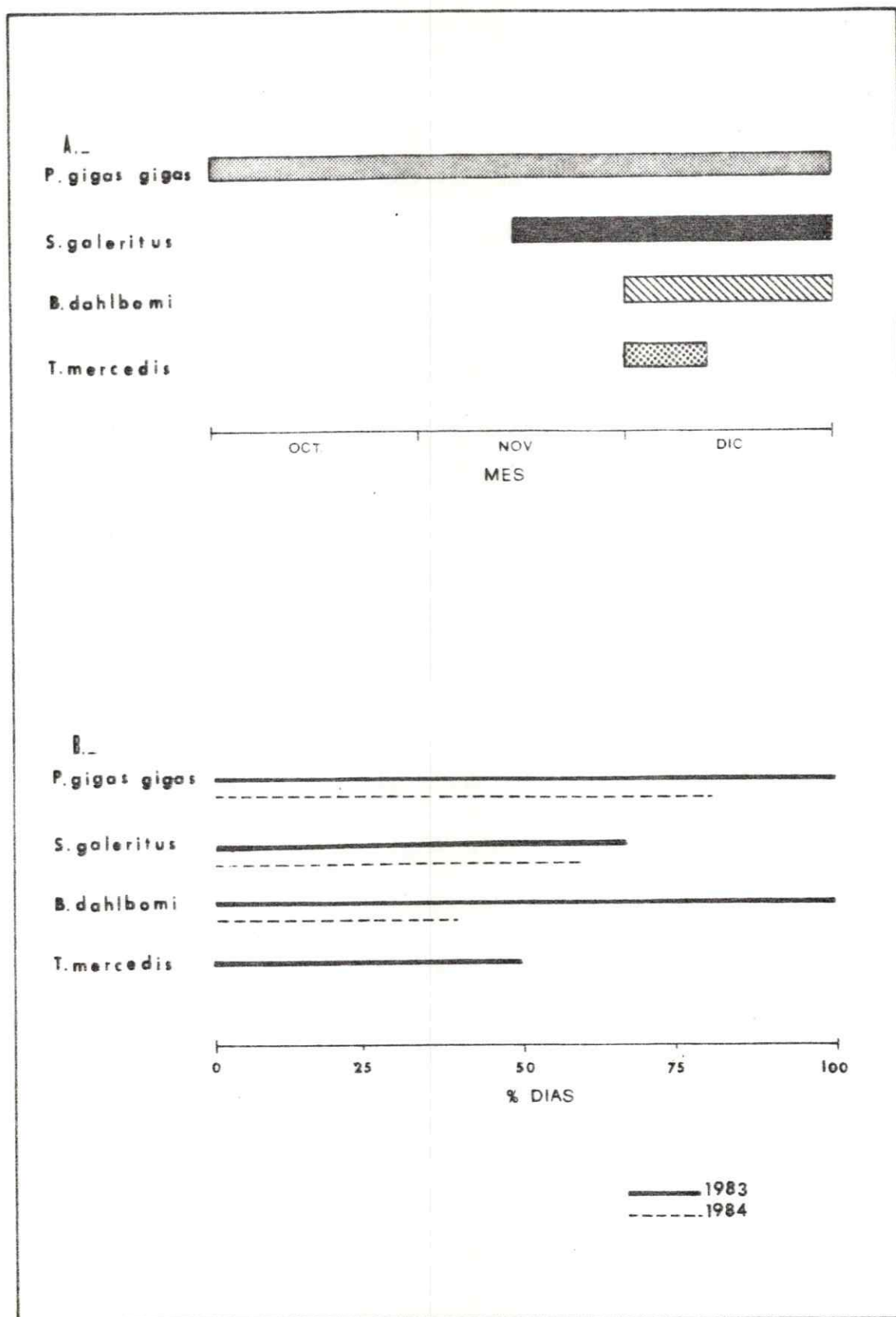


Fig. 8).

El número de flores visitadas por los dos picaflores en cada avistamiento en el área de estudio (promedio de 5.16 y 5.41; Tabla 2), fue relativamente bajo y no hubo diferencias significativas entre las especies ( $Z = 0.441$ ;  $p = 0.330$ ; Prueba de dos muestras de Wilcoxon [PW]). En el caso de Patagona gigas esta tendencia está relacionada con su estrategia de colecta denominada "traplining" (Janzen 1971; Feinsinger & Colwell, 1978). Observamos en varias oportunidades que volaba a lo largo de la ribera del río, cosechando néctar por períodos cortos en plantas separadas entre sí, volviendo luego al mismo punto de descanso. Aunque visita pocas flores por vuelo, no se sabe si S. galeritus es un típico "trapliner". Su pequeño tamaño, dificulta seguirlo en vuelo.

Los picaflores se alimentan introduciendo su pico en el tubo de la corola, permaneciendo suspendidos en el aire. Como resultado de la introducción del pico al tubo angosto de la corola, la flor se desplaza de su posición semierecta, doblándose hacia abajo de modo que la boca se encuentra en una posición invertida con respecto a lo normal. El único contacto entre el animal y la flor se da entre el pico y los órganos al interior de la corola. Al retirar el animal su pico, la corola retorna a su posición semi-erecta. El tiempo de permanencia de los picaflores en una flor es muy corto (Tabla 2; Fig. 9), y no difieren estadísticamente entre las dos especies ( $Z = 0.793$ ;  $p = 0.214$ ; PW). Las flores

## FIGURA 8.-

Distribución de frecuencias de números de flores visitadas por avistamiento de los visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber.

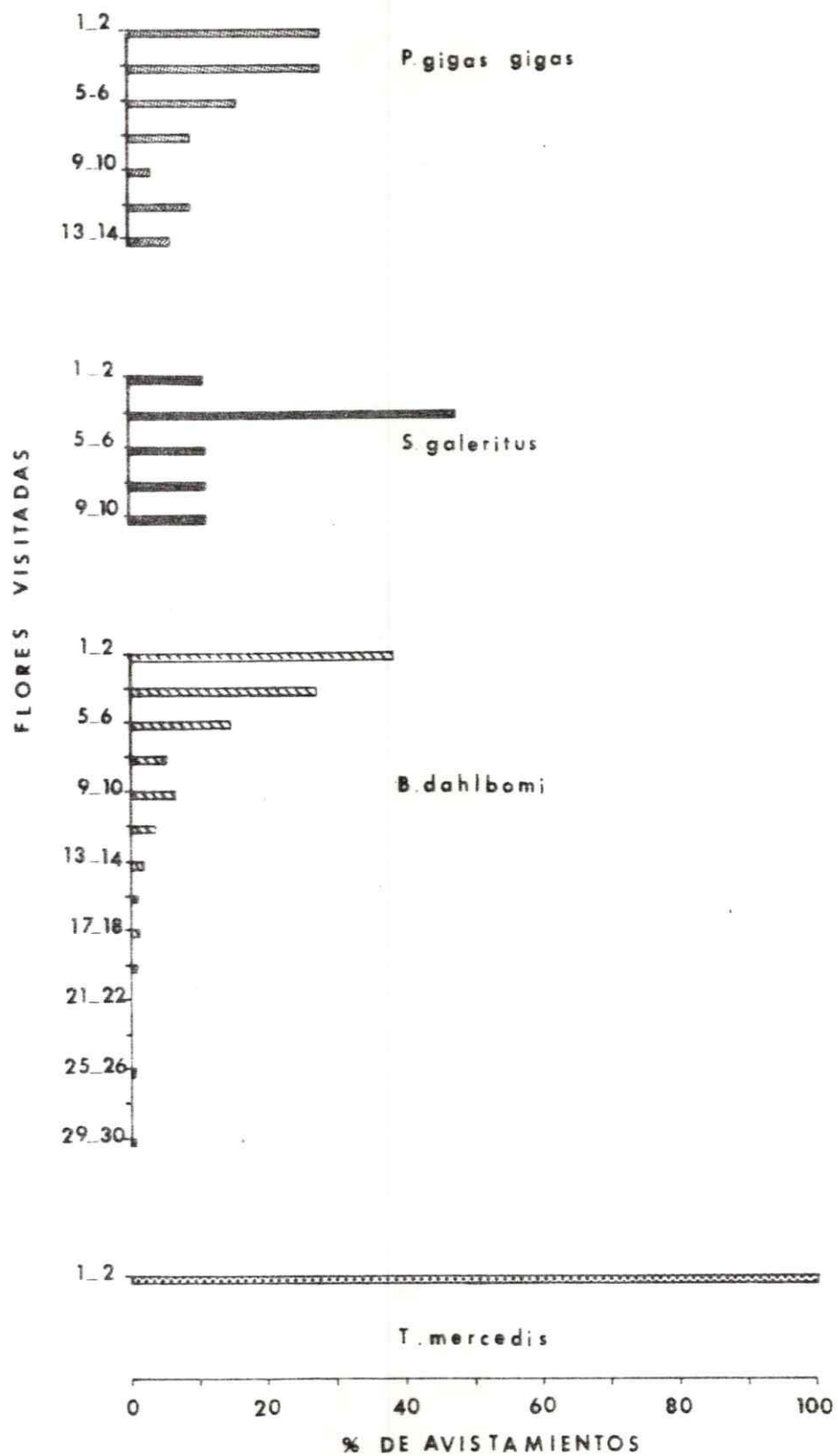


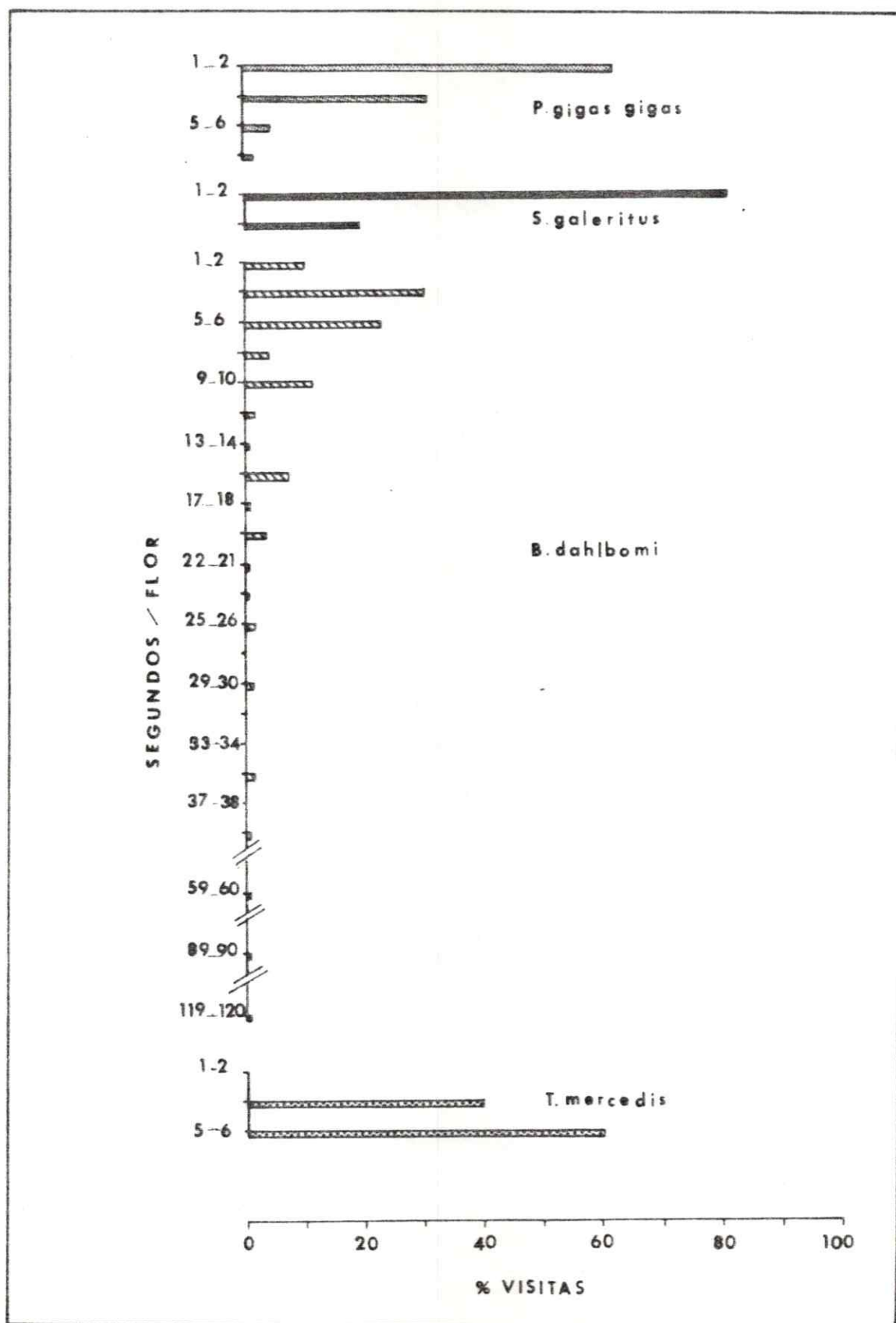


Tabla 2. Aspectos del comportamiento de los visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber.

Visitante	No. flores visitadas por avistamiento			Duración de las visitas por flor (seg)		
	$\bar{X} \pm SE$	Rango	n	$\bar{X} \pm SE$	Rango	n
P. gigas	5.16±0.65	1-14	32	2.34±0.18	1-8	61
S. galeritus	5.41±0.99	1-18	17	1.94±0.12	1-3	31
B. dahlbomi	4.57±0.24	1-29	296	8.55±0.52	1-120	408
T. mercedis	1.00±0	-	5	4.60±0.51	3-6	5

## FIGURA 9.-

Distribución de frecuencias del tiempo invertido por flor de los visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber.



que se observaron inmediatamente después de las visitas de P. gigas estuvieron totalmente desprovistas de néctar, indicando que el método de extracción de néctar es altamente eficaz (Tabla 3).

Desde Octubre hasta Diciembre, Eccremocarpus scaber es sin duda la principal fuente de néctar utilizada por Patagona gigas en el área de estudio. No fue observado en ninguna otra especie de planta durante este período. En cambio Sephanoides galeritus frecuentemente visitó Tropaeolum tricolor (Tropaeolaceae) en Octubre y Mutisia ilicifolia (Compositae) a fines de Noviembre y Diciembre.

Bombus dahlbomi visitó las flores de Eccremocarpus scaber únicamente en el mes de Diciembre (Fig 7A). Basado en los registros de visitas, su actividad fue alta (Tabla 1; sin embargo ver IV.i b). Eccremocarpus scaber es una de las muchas fuentes de néctar de B. dahlbomi en el área de estudio. En el período en que florece Eccremocarpus scaber, B. dahlbomi también visita Mutisia ilicifolia (Compositae), Cynoglossum creticum (Boraginaceae), Aristotelia chilensis (Elaeocarpaceae), Tropaeolum tricolor (Tropaeolaceae), y Phacelia secunda (Hydrophyllaceae).

Bombus dahlbomi visita un número menor de flores en cada avistamiento comparado con los picaflores ( $Z = 1.865$ ;  $p = 0.031$ ; PW) y, como se refleja en el rango (Tabla 2) y distribución de frecuencia de flores visitadas (Fig. 8), su comportamiento en Eccremocarpus scaber es notablemente más variable. Puede visitar una sola flor, o incluso re-

Tabla 3. Néctar residual en flores de Eccremocarpus scaber medido inmediatamente después de visitas de Patagona gigas y Bombus dahlbomi. Los datos para cada especie fueron tomados en dos fechas independientes.

	No. flores	Largo corola (rango mm)	Néctar residual ( $\mu$ l)	
			$\bar{x} \pm SD$	Rango
P. gigas	22	23-29	0 $\pm$ 0	-
B. dahlbomi	22	23-26	2.74 $\pm$ 2.24	0.1-9.8

correr la inflorescencia desde la base hasta el ápice, moviéndose de inflorescencia en inflorescencia en la misma planta. Para alimentarse, se sujeta al borde recurvo de la corola con 2 o 3 de sus pares de patas. La cabeza se mantiene prácticamente libre de contacto con la corola y el aparato bucal de ca. 3 mm de largo sólo se introduce superficialmente en el tubo de la corola. Debido al peso del animal, la flor se desplaza de su posición semi-erecta a una posición colgante. En esta postura el abejorro cosecha néctar de la flor durante períodos largos de tiempo ( $X = 8.55$  seg; Tabla 2), que son estadísticamente mayores que los de los picaflores ( $Z = 11.615$ ;  $p < 0.001$ ; PW). A pesar de que B. dahlbomi cosecha néctar por períodos muy largos, a diferencia de los picaflores no logra vaciar completamente las flores (Tabla 3).

Las cargas de polen examinadas de tres individuos que visitaron flores de Eccremocarpus scaber, capturados en el mes de Diciembre de 1983, no reveló ningún grano de polen de esta especie, indicando que Bombus dahlbomi probablemente raras veces constituye un polinizador efectivo de E. scaber. Esto no es sorprendente; aunque su lengua (glosa) alcanzara el néctar en la parte ensanchada de la corola, su aparato bucal corto sólo alcanza las anteras del par de estambres más largo pero de ninguna manera alcanzaría al estigma ubicado profundamente en el tubo de la corola. Por otra parte, la glosa de B. dahlbomi de 5.5 mm, no es lo suficientemente larga como para alcanzar el fondo del tubo de

la corola. Este hecho probablemente explicaría porqué queda néctar residual después de sus visitas.

Tatochila mercedis se presentó en las flores de Eccremocarpus scaber únicamente en Diciembre de 1983 (Fig. 7); su intensidad de visita fue baja (Tabla 1). Eccremocarpus scaber es aparentemente una fuente secundaria de néctar de T. mercedis. En el área de estudio tiende a visitar Mutisia ilicifolia mucho más frecuentemente. Aunque estuvo presente en el área de estudio en 1984, no visitó E. scaber. Se comporta de una manera similar al del abejorro en cuanto a la extracción de néctar. Se sujeta al borde recurvo de la corola con sus 6 patas, introduciendo su larga y fina proboscis dentro del tubo de la corola y sin introducir la cabeza. Visitó una flor por avistamiento (Tabla 2) permaneciendo más tiempo en una flor que los picaflores ( $Z = 3.182$ ;  $p = 0.001$ ; PW), pero no con respecto a Bombus dahlbomi ( $Z = 0.492$ ;  $p = 0.311$ ; PW). A diferencia de Bombus dahlbomi, los individuos de T. mercedis permanecen en E. scaber muy poco tiempo recorriendo largas distancias antes de seleccionar nuevas fuentes de néctar.

b). NUMERO DE VISITAS.-

En 1983 (Tabla 4) Bombus dahlbomi efectuó el mayor porcentaje de las visitas registradas (93.25 %) a las flores de Eccremocarpus scaber, seguido por los picaflores con un total de 6.4 % de las visitas. En dicho año, la tasa de visita de B. dahlbomii (Tabla 4) fue superior a la de los

Tabla 4. Porcentajes relativos de visitas efectuadas y tasas de visita ( $\bar{X}$  visitas/flor/hora x 100) de los visitantes de las flores de Eccremocarpus scaber.

Visitante	% del número total de visitas		$\bar{X}$ visitas/flor/hora x 100	
			( $\bar{X} \pm SE$ )	
	1983 (n=1437)	1984 (n=178)	1983 (n=28)	1984 (n=64)
P. gigas	4.24	58.43	1.40±0.7	7.0±3.5
S. galeritus	2.16	34.27	0.40±0.2	0.7±0.3
B. dahlbomi	93.25	7.30	9.20±1.4	0.1±0.1
T. mercedis	0.35	0	0.03±0.01	0



picaflores ( $Z = 5.703$ ;  $p < 0.001$ ; PW). Tatochila mercedis efectuó menos del 1 % de las visitas, con una tasa significativamente inferior a la de B. dahlbomi ( $Z = 5.375$ ;  $p < 0.001$ ; PW), pero no en relación a los picaflores ( $Z = 0.445$ ;  $p = 0.324$ ; PW). En 1984 se invirtieron los porcentajes relativos de las visitas entre B. dahlbomi y los picaflores con los últimos efectuando 91.15 % de las visitas y B. dahlbomi, 8.84 %. En dicho año las tasas de visita de los picaflores (Tabla 4) fueron superiores a las de B. dahlbomi ( $Z = 1.650$ ;  $p = 0.049$ ; PW).

El alto porcentaje de visitas efectuado por B. dahlbomi en 1983, debe interpretarse con cautela. En primer lugar, los datos en este año fueron tomados exclusivamente en el mes de Diciembre. Como se señaló anteriormente, todas las visitas efectuadas por Bombus dahlbomi corresponden al mes de Diciembre, independientemente del año (Fig. 7). Por lo tanto, el alto porcentaje de visitas de B. dahlbomi en 1983 sería parcialmente un artefacto del período en que se efectuó el muestro de ese año. Por otra parte, en 1983, por casualidad, un individuo de B. dahlbomi había construido su nido terrestre en la inmediaciones de las poblaciones de Eccremocarpus scaber en estudio, aumentando sobre el promedio el número de insectos en el área.

Aunque Bombus dahlbomi efectuó proporcionalmente más visitas que los picaflores en 1983, es interesante que las tasas de visita de los verdaderos polinizadores de Eccremocarpus scaber para el mes de Diciembre 1983 y 1984

(mes en que se tomó datos en los dos años), no son significativamente diferentes (P. gigas:  $Z = 0.648$ ;  $p = 0.258$ ; S. galeritus:  $Z = 0.210$ ;  $p = 0.417$ ; PW). En cambio, la tasa de visita de B. dahlbomi de 1984 (año en que no hubo construcción de nido en las cercanías del área de estudio) decayó significativamente con respecto a 1983 ( $Z = 5.270$ ;  $p < 0.001$ ; PW).

c). ROL RELATIVO DE PATAGONA GIGAS Y SEPHANOIDES GALERITUS POLINIZADORES PRINCIPALES DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

De los patrones de comportamiento y de las visitas se puede concluir que los picaflores son los polinizadores más importantes de Eccremocarpus scaber; queda por establecer su importancia relativa.

En 1984, sumando todas las visitas efectuadas a lo largo de la temporada, Patagona gigas efectuó casi el doble del número de visitas que Sephanoides galeritus (Tabla 4;  $Z = 3.467$ ;  $p < 0.001$ ; Prueba de Igualdad para dos Proporciones [PIP]). Igual tendencia se observó en 1983, a pesar que el muestreo estuvo restringido al mes de Diciembre ( $Z = 3.309$ ;  $p < 0.001$ ; PIP). En términos del número de visitas absolutas efectuadas, por lo tanto, P. gigas sería el polinizador más importante de E. scaber. Las tasas de visita (Tabla 4) revelan una tendencia similar, aunque dicha tendencia no llega a ser significativa (P. gigas vs S. galeritus:  $Z = 0.758$ ;  $p = 0.224$  para 1984;  $Z = 0.901$ ;  $p = 0.184$  para 1983; PW).

ii). EL NECTARIO DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

El nectario de Eccremocarpus scaber es un disco anular anaranjado que puede variar entre amarillo y rojo, mide hasta 5 mm de diámetro y 1.5 mm de alto en la etapa secretora; se ubica entre la base del ovario y la base del tubo de la corola (Fig. 10 y 11) y se origina por ensanchamiento de tejidos en la base del ovario y del receptáculo (Fig. 11A).

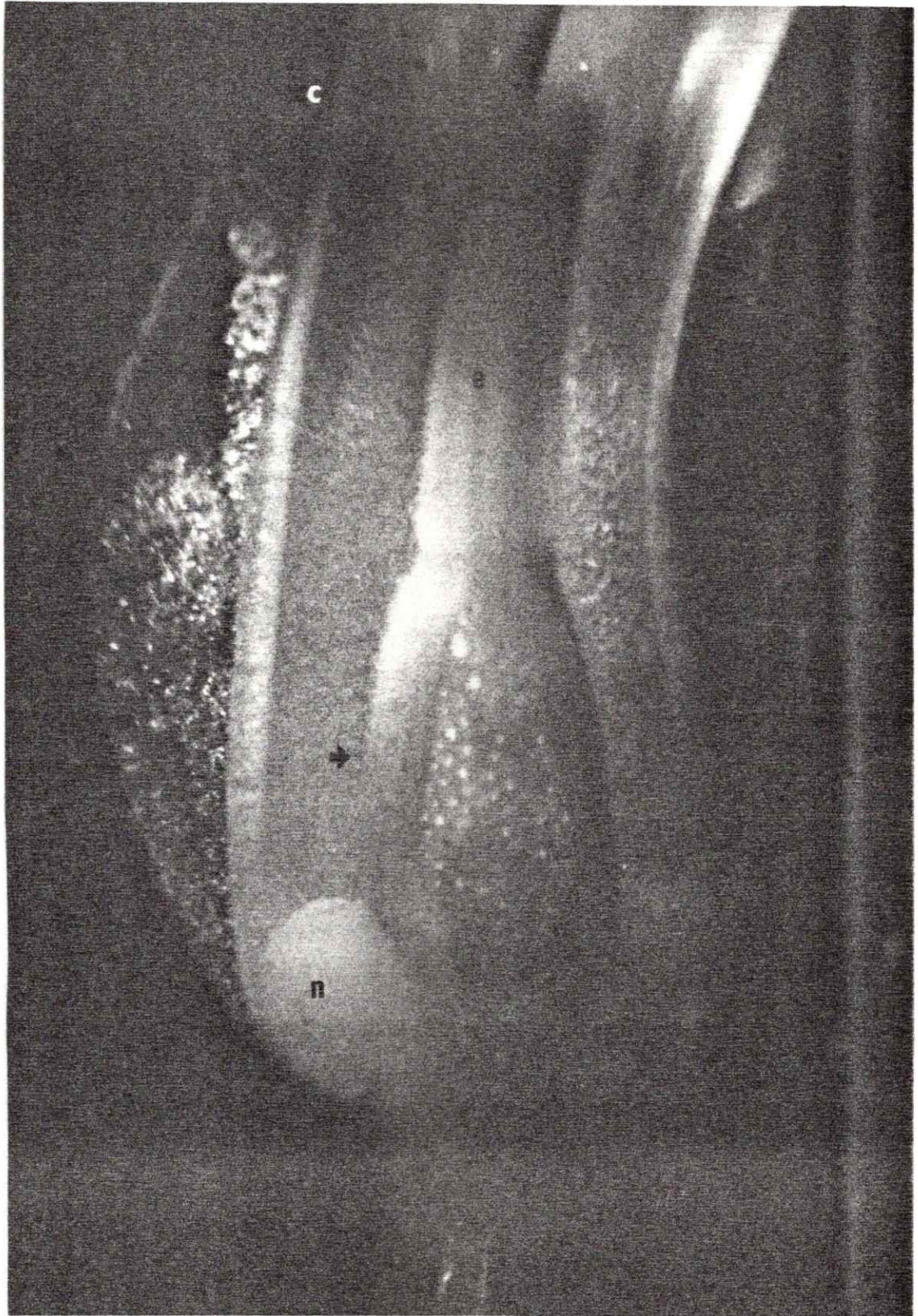
a). MORFOLOGIA EXTERNA DEL NECTARIO.-

Las observaciones realizadas a través del microscopio electrónico de barrido muestran que el nectario es anular y de superficie lisa (Fig. 11A), a diferencia de la del ovario (Fig. 11B), el que está densamente tapizado por tricomas; estos poseen grandes cabezas, pie corto ensanchado hacia la base. Los tricomas también se observaron a lo largo del estilo y sépalos, aunque en menor densidad. La epidermis del nectario también se caracteriza por la presencia de estomas muy prominentes (Fig. 12), distribuidos al azar en la superficie y aislados entre sí, compuestos de dos células guardianas, con pared cutinizada.

Observaciones en nectarios completos e intactos, separados de flores en plena secreción, revelaron que los estomas están diferencialmente distribuidos en ambas epidermis. Sólo la epidermis externa, que es el tejido que enfrenta a

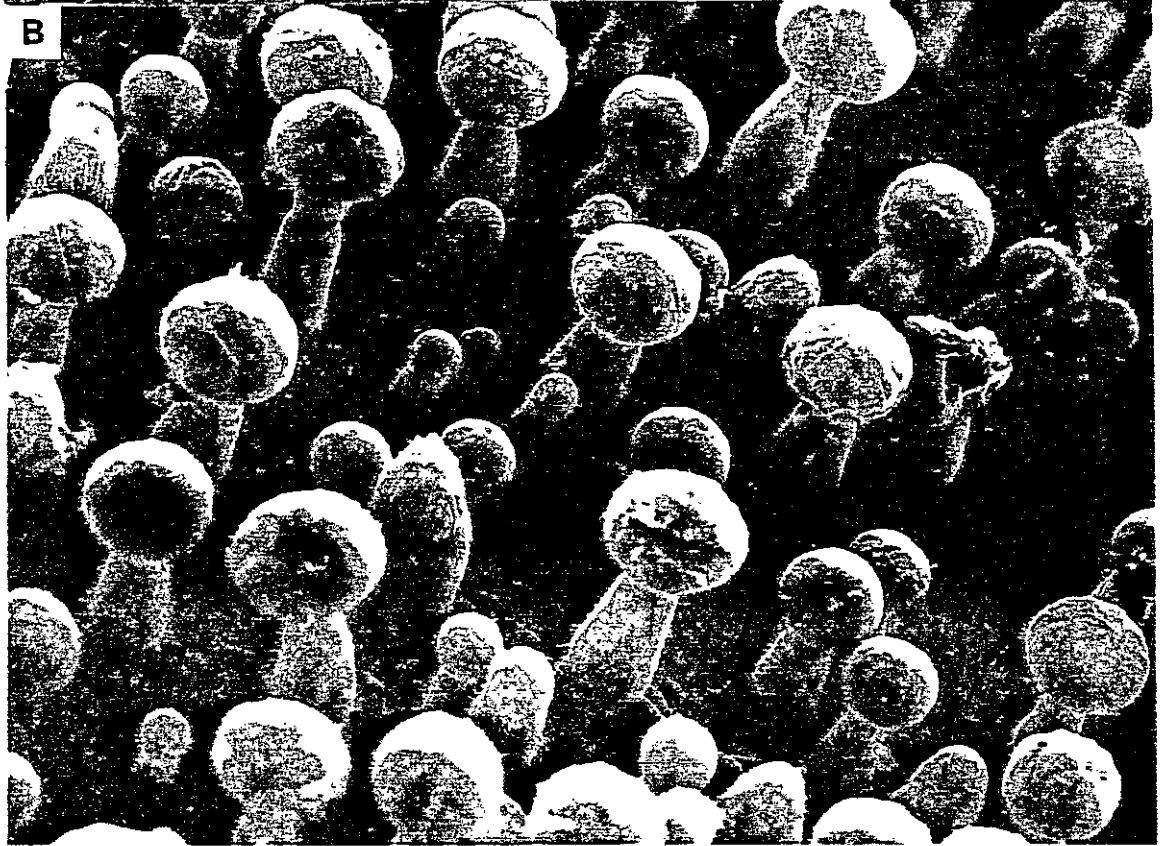
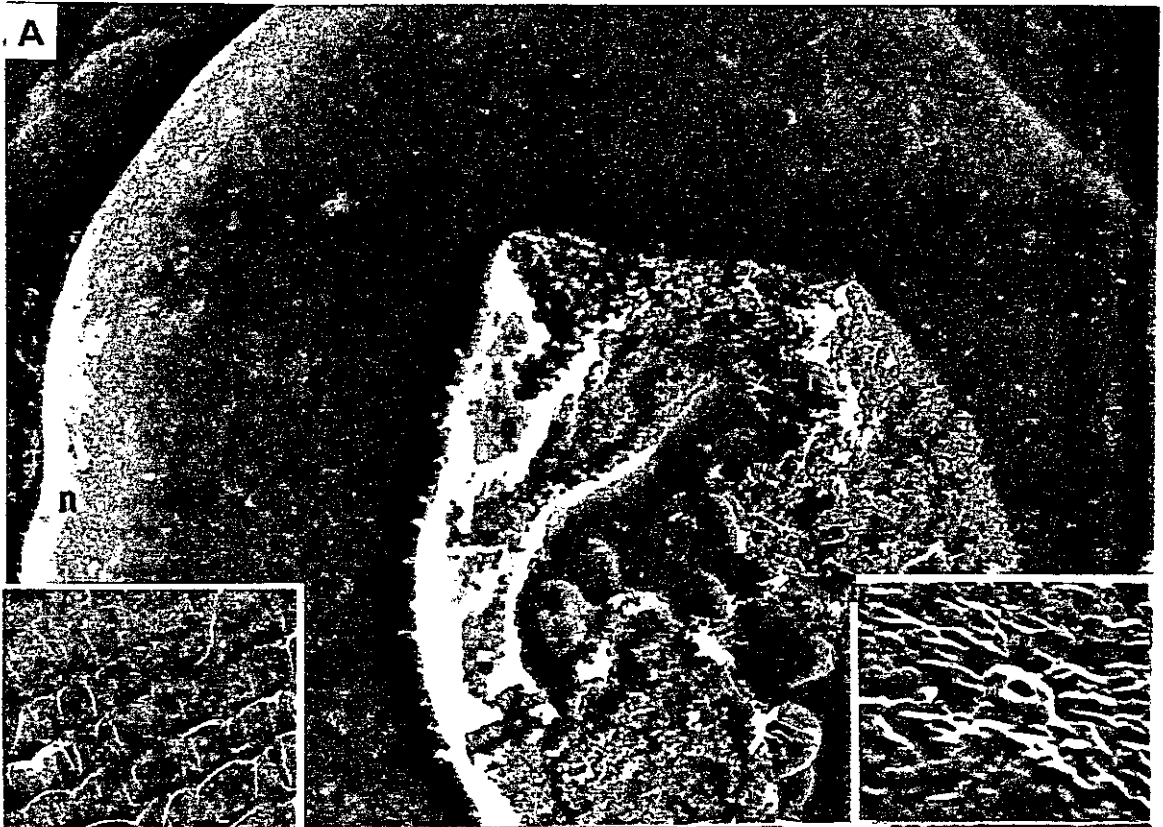
## FIGURA 10.-

Corte longitudinal de la corola de Eccremocarpus scaber. Nectario (n); estilo (e); corola (c); la flecha indica el ovario (x 8).



## FIGURA 11.-

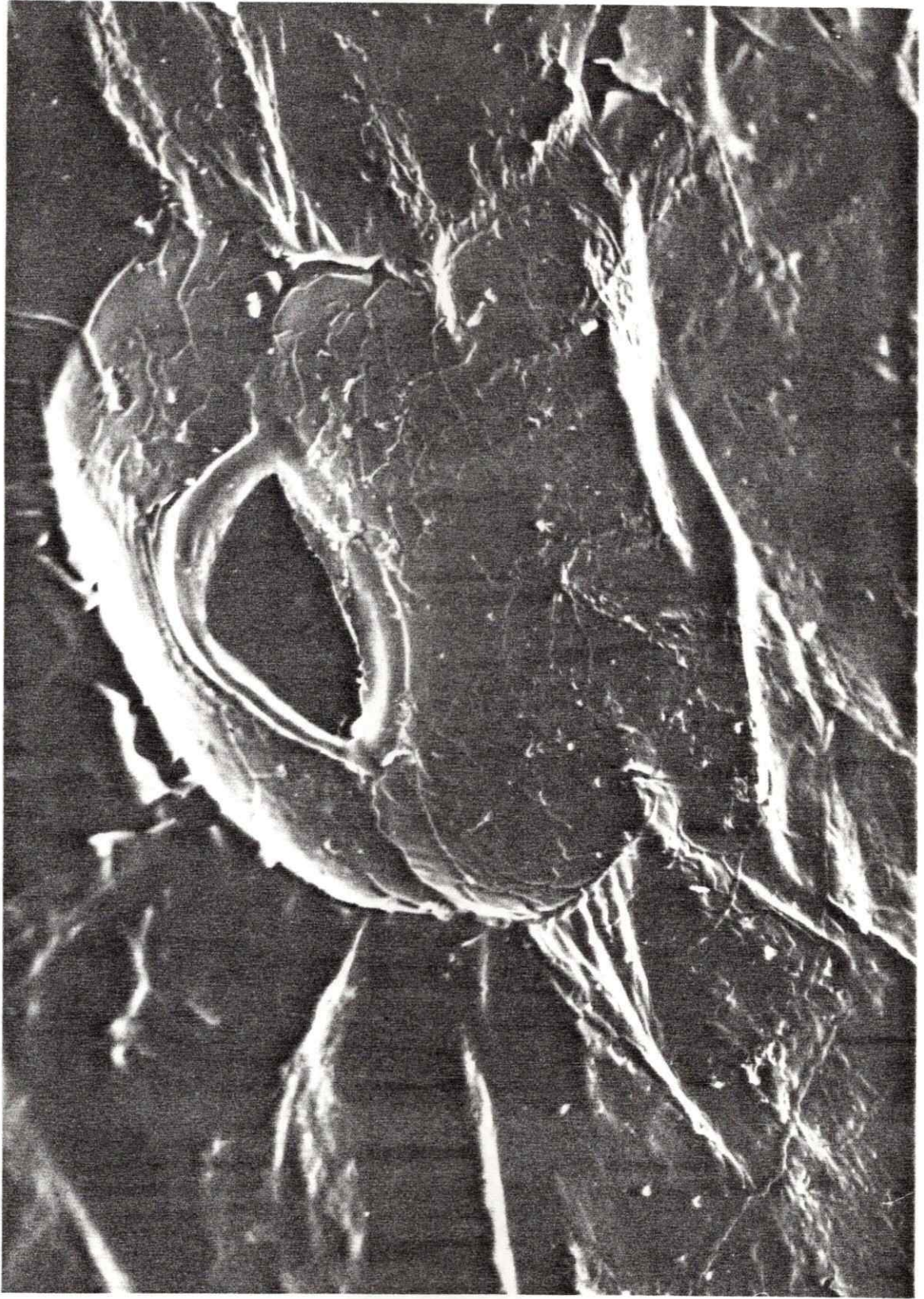
Superficie del nectario y ovario observado con microscopio electrónico de barrido (SEM). A. Aspecto del nectario anular in situ (n). El ovario (o) está cortado transversalmente y se observan óvulos (ov) en su interior (x 122). En el inserto de la izquierda, se observa la apariencia de la epidermis de la cara interna del nectario (x 1 035). En el inserto de la derecha, se observa un estoma de la epidermis externa del nectario (x 450). B. Aspecto de la epidermis del ovario con tricomas (flechas) en distintos estados de desarrollo (x 840).



## FIGURA 12.-

Complejo estomático constituido por las dos células guardianas, con poro estomático abierto, en epidermis externa del nectario (x 6 750).





la pared interna del tubo de la corola presenta estas estructuras y no la epidermis interna, que es la que enfrenta a la pared del ovario.

b). ANATOMIA DEL NECTARIO.-

Desde muy temprano, en nectarios recién diferenciados, que miden 1 mm de diámetro hasta el máximo tamaño que alcancen (5 mm de diámetro), se distinguen tres zonas de tejidos (Fig. 13A y B). Desde afuera hacia adentro, siguiendo la nomenclatura de Durkee (1981) estos tejidos son: epidermis, parénquima secretor y parénquima fundamental. El parénquima secretor y parénquima fundamental, a su vez, está atravesado por tejido conductor.

Debido a que el nectario floral de Eccremocarpus scaber es derivado de las capas superficiales del ovario, se distingue una epidermis externa y otra interna aunque ambas son áreas diferentes de una sola superficie epidérmica. Ambas epidermis son monoestratificadas y constituidas por células mononucleadas, altamente vacuoladas, con cutícula, sin apéndices y sin espacios intercelulares. Como fue mencionado anteriormente, sólo la epidermis externa posee estomas (ver inserto Fig. 11A; 12; 13A). Las células individuales son rectangulares en contorno, de 17  $\mu\text{m}$  promedio de diámetro y con volumen promedio de 0.004  $\mu\text{m}^3$  en el estado maduro (Tabla 5).

El tejido secretor, localizado inmediatamente por debajo de la epidermis, está constituido por 7 a 10 capas

## FIGURA 13.-

Nectario en estado de secreción. A. Corte transversal del nectario (n) y ovario (o). Epidermis monoestratificada (ep); parénquima secretor (ps); parénquima fundamental (pf). Se observan numerosos haces vasculares (hv) en el nectario y ovario (x 97). En el inserto se observa un complejo estomático de la epidermis externa (flecha), en corte transversal (x 225). B. Epidermis monoestratificada (ep) y parénquima secretor (ps) del nectario. La flecha indica un elemento criboso (x 760).

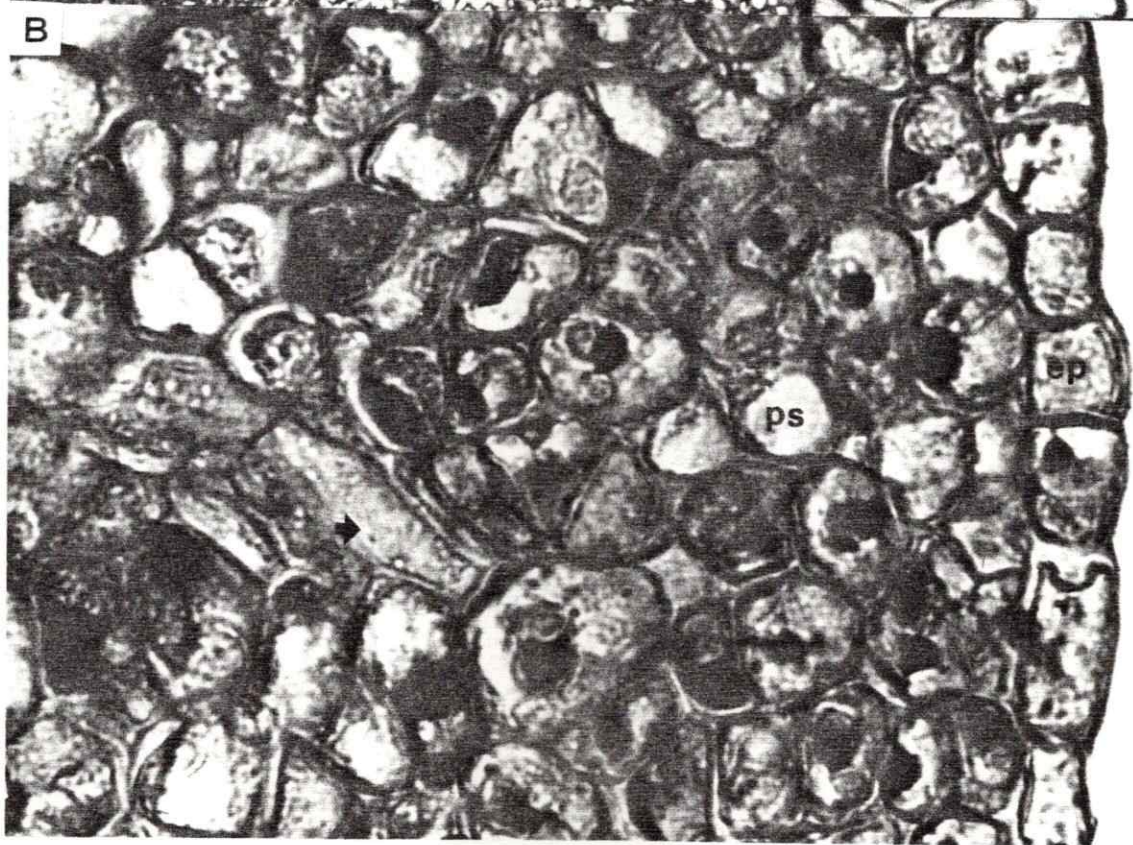
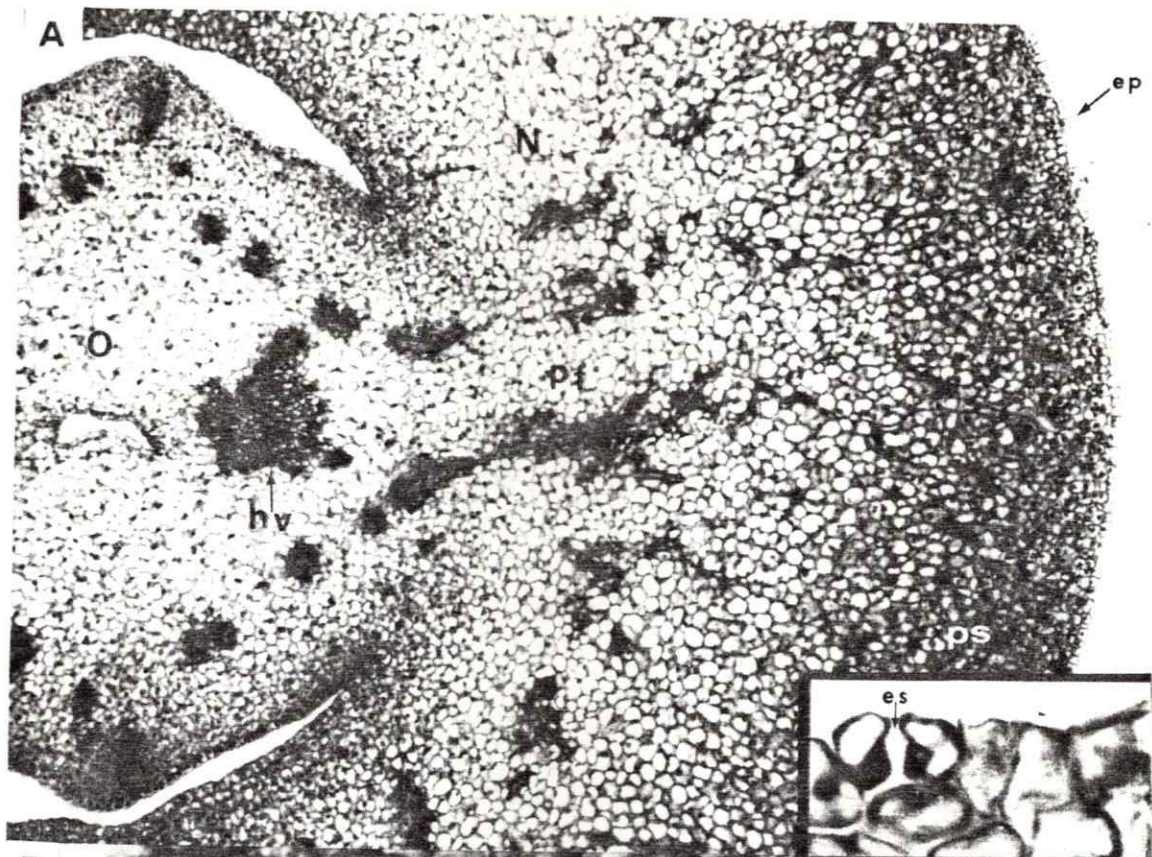


Tabla 5. Diámetro promedio ( $\mu\text{m}$ ), volumen promedio ( $\mu\text{m}^3$ ) y relación vacuola citoplasma (%) de las células de los tres tejidos del nectario, según estado de desarrollo. Rango entre paréntesis.

	Diámetro $\bar{X} \pm \text{SE}$	Volumen $\bar{X} \pm \text{SE}$	Relación vac/cit $\bar{X} \pm \text{SE}$
-----			
EPIDERMIS			
Estado 1	12.55 $\pm$ 0.48 (6.7-28.2)	2152 $\pm$ 162 (38-6320)	79.70 $\pm$ 3.90 (75-95)
Estado 2-3	16.33 $\pm$ 0.63 (7.3-27.1)	4245 $\pm$ 159 (132-11951)	66.80 $\pm$ 5.55 (55-85)
Estado 4	13.04 $\pm$ 1.13 (4.2-29.9)	1947 $\pm$ 119 (54-5632)	88.30 $\pm$ 2.52 (70-90)
PARENQUIMA SECRETOR			
Estado 1	12.44 $\pm$ 0.36 (3.5-25.8)	1971 $\pm$ 109 (45-3212)	38.60 $\pm$ 5.20 (10-56)
Estado 2-3	15.61 $\pm$ 0.44 (5.3-31.3)	3120 $\pm$ 113 (371-11845)	58.03 $\pm$ 4.09 (25-95)
Estado 4	16.50 $\pm$ 0.38 (2.5-28.2)	4093 $\pm$ 202 (197-11489)	81.20 $\pm$ 2.77 (60-99)
PARENQUIMA FUNDAMENTAL			
Estado 1	16.40 $\pm$ 0.43 (10.7-22.1)	4196 $\pm$ 226 (220-10857)	55.60 $\pm$ 2.02 (45-90)
Estado 2-3	20.20 $\pm$ 0.78 (5.9-29.4)	8486 $\pm$ 441 (448-22991)	70.10 $\pm$ 2.10 (62-95)
Estado 4	28.4 $\pm$ 0.95 (10.9-44.7)	24992 $\pm$ 203 (980-85490)	92.50 $\pm$ 2.00 (85-90)

de células isodiamétricas, altamente vacuoladas, que se tiñen fuertemente con safranina y fast-green. Dichas células son ligeramente más pequeñas que las de la epidermis, con un diámetro promedio de  $15 \mu\text{m}$  y  $0.003 \mu\text{m}^3$  de volumen promedio (Tabla 6). Las células de este tejido están separadas por espacios intercelulares cuya frecuencia y tamaño aumenta hacia la zona epidérmica y en el estado maduro pueden alcanzar a medir hasta  $3.8 \mu\text{m}$  (Tabla 5; Fig. 16, 17).

El parénquima fundamental, ubicado más internamente respecto del parénquima secretor, está constituido por 25-33 capas de células, que ocupan el doble del volumen de los tejidos restantes. Las células tienen 1.2 veces el tamaño de las células del tejido epidérmico en el estado de secreción ( $X = 20.2 \mu\text{m}$ ). Tal como en el parénquima secretor, estas células son isodiamétricas y altamente vacuoladas, pero se tiñen débilmente. Los espacios intercelulares tienden a estar restringidos a las zonas próximas al parénquima secretor.

Los tejidos vasculares del nectario se originan de un anillo de haces vasculares ubicados en la base del ovario (Fig. 13A). Algunas ramificaciones de estos haces se internan en el tejido del nectario donde vuelven a dividirse. Eventualmente, terminan en el parénquima secretor, muy próximo a la epidermis (Fig. 13B). La vasculatura al nivel del parénquima fundamental está constituida por elementos traqueales con engrosamientos anulares, elementos cribosos y parénquima acompañante (Fig. 14).

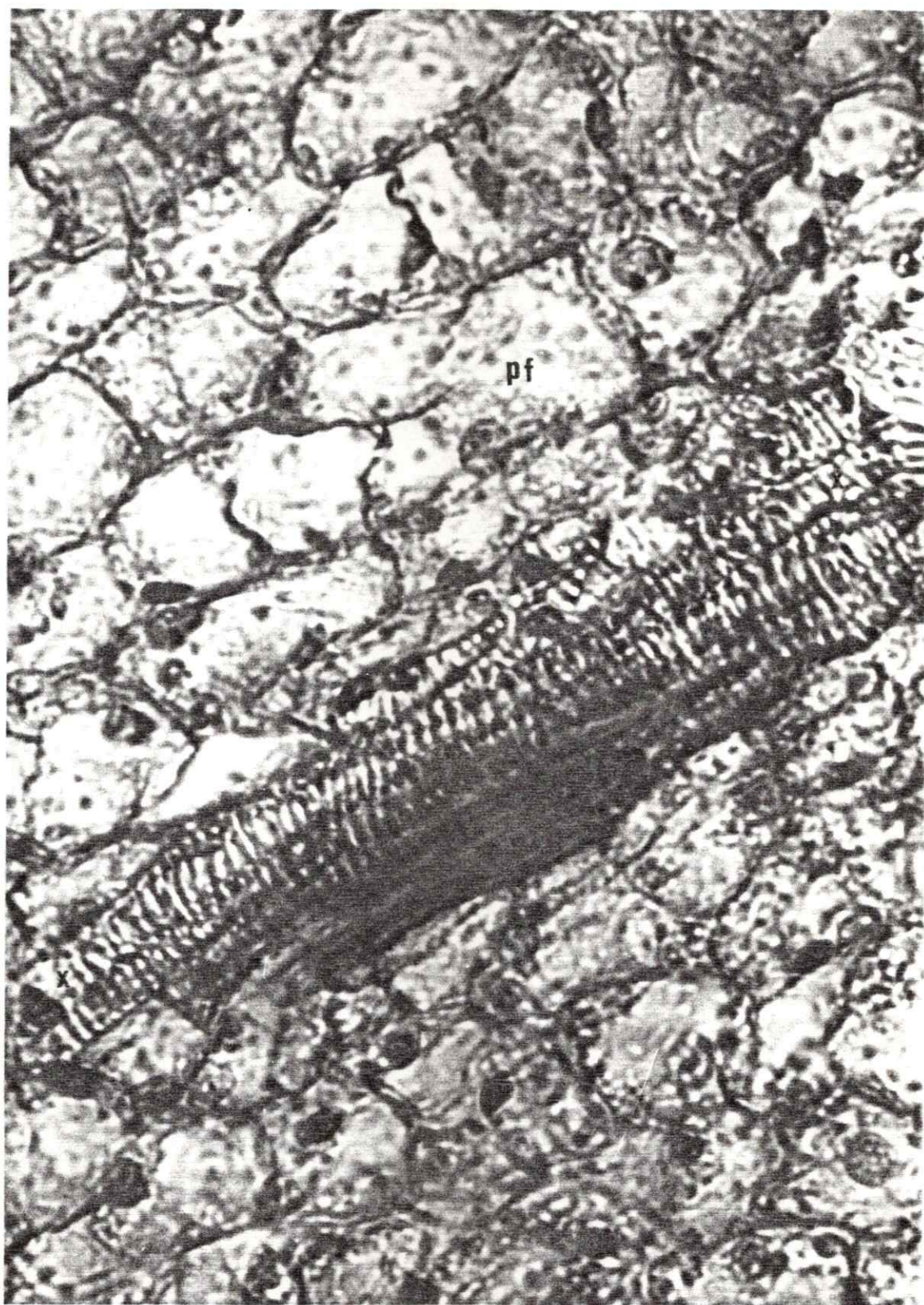
Tabla 6. Tamaño de estructuras celulares ( $\mu\text{m}$ ) según tejido y estado de desarrollo del nectario.

ESTADO DE DESARROLLO	1	2-3	4
	$\bar{x} \pm \text{SE}$	$\bar{x} \pm \text{SE}$	$\bar{x} \pm \text{SE}$
-----			
EPIDERMIS			
Vacuola	13.00 $\pm$ 1.73	13.00 $\pm$ 1.23	16.60 $\pm$ 0.35
Núcleo	7.32 $\pm$ 0.4	4.58 $\pm$ 0.31	-
Amiloplasto	2.84 $\pm$ 0.34	3.77 $\pm$ 0.33	-
Mitocondria	0.53 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.04	-
Pared externa	0.36 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02
Pared lateral	0.14 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.01
Pared interna	0.23 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
Cutícula	0.04 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
PARENQUIMA SECRETOR			
Vacuola	3.68 $\pm$ 0.52	12.70 $\pm$ 1.20	120.40 $\pm$ 0.56
Núcleo	6.81 $\pm$ 0.37	6.88 $\pm$ 0.65	-
Amiloplasto	4.22 $\pm$ 0.53	7.92 $\pm$ 1.08	-
Mitocondria	0.86 $\pm$ 0.04	1.55 $\pm$ 0.12	-
Pared	0.31 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02
PARENQUIMA FUNDAMENTAL			
Vacuola	11.10 $\pm$ 1.10	14.10 $\pm$ 1.36	40.72 $\pm$ 4.04
Núcleo	7.47 $\pm$ 0.10	5.60 $\pm$ 0.27	-
Amiloplasto	3.72 $\pm$ 0.08	5.43 $\pm$ 0.29	-
Mitocondria	0.63 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.04	-
Pared	0.17 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.01
-----			

## FIGURA 14.-

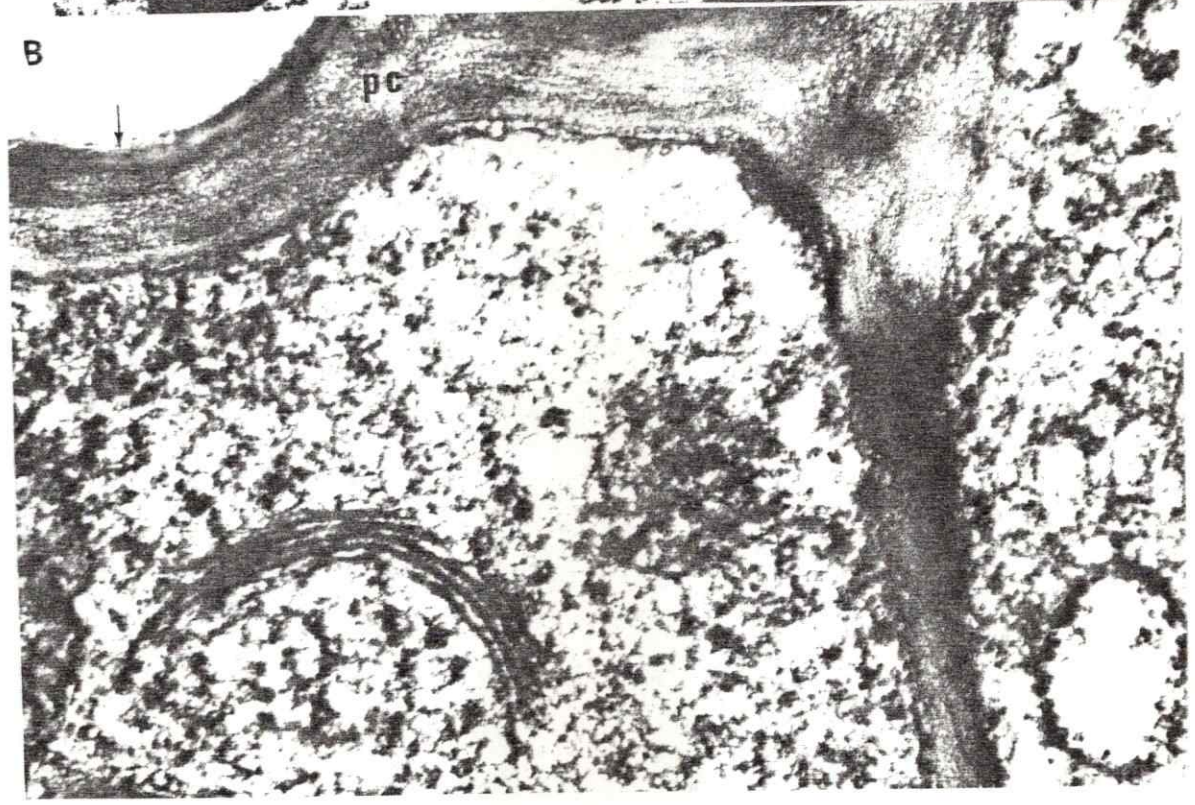
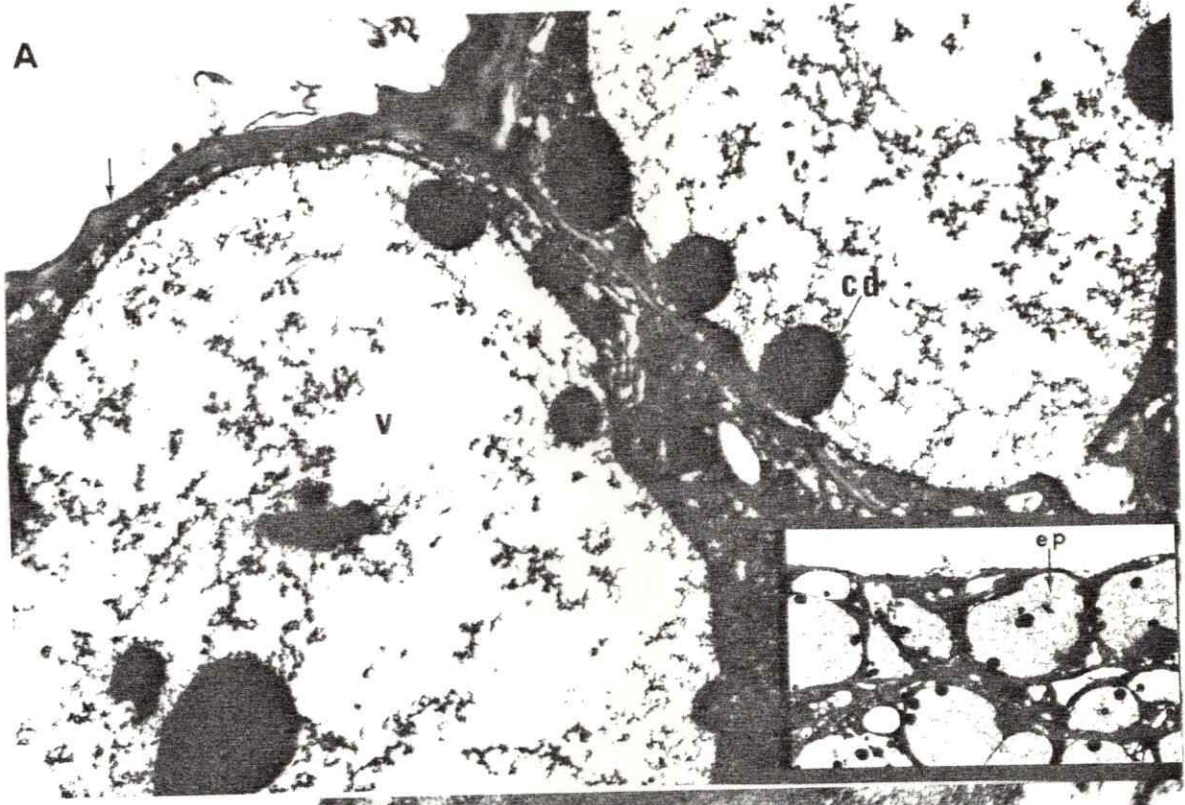
Elementos xilemáticos con engrosamientos anulares (x)  
en el parénquima fundamental (pf) del nectario (x 1 600).





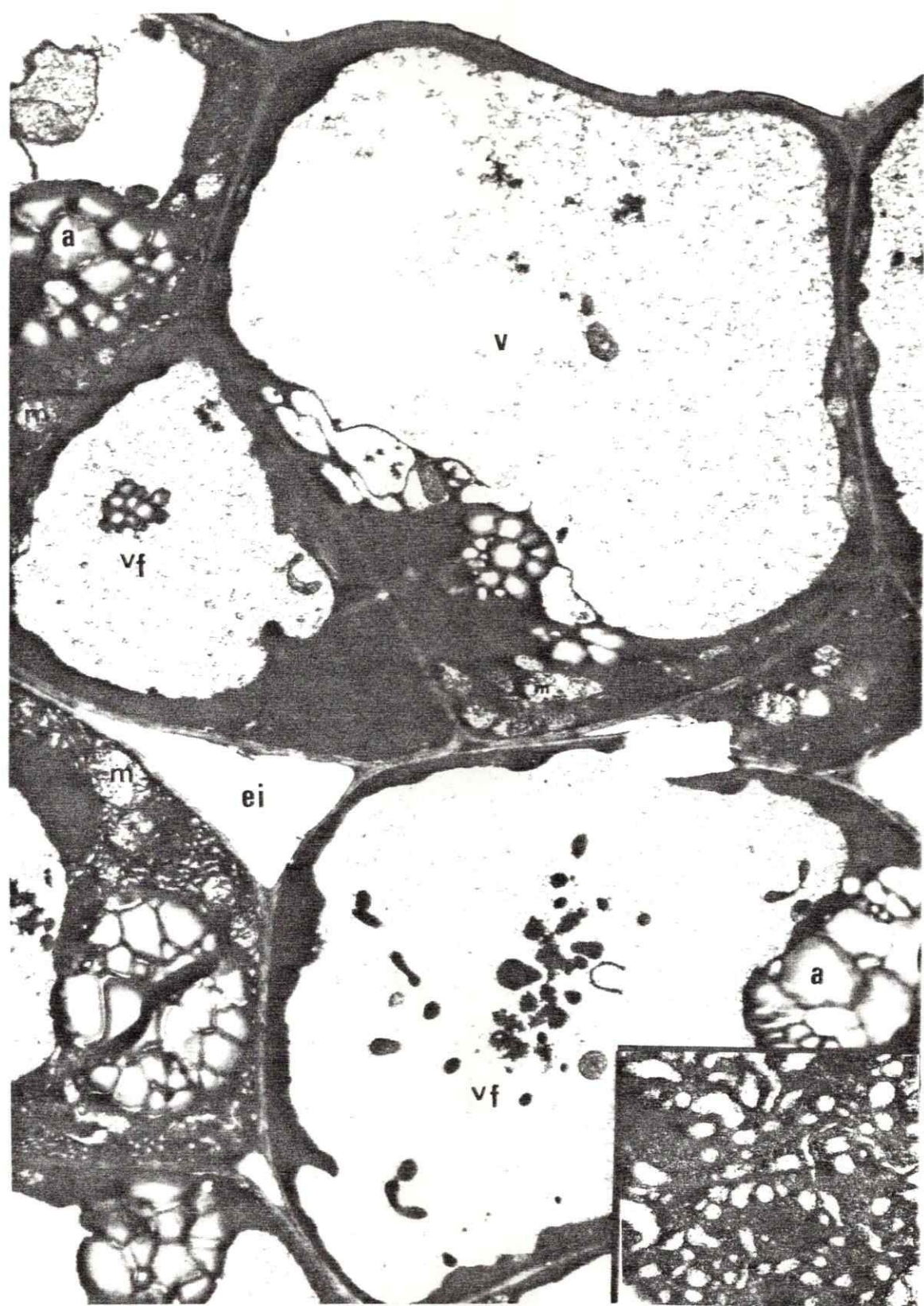
## FIGURA 15.-

Tejido epidérmico del nectario en estado 1 de desarrollo (preantesis). A. Ultraestructura de la célula epidérmica. Vacuola (v); cuerpos densos (cd); la flecha indica la pared celular externa (x 10 260). En el inserto se observan células epidérmicas completas (x 980). B. Aspecto fibrilar de la pared celular externa (pc) de dos células contiguas. La cutícula es un depósito liso y continuo (flechas) (x 63 300).



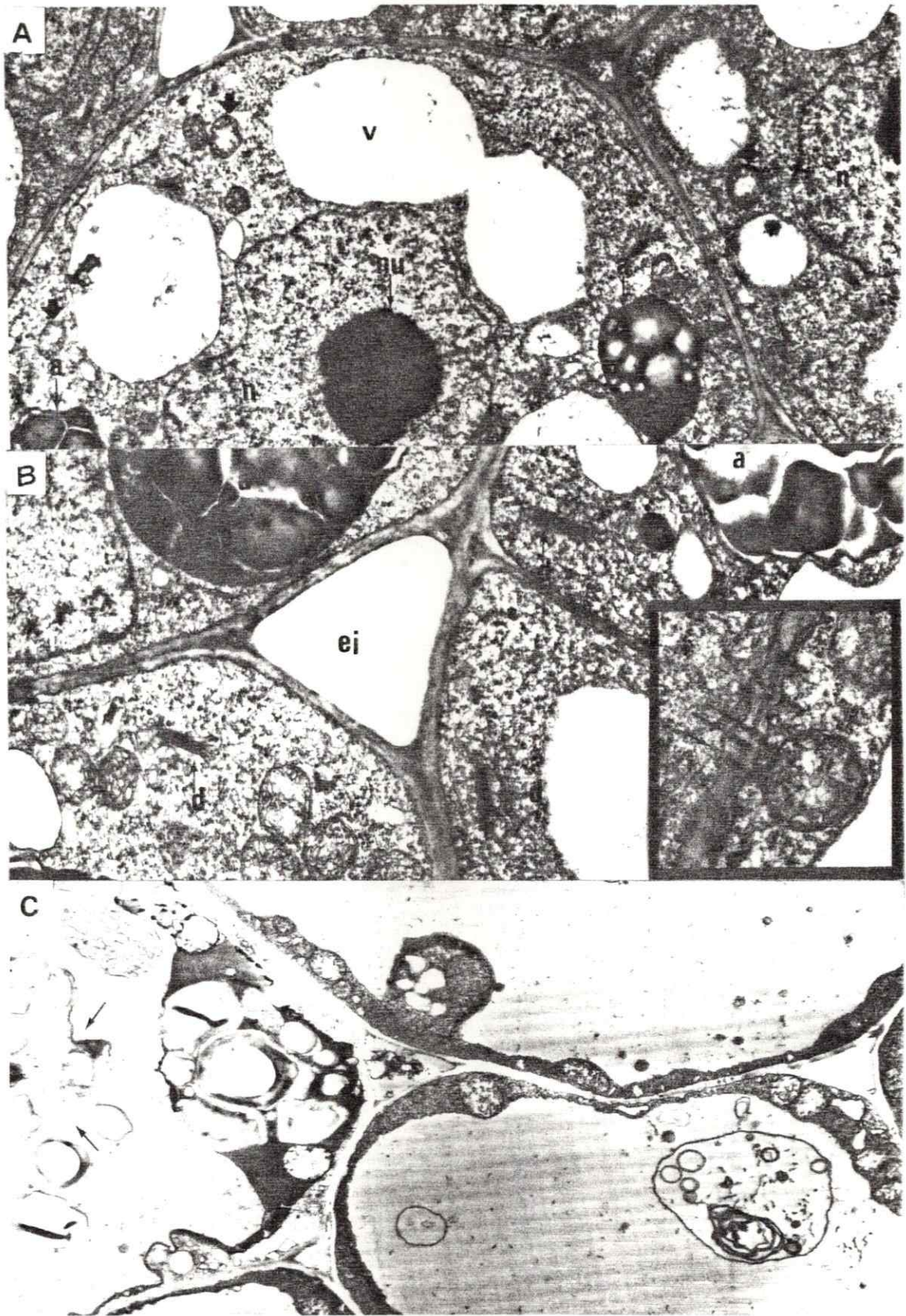
## FIGURA 16.-

Ultraestructura de la epidermis y parénquima secretor del nectario en estado 3 de desarrollo (activa secreción). Amiloplasto (a); vacuola (v); vacuola fagocitaria con restos de membranas y organoides en su interior (vf); espacio intercelular (ei); núcleo de la célula epidérmica (n); mitocondria (m). La punta de flecha indica la zona del citoplasma amplificado en el inserto (x 6 450). En el inserto, se observa el aspecto del citoplasma de la célula epidérmica (x 16 625).



## FIGURA 17.-

Ultraestructura del parénquima secretor. A. Célula típica del parénquima secretor del nectario en estado 1 de desarrollo (preantesis). Núcleo (n); nucléolo (nu); amiloplasto (a); vacuola (v). Las puntas de flechas indican mitocondrias (x 5 400). B. Detalles de la morfología del citoplasma de células que convergen a un espacio intercelular (ei) en parénquima secretor del estado 1 de desarrollo. Dictiosomas (d); amiloplastos que presentan varios puntos de cristalización de almidón (a) (x 9 000). En el inserto, las flechas muestran plasmodesmos entre células contiguas; retículo endoplasmático rugoso con ribosomas (RE) (x 18 200). C. Células del parénquima secretor del nectario en avanzado estado de desarrollo (estado 4). La vacuola presenta rasgos fagocitarios. Las flechas indican un amiloplasto degradado por la actividad fagocitaria de la vacuola (x 5 400).



La vasculatura de la zona del parénquima secretor interno es parecido a la del parénquima fundamental, excepto en que las ramificaciones son más pobres en elementos conductores. En la zona del parénquima secretor externo, sólo se observan elementos alargados sin engrosamientos, lo que lleva a pensar que corresponden a elementos del floema.

#### c). ULTRAESTRUCTURA DEL NECTARIO.-

El microscopio electrónico de transmisión nos permitió estudiar la ultraestructura de las células que constituyen los diferentes tejidos del nectario y sus cambios a través del desarrollo de este órgano secretor.

Todo el tejido está formado por células mononucleadas cuyas principales características a través del desarrollo de la flor son las siguientes:

#### EPIDERMIS:-

Las células epidérmicas del estado de desarrollo 1 (preantesis), tienen un tamaño promedio de 12  $\mu\text{m}$  y presentan una gran vacuola que ocupa el 80 % del volumen citoplasmático, la pared celular externa tiene un grosor de 0.3  $\mu\text{m}$  de promedio y sobre ella existe un depósito continuo de cera de 0.04  $\mu\text{m}$  de espesor (Tabla 6; Fig. 15A y B). La pared externa es 2.6 veces más gruesa que las paredes laterales; a su vez, la pared interna, que generalmente limita un espacio intercelular, es 1.6 veces más gruesa que las laterales. Presentan en el citoplasma grandes amiloplastos



de 2.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y numerosas mitocondrias de 0.5  $\mu\text{m}$  promedio de diámetro. El retículo endoplasmático es rugoso. En el estado 1, las vacuolas celulares de la epidermis y de los otros tejidos del nectario presentan cuerpos densos, de 1.4  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio y de límites muy precisos; éstos, como su nombre lo indica, son muy densos al haz de electrones.

En el estado de desarrollo 2 y 3 (estado de secreción), el tejido epidérmico no presenta diferencias considerables respecto al estado de desarrollo anterior, ni en el tamaño de las células ni en los organoides presentes. Sin embargo, el grosor de la pared externa de la epidermis es más delgada. Su grosor es 1.4 veces más delgada que la pared del estado 1. El citoplasma es denso, con numerosas trabéculas vesiculares, propia de células secretoras (ver inserto Fig. 16). Las mitocondrias presentan crestas largas, conspicuas y de límites nítidos, como en el estado 1. Los amiloplastos, en número de 1 a 2, son muy conspicuos y de casi 4  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio.

El tejido epidérmico en el estado de desarrollo 4 (senescente), se caracteriza por presentar una pared externa 1.7 veces más delgada que la del estado 2-3, lo que es 2.4 veces más delgada que la del estado 1 (Tabla 6).

#### PARENQUIMA SECRETOR:-

El parénquima secretor en el estado de desarrollo 1 está formado por células de tamaño similar a las del tejido

epidérmico. Los espacios intercelulares son discretos (Fig. 17A y B). Presentan un citoplasma abundante en amiloplastos, de 0.3  $\mu\text{m}$  de tamaño promedio, lo que es 1.5 veces mayor que los del tejido epidérmico, aunque en forma similar a ellos (Tabla 6; Fig. 16 y 17). Estos son complejos, con varios puntos de depósito de almidón. Las mitocondrias son también similares en forma a las del tejido epidérmico; tienden a aglomerarse en zonas definidas del citoplasma, próximos al núcleo o a la pared celular. Se presentan con crestas largas, conspicuas y de límites nítidos. Los dictiosomas están localizados siempre próximos a la pared celular. Las células poseen abundante retículo endoplasmático rugoso. El núcleo posee un diámetro promedio de 7.0  $\mu\text{m}$ . La vacuola ocupa alrededor del 40 % del volumen citoplasmático (Tabla 6). La pared celular en este tejido aparece homogénea, tiene un espesor de 0.3  $\mu\text{m}$  y presenta numerosos plasmodesmos (ver inserto Fig. 17B).

Las células del parénquima secretor en el estado de secreción (estado 2 de desarrollo), es muy similar a las del estado 1; sin embargo, se aprecian cambios notables en la vacuola central, la que ocupa un 60 % del volumen celular (Tabla 6 y Fig. 16). El aumento del tamaño vacuolar también se refleja en el hecho que el tamaño celular aumenta 1.2 veces (Tabla 5). La vacuola comienza a presentar características fagocitarias y puede observarse en su contenido vacuolar, restos de organoides y membranas celulares. Amiloplastos, núcleo y citoplasma presentan una posi-

ción notablemente periférica.

En el estado 4, las células del parénquima secretor presentan una vacuola central que ocupa sobre un 80 % del volumen celular (Tabla 6). El citoplasma está reducido a una cinta periférica. En el interior de esta vacuola, se pueden ver amiloplastos semidegradados por la capacidad fagocitaria que ella presenta (Fig. 17C).

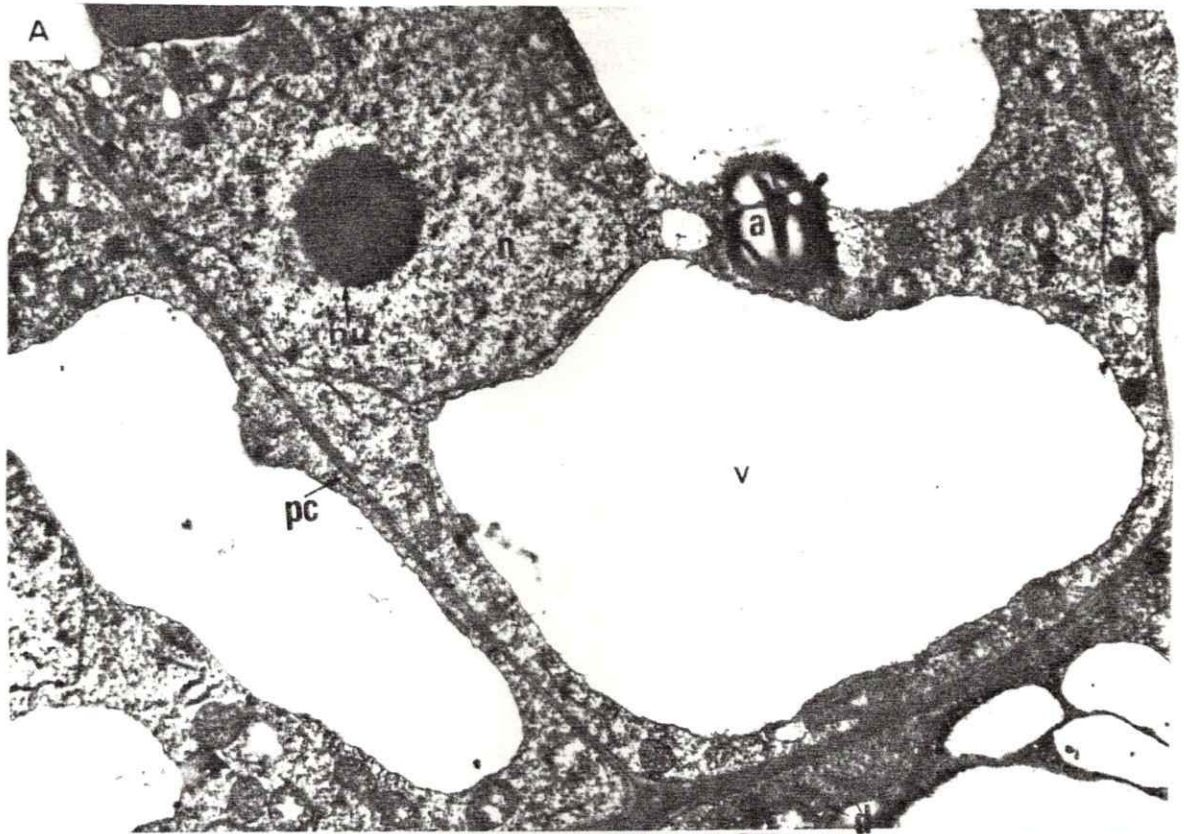
#### PARENQUIMA FUNDAMENTAL:-

El parénquima fundamental del estado 1, tiene un citoplasma rico en organoides, como en el caso de la epidermis y del parénquima secretor de este estado. Sus células son 1.3 veces más grandes que las del parénquima secretor. La vacuola es muy grande y ocupa la mayor parte del volumen celular (55 %), empujando el núcleo a la periferia. La vacuola frecuentemente es dividida por cintas citoplasmáticas (Fig. 18A). El retículo endoplasmático es rugoso. Hay menos amiloplastos por unidad de volumen que en el parénquima secretor. Las mitocondrias y dictiosomas son abundantes. Las paredes celulares presentan numerosos plasmodesmos (Fig. 18B).

En el estado 2-3, las células del parénquima fundamental presentan un tamaño 1.2 veces mayor que el de las células del parénquima fundamental del estado 1, aumento de tamaño producido por un aumento concomitante del volumen vacuolar, el que representa el 70 % del volumen celular (Fig. 19A). Núcleo, amiloplastos y mitocondrias no difieren ma-

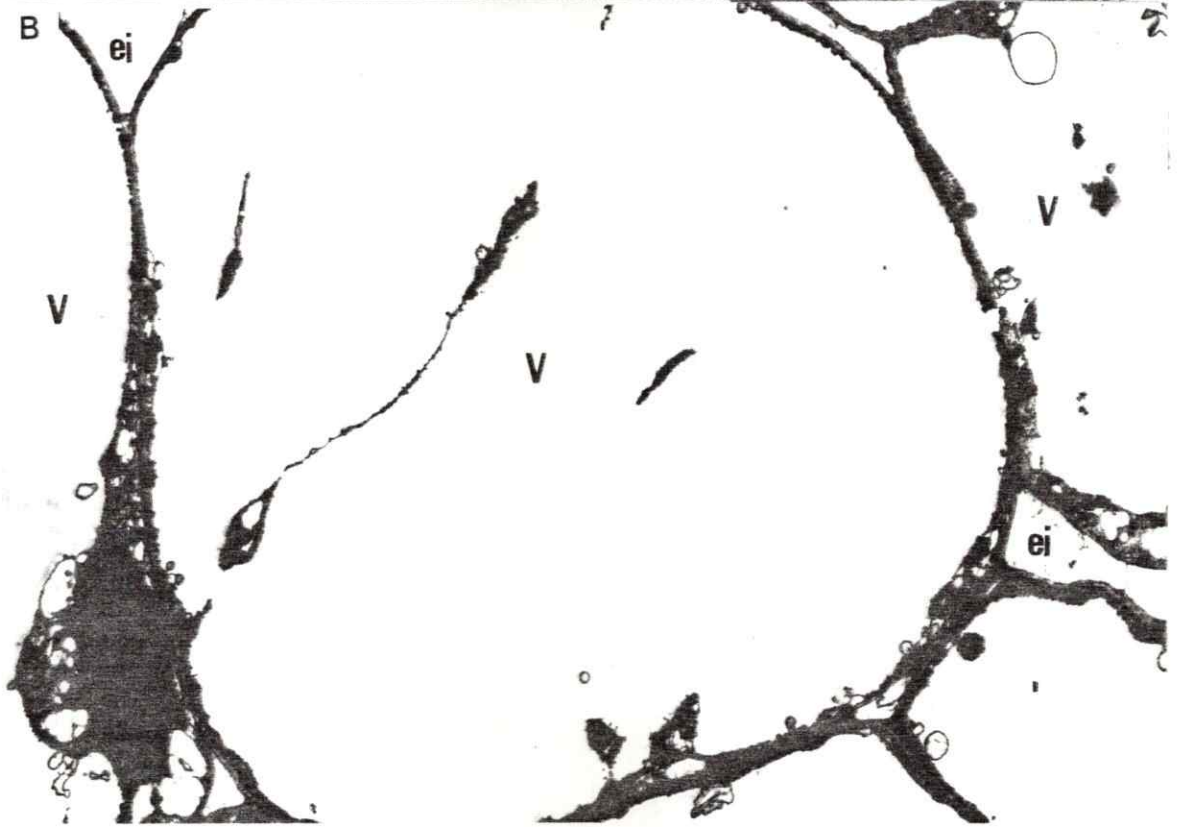
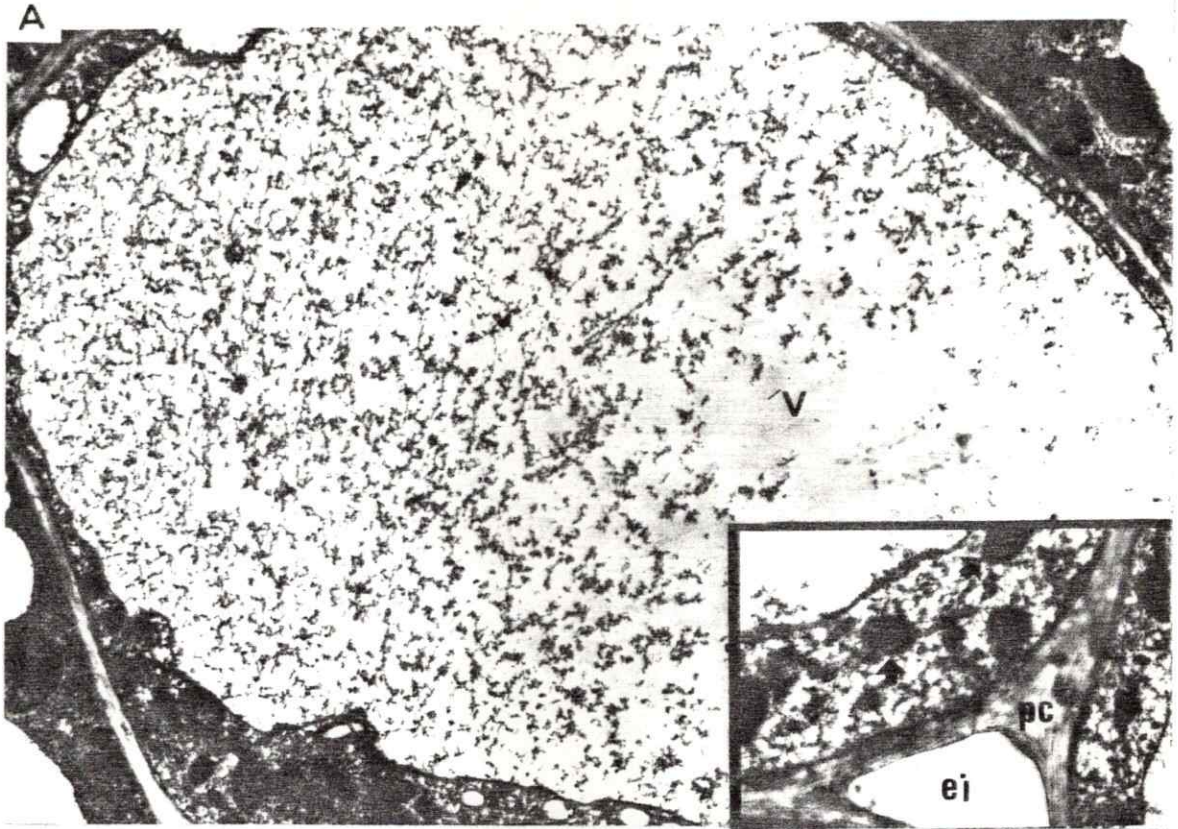
## FIGURA 18.-

Parénquima fundamental del nectario en estado 1 de desarrollo (preantesis). A. Aspectos de la ultraestructura de una célula típica del parénquima. Pared celular (pc); vacuola (v); núcleo (n); amiloplasto (a); nucléolo (nu); las puntas de flechas indican mitocondrias; dictiosomas (d) (x 10 260). B. Plasmodesmos (flechas) entre células contiguas (1 y 2) del parénquima fundamental. También se observan mitocondrias (m) y canales del retículo endoplasmático con polirribosomas (RE) (x 31 850).



## FIGURA 19.-

Vacuola de las células del parénquima fundamental en dos estados de desarrollo. A. Aspecto de la vacuola (v) en células del parénquima fundamental en estado de desarrollo 2-3 (secreción) (x 10 260). En el inserto se observa el aspecto de un espacio intercelular (ei) y la pared celular que lo circunda (pc) (x 12 500). Las puntas de flechas muestran las mitocondrias. B. Aspecto de la vacuola (v) en células del parénquima fundamental del nectario en estado de desarrollo 4 (flor senescente). Se observan espacios intercelulares (ei) y organoides en distintos estados de degradación (x 3 600).



## FIGURA 20.-

Ultraestructura del haz vascular del parénquima secretor de nectario en estado 3 de desarrollo (activa secreción). A. Elementos del haz vascular. Célula cribosa activa (cc); célula cribosa en diferenciación (cj); célula de transferencia (ct); célula acompañante (ca) (x 8 000). B. Detalles de una célula de transferencia (ct). Las flechas indican los engrosamientos internos de la pared celular. También se observa una célula cribosa madura (cc) y numerosas mitocondrias (m), tanto en la célula de transferencia como en la célula adyacente. Las membranas del retículo endoplasmático (RE) han emigrado a la periferia bajo la pared celular (x 9 000). C. Detalles de la ultraestructura de una célula del parénquima del haz vascular. Se observan mitocondrias (m); dictiosomas (d) y parte del núcleo (n) (x 7 560). En el inserto se observa una estructura fibrilar señalada con flecha en C (x 38 160).

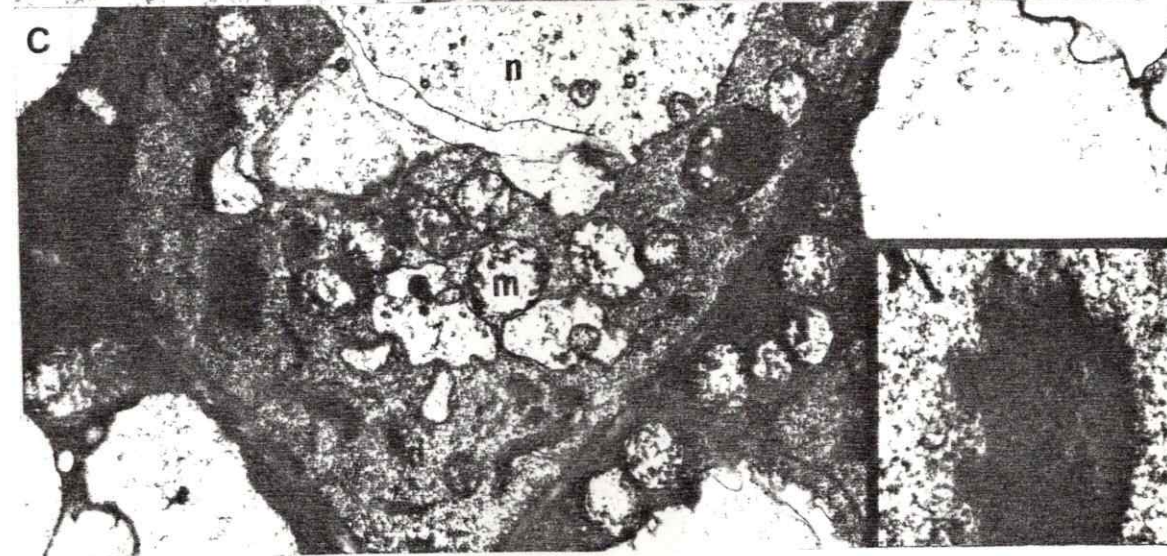
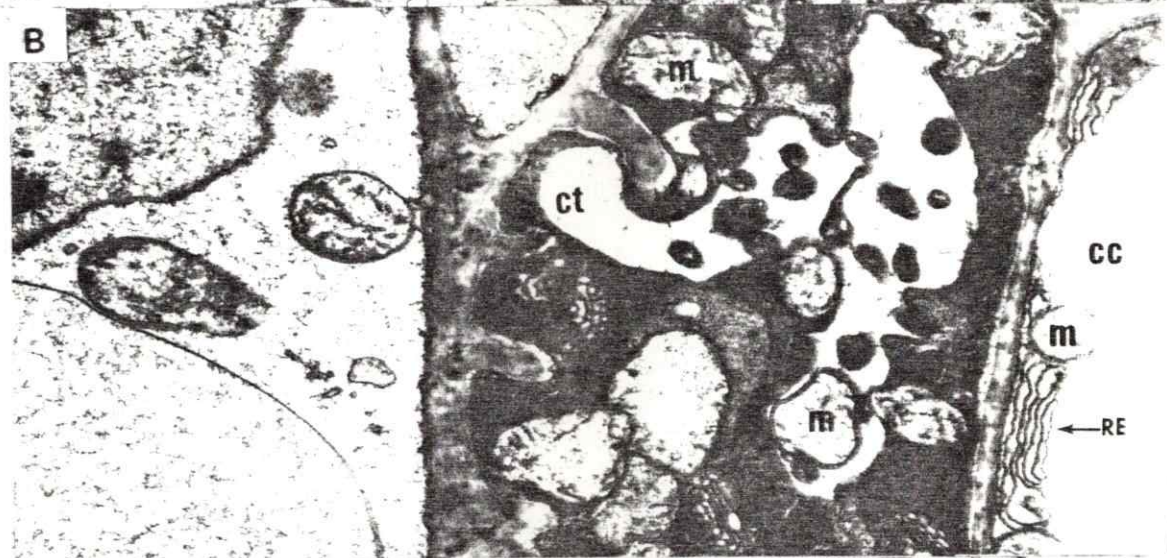
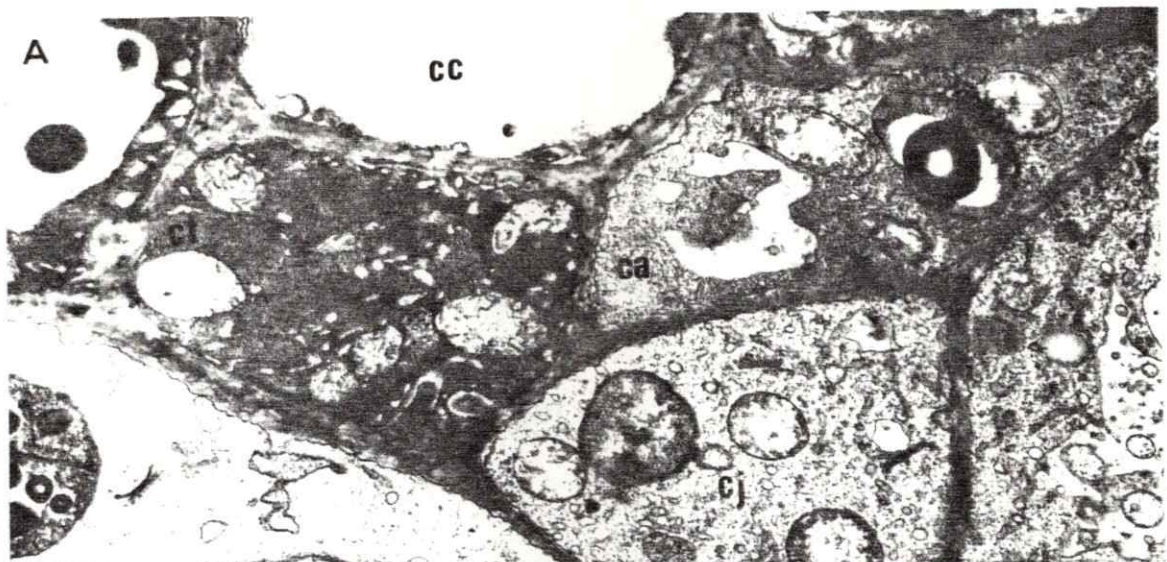


yormente de los otros tejidos.

Las células del parénquima fundamental en el estado 4 tienen un gran tamaño, 1.4 veces mayor que el que presenta en el estado anterior de desarrollo. La Fig. 19B muestra el aspecto de estas células, en que prácticamente el citoplasma está reducido a una cinta protoplasmática muy delgada bajo las paredes celulares. La vacuola ocupa sobre un 90 % del volumen celular. Organoides, núcleo y retículo endoplasmático muestran un alto grado de degradación senil.

#### HACES VASCULARES:-

En el estado de activa secreción el haz vascular aparece formado por células cribosas, acompañantes y parenquimáticas, sin existir espacios intercelulares entre ellos (Fig. 20A). Las células cribosas se caracterizan por su mayor volumen. Como toda célula cribosa típica, aparece con un citoplasma claro al microscopio electrónico de transmisión, casi sin organoides. Mitocondrias y retículo endoplasmático aparece retraído a las proximidades de la pared celular. Las células acompañantes se caracterizan por poseer un citoplasma denso, con vacuolas discretas y numerosas mitocondrias. El tamaño de estas células es aproximadamente de 300  $\mu\text{m}$  de largo y 140  $\mu\text{m}$  de ancho. Sus dimensiones acompañan a las dimensiones de la célula cribosa. Junto a las células cribosas y acompañantes, las células parenquimáticas poseen citoplasma muy compacto, cuya pared celular tiene engrosamientos sinuosos hacia el interior de la cé-



lula, lo que es típico de una célula de transferencia (Gunning & Pate, 1969; Fig. 20B). La vacuola de estas células es sinuosa y pareciera tener capacidad fagocitaria por presentar inclusiones de perfiles membranosos en su interior. El citoplasma es muy denso y posee una gran concentración de mitocondrias.

En el haz vascular se pueden observar otras células parenquimáticas adyacentes al complejo célula cribosa-célula acompañante-célula de transferencia. Estas células parenquimáticas presentan un citoplasma muy rico en mitocondrias, dictiosomas y retículo endoplasmático. Es frecuente encontrar en el citoplasma agrupaciones de filamentos muy densos al haz de electrones y que recuerdan la proteína-P descrita para los vasos cribosos (Fig. 20C). El núcleo posee la cromatina condensada. En el haz vascular, todas las células tienen paredes con numerosos plasmodesmos.

iii). CAPACIDAD SECRETORA DEL NECTARIO Y COMPOSICION DEL NECTAR DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

Las observaciones de la acumulación de néctar en 300 flores aisladas de la actividad de polinizadores, permitieron detectar la cantidad de agua y azúcares secretados durante la vida de una flor (Tabla 7 y 8; Fig. 21 y 22 ) y su valor calórico (Tabla 9).

a). PATRON DE ACUMULACION DE NECTAR.-

La secreción de néctar empieza muy temprano en la vida de la flor, normalmente a partir de la antesis que corresponde a flores de 20-22 mm de largo y continúa por aproximadamente 6 días. En esta etapa, el 67 % de las flores estudiadas comienzan a secretar; sin embargo, 2.3 % de las flores estudiadas iniciaron la secreción en la etapa de preantesis (17-19 mm) y 2.0 % de las flores no había iniciado la secreción al alcanzar 23-25 mm de largo. El inicio de la secreción es por lo tanto bastante sincrónica. El patrón de acumulación de néctar es sigmoideal (Fig 21). Comienza lento, aumentando rápida y significativamente ( $Z = 4.48$ ;  $p = 3.8 \times 10^{-6}$ ;  $n = 27$ , comparando flores de 17-18 mm versus 29 mm de largo). De un promedio de 0.44  $\mu$ l en las flores más pequeñas, se acumula un promedio de 34.4  $\mu$ l en las más grandes, o sea, hay un aumento de 78 veces. La secreción de néctar cesa en las flores presenescentes, pues no hay diferencias significativas en el volumen de néctar pre-

Tabla 7. Características del néctar acumulado en flores según su estado de desarrollo. (Rango en paréntesis).

Largo corola (mm)	Volumen ( $\mu$ l) $\bar{X} \pm SE$	Concentración (%) $\bar{X} \pm SE$	Azúcar (mg) $\bar{X} \pm SE$	Agua ( $\mu$ l) $\bar{X} \pm SE$
17-19 (n=27)	0.44 $\pm$ 0.29 (0-7.77)	50.27 $\pm$ 8.45 (26.5-82.5)	0.15 $\pm$ 0.09 (0-2.41)	0.34 $\pm$ 0.23 (0-6.09)
20-22 (n=43)	4.44 $\pm$ 0.77 (0-25.42)	37.47 $\pm$ 3.61 (17.4-99.20)	1.49 $\pm$ 0.30 (0-7.99)	3.40 $\pm$ 0.71 (0-20.80)
23-25 (n=77)	16.25 $\pm$ 1.45 (0-54.13)	36.65 $\pm$ 1.80 (9.90-99.20)	5.74 $\pm$ 0.56 (0-23.74)	12.23 $\pm$ 1.08 (0-37.51)
26-28 (n=140)	32.41 $\pm$ 1.90 (0-77.74)	32.27 $\pm$ 0.71 (14.50-96.1)	10.56 $\pm$ 0.69 (0-34.38)	25.12 $\pm$ 1.45 (0-68.94)
29 (n=13)	34.39 $\pm$ 5.29 (0-63.98)	37.45 $\pm$ 3.51 (27.8-70.6)	11.54 $\pm$ 1.66 (0-18.1)	26.31 $\pm$ 4.40 (0-51.45)

Tabla B. Azúcares componentes del néctar de flores de Eccremocarpus scaber en el estado de activa secreción. Las cifras corresponden a promedio de 250 determinaciones. D/M es la proporción de disacáridos versus monosacáridos. S/F+G es la proporción de sacarosa versus fructosa más glucosa.

Azúcares	mg/μl		Proporción relativa
	$\bar{x} \pm SE$	Rango	
Fructosa	0.35±0.01	0.22-0.51	0.34
Glucosa	0.33±0.01	0.15-0.53	0.32
Sacarosa	0.17±0.01	0.11-0.22	0.17
Maltosa	0.17±0.01	0.09-0.27	0.17

D/M = 0.5; S/F + G = 0.25

Tabla 9. Estimación del valor energético potencial del néctar secretado durante la vida de una flor de Eccremocarpus scaber, y de la cantidad de néctar presente en una flor promedio de una población abierta a los polinizadores. Para los cálculos se empleó 4 cal/mg de azúcar (ver Heinrich & Pantle, 1975).

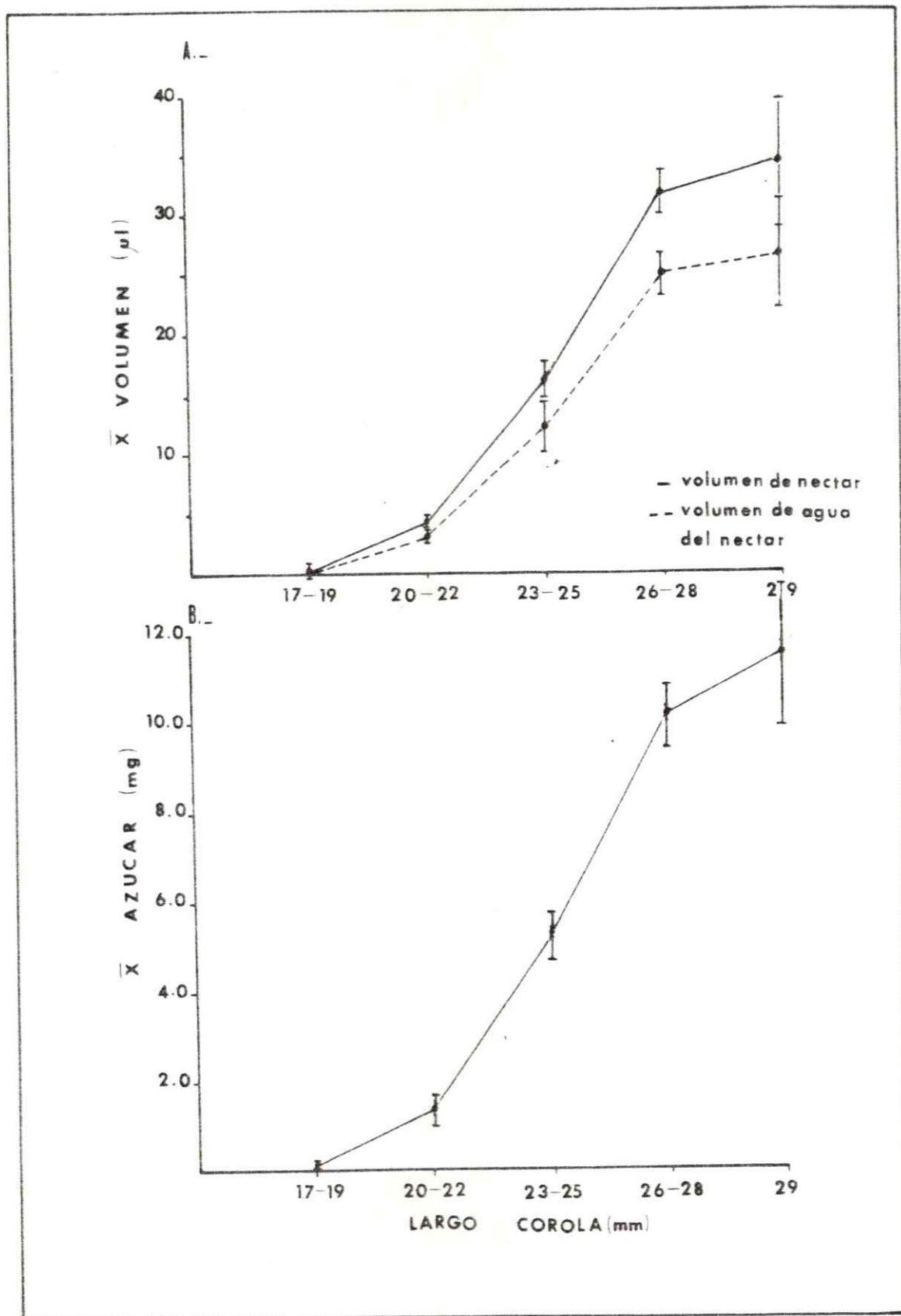
	1. Néctar ( $\mu$ l)	Azúcar (mg)	2. Composición esperada (mg)				4. Cal/ flor
			F	G	S	M	
Flor madura (total capacidad)	34.39	11.54	3.92	3.69	1.96	1.96	46.16
Flor promedio (en pobl. natural)	3. 17.59	6.32	2.01	1.89	1.00	1.00	23.60

1. De la Tabla 7; 2. Basado en las proporción de la Tabla 8.  
3. Néctar en pie. 4. Calculado a base de la concentración media del néctar de las flores reportadas en la Tabla 7.

## FIGURA 21.-

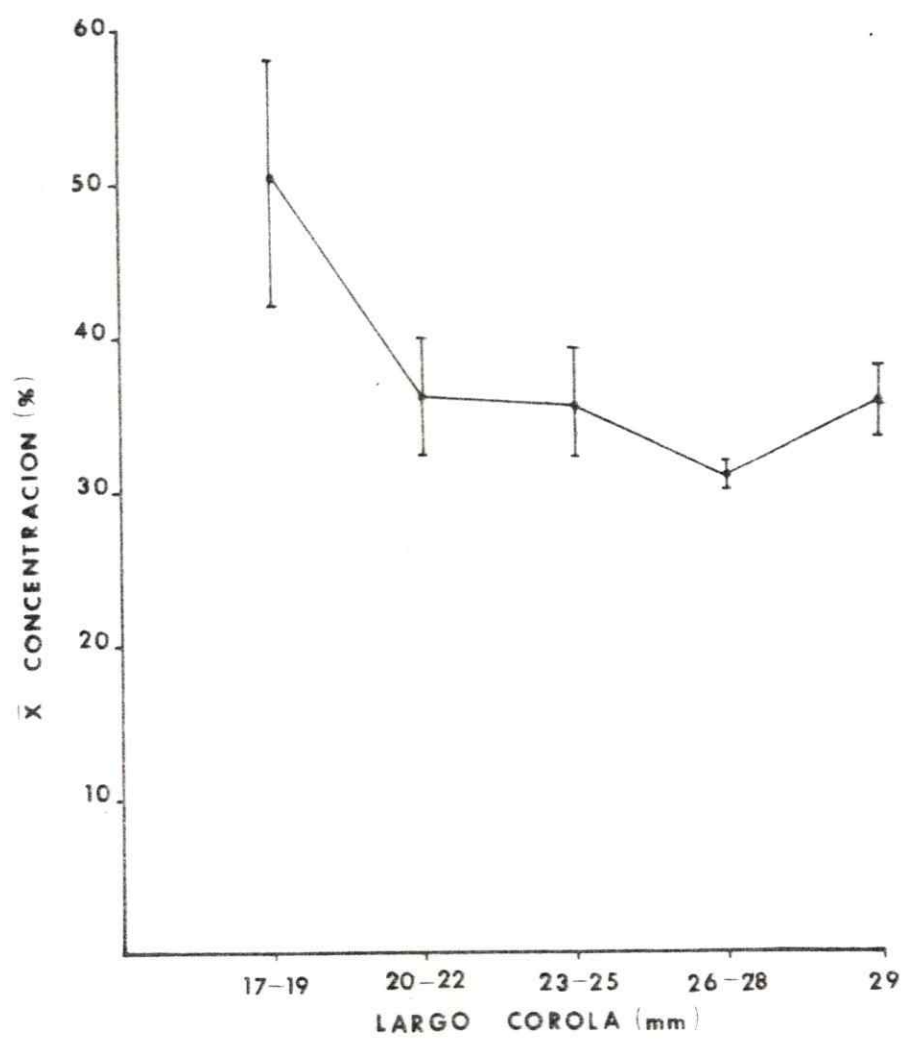
Volumen  $\pm$  SE (A) y cantidad de azúcares  $\pm$  SE (B) de néctar acumulado según estado de desarrollo de las flores. Las flores de 17-19 mm están recientemente abiertas.





## FIGURA 22.-

Concentración de néctar ( $\pm$  SE) según estado de desarrollo de la flor.



sente en flores de 26 mm cuyo promedio era de 32.4  $\mu$ l respecto de flores de 29 mm de largo, cuyo promedio era de 34.4  $\mu$ l ( $Z = 0.29$ ;  $p = 0.4$ ; PW).

El patrón de acumulación de azúcares totales y de agua son similares al patrón del volumen acumulado (Fig. 21). La concentración varía entre 32.27 % y 50.27 %, pero no hubo diferencias significativas entre las distintas etapas de desarrollo (PW entre flores de diferentes tamaños). Durante su vida, una flor promedio acumula un total de 26.3  $\mu$ l de agua. De la misma manera, el patrón de acumulación de azúcares totales aumentó significativamente hasta que las flores alcanzan 26-28 mm de largo ( $Z = 7.75$ ;  $p = 4.7 \times 10^{-15}$ ; PW; flores de 17-19 mm versus de 26-28 mm de largo), decayendo en las flores de 29 mm de largo ( $Z = 0.882$ ;  $p = 0.21$ ; PW al comparar flores de 26-28 mm y 29 mm de largo). Desde el primer día de secreción hasta el final, una flor promedio secreta 11.54 mg promedio de azúcar. La mitad de este azúcar está ya disponible en las flores de 23-25 mm de largo, o sea, después de 4 días de la antesis.

#### b). VARIACION EN SECRECION ENTRE FLORES.-

Las flores de Eccremocarpus scaber, tal como se ha reportado en muchas otras especies (Cruden et al., 1983), varían considerablemente en cuanto a la cantidad de néctar acumulado (ver error estándar Tabla 7), aún cuando se trate de flores del mismo tamaño que hayan abierto juntas y hayan estado sujetas a las mismas condiciones de humedad relativa

y temperatura. La cantidad de néctar presente en flores de 20-22 mm varía desde 0-25.42  $\mu$ l con un promedio de 4.44  $\mu$ l y en las flores de 23-25 mm (la etapa de secreción más activa), varía desde 0-54.13  $\mu$ l con un promedio de 16.25  $\mu$ l. Aún en las flores maduras (26-28 mm de largo), la cantidad de néctar fluctuaba entre 0-77.74  $\mu$ l, con un promedio de 32.41  $\mu$ l. La pequeña proporción de flores (0.33 %) de 29 mm de largo que no presentaron néctar, debe considerarse con cuidado. Posiblemente algunas de estas flores nunca entren al "pool" de secretoras. Alternativamente, dichas flores pueden haber experimentado reabsorción de néctar.

Las fuentes de la variación en la cantidad de néctar secretado podrían ser varias, como por ejemplo, variación en el tamaño de nectarios mismos (ver III.ii) distintos tamaños, diferencias microclimáticas a lo largo de las inflorescencias que podrían influir en la movilización interna del agua y efectos de posición.

Con respecto a la posición en la inflorescencia, se podría plantear que de las dos flores subopuestas (ver Fig. 1) y que tienen, por ende, una edad similar, la ubicada más distalmente estaría en desventaja respecto a su pareja, en cuanto a llegada de agua y contenido floemático a la flor. Para ver si hubo efecto posicional de esta naturaleza, se aislaron grupos de flores de una misma inflorescencia e igual longitud, restringiéndose a los tamaños que corresponden a secreción activa (20-22 mm a 26-28 mm), preguntándose si la cantidad de néctar que secreta la flor ubicada dis-

talmente fue mayor o menor con respecto a la ubicada más proximalmente. A las 97 comparaciones de esta naturaleza se les aplicó la Prueba de órdenes con signo de Wilcoxon (POW) en que la hipótesis nula era que el número de valores positivos que se obtienen al comparar dos flores sería igual al número de valores negativos, obteniéndose un valor de  $t_s = 1.10$ , no significativo ( $p = 0.2$ ). De este análisis se puede concluir que no hay evidencias que indiquen que la variación entre flores sea debida a efectos posicionales en la inflorescencia.

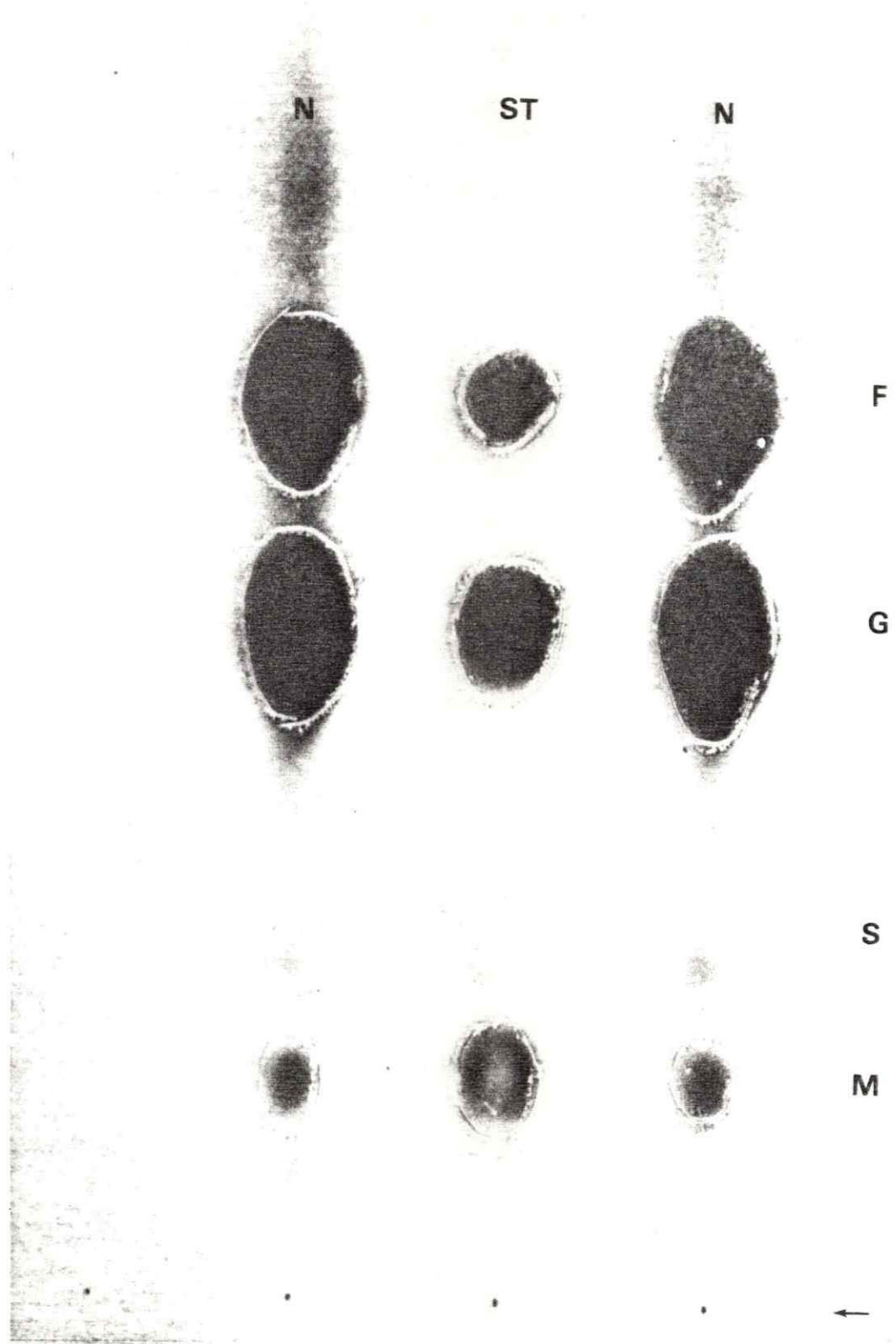
#### c). COMPOSICION DE AZUCARES DEL NECTAR.-

Cromatografía en capa fina de néctar de flores maduras recolectado a mediodía en las poblaciones naturales de Eccremocarpus scaber, permitió identificar los azúcares componentes del néctar. Estos azúcares son fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa (Fig. 23). El test de Antrona permitió cuantificar cada uno de estos azúcares componentes y determinar sus proporciones relativas en el néctar (Tabla B).

Análisis de los datos señalan que la cantidad de monosacáridos es el doble de los disacáridos. De los monosacáridos, glucosa y fructosa se encuentran en cantidades similares (fructosa 0.349 mg/ $\mu$ l y glucosa 0.333 mg/ $\mu$ l). Entre los disacáridos, sacarosa y maltosa también se encuentran en cantidades similares (0.172 mg/ $\mu$ l y 0.169 mg/ $\mu$ l respectivamente). De acuerdo con estos resultados, la rela-

## FIGURA 23.-

Cromatografía en capa fina de los componentes del néctar (N). ST = estándares de maltosa (M), sacarosa (S), glucosa (G) y fructosa (F). La placa fue revelada con  $\text{AgNO}_3$  + KOH 0.5 N y tiosulfato de sodio. La flecha indica el origen.





ción entre disacáridos y monosacáridos (D/M) es 0.5 y la relación entre sacarosa versus fructosa mas glucosa (S/F+G) es 0.25. La proporción en que se presentan los diferentes azúcares es 0.34:0.32:0.17:0.17 (fructosa:glucosa:sacarosa:maltosa).

d). VALOR ENERGETICO DEL NECTAR DE ECCREMOCARPUS SCABER.-

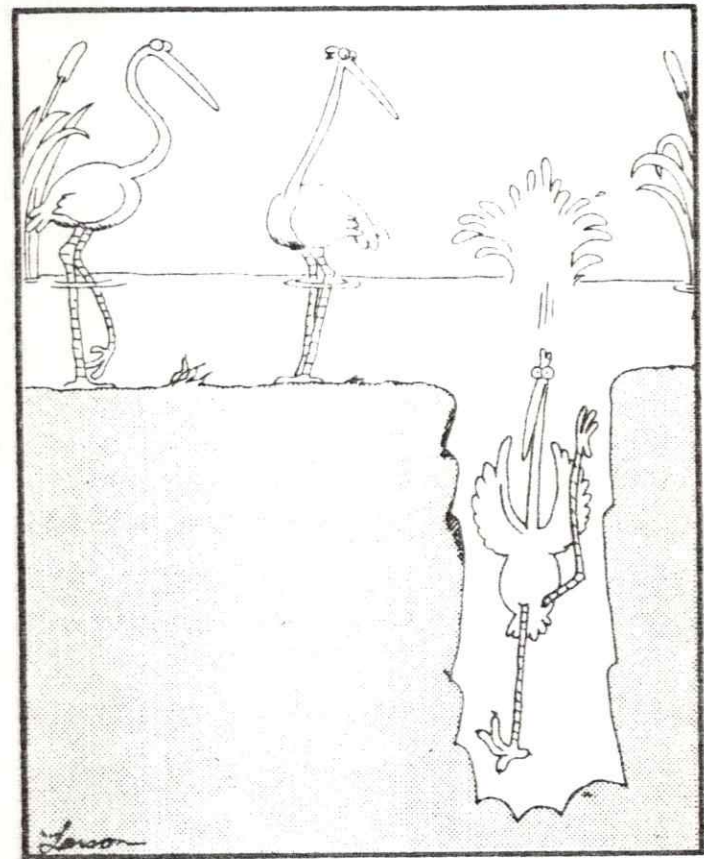
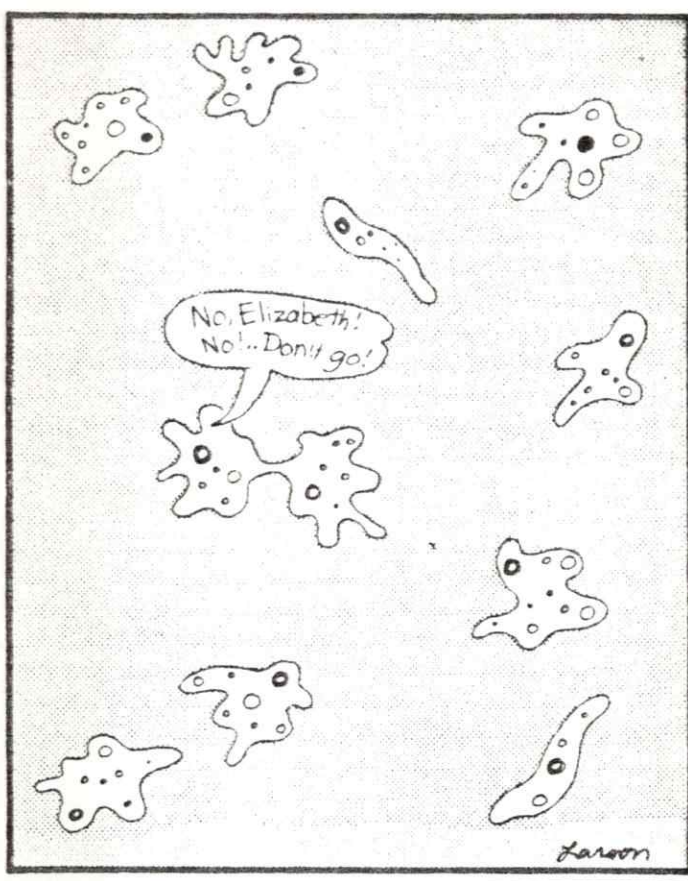
A partir del contenido de azúcares del néctar, es posible determinar la cantidad de calorías ofrecidas por flor (Tabla 9). Las flores son capaces de generar un total de 46.16 cal. Sin embargo, en un momento determinado las calorías por flor en una población de flores que visita un polinizador es menor ya que está compuesta de flores en diferentes estados de desarrollo y muchas de éstas pueden haber recibido visitas anteriormente. Considerando el néctar efectivamente disponible, las flores contienen en promedio 23.60 cal, y las inflorescencias (suponiendo un promedio de 6 flores en la etapa de secreción) 105.54 cal.

En la Tabla 10 se indica el número de flores que deberían visitar los polinizadores de Eccremocarpus scaber para satisfacer sus requerimientos energéticos. Suponiendo que se retira todo el néctar de la flor en cada visita, Patagona gigas, (sin entrar en sopor en la noche), debería visitar unas 846 flores diarias. Sephanoides galeritus debería visitar 385 flores diarias. Estas estimaciones, considerando los argumentos anteriores (ver II.v.), sin duda subestiman las verdaderas necesidades de los picaflores.

Tabla 10. Requerimientos energéticos de los polinizadores principales de Eccremocarpus scaber expresado en el número potencial de flores que significa la mantención de un individuo/día y el número aproximado de flores que debería visitar por día para satisfacer dicha demanda.

	Requerimiento energético (cal/día)	Número potencial de flores	No. mínimo de flores que debe visitar/ día
<hr/>			
<u>Patagona gigas</u>			
Día	12 046	261	510
Noche sin sopor	7 930	172	336
Noche con sopor	1 255	27	53
Rango	13 301 - 19 976	288 - 433	563-846
<u>Sephanoides galeritus</u>			
Día	6 184	134	262
Noche sin sopor	3 834	83	162
Máximo	10 018	217	385

\* De Fig. 5 y 6.



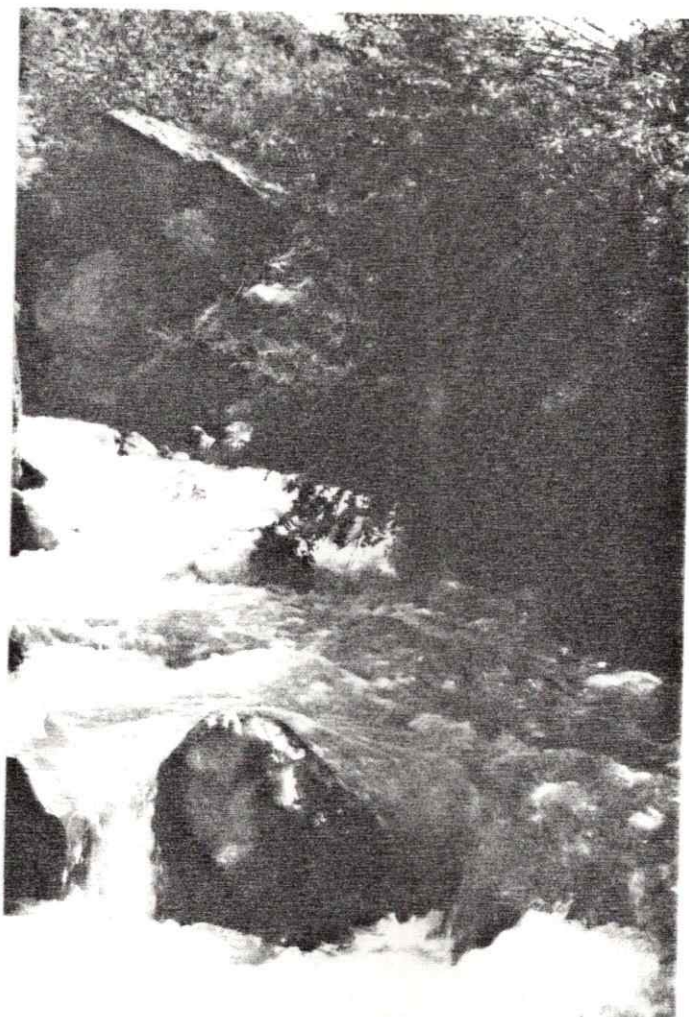
## e). REABSORCION DE AZUCARES.-

Se efectuó un experimento preliminar para detectar si ocurre reabsorción de néctar, hecho sugerido por la ausencia de néctar en algunas flores en la etapa avanzada de senescencia.

El néctar de 3 flores en estado senescente fue contaminado con  $^{14}\text{C}$ -sacarosa de radioactividad específica  $44 \times 10^6$  cpm/mmol. La sacarosa radioactiva fue dejada en el néctar de 3 flores por 24 h. De las 10 120 cpm de la solución de sacarosa con que se contaminó el néctar, sólo 967 cpm (flor 2) y 2 161 cpm (flor 3) fueron recuperadas en total, sumando los lavados acuosos, el extracto etanólico y las cuentas del tejido. En ambas flores, la mayor parte de las cuentas no fue recuperada lo que sugiere que un alto porcentaje de ellas habría sido incorporada por alguno de los restantes órganos de la flor (pétalos, gineceo, base de estambres). Con excepción de la flor 1, la cantidad de cuentas del extracto etanólico fue siempre mayor que el número de cuentas del último lavado acuoso, tanto para el nectario como para el ovario (Tabla 11). Esto pareciera indicar que si hay una reabsorción de sacarosa a partir del néctar de la flor senescente esta sería mediada por membranas. Las diferencias de cuentas entre la flor 1, 2 y 3 parece indicar que tal reabsorción dependería del estado fisiológico de la flor.

Tabla 11. Cuentas de  $^{14}\text{C}$ -Sacarosa en 3 flores del estado 3 después de 24 horas de contaminado el nectar.

	Flor 1		Flor 2		Flor 3	
	cpm Sacarosa (mg)		cpm Sacarosa (mg)		cpm Scarosa (mg)	
NECTAR PRESENTE	1351	0.13	286	0.03	3514	0.34
TEJIDO INTERNO DEL NECTARIO						
1er. lavado agua	1181		152		402	
2o. lavado agua	271		77		197	
Total	1452	0.14	229	0.02	599	0.06
1a. extracción etanólica	204		139		745	
2a. extracción etanólica	79		75		198	
3a. extracción etanólica	34		49		51	
Total	317	0.03	263	0.03	994	0.10
Nectario + líquido de centelleo	118		77		88	
TEJIDO INTERNO DEL OVARIO						
1er. lavado agua	410		76		85	
2o. lavado agua	90		76		49	
Total	500	0.05	152	0.01	134	0.01
1a. extracción etanólica	78		90		162	
2a. extracción etanólica	42		54		66	
3a. extracción etanólica	48		54		51	
Total	168	0.02	198	0.02	279	0.03
Ovario + líquido de centelleo	62		48		67	
TOTAL	2617		967		2161	



¡ SOMOS TODOS UNO !

iv). PATRON DIURNO DE ACTIVIDAD DE LOS POLINIZADORES Y PATRON DIARIO DE SECRECION DEL NECTARIO.-

Una tercera hipótesis que se pretende analizar en esta tesis predice que la actividad de los picafloros debería concentrarse en las primeras horas de la mañana, y en las últimas horas del día. Este patrón de actividad, a su vez, debería reflejarse en un patrón bimodal de secreción de néctar por parte de Eccremocarpus scaber, con un máximo en la madrugada antes de las primeras horas de colecta, y otro en la tarde antes del período crítico de colecta que ocurre en las horas del crepúsculo.

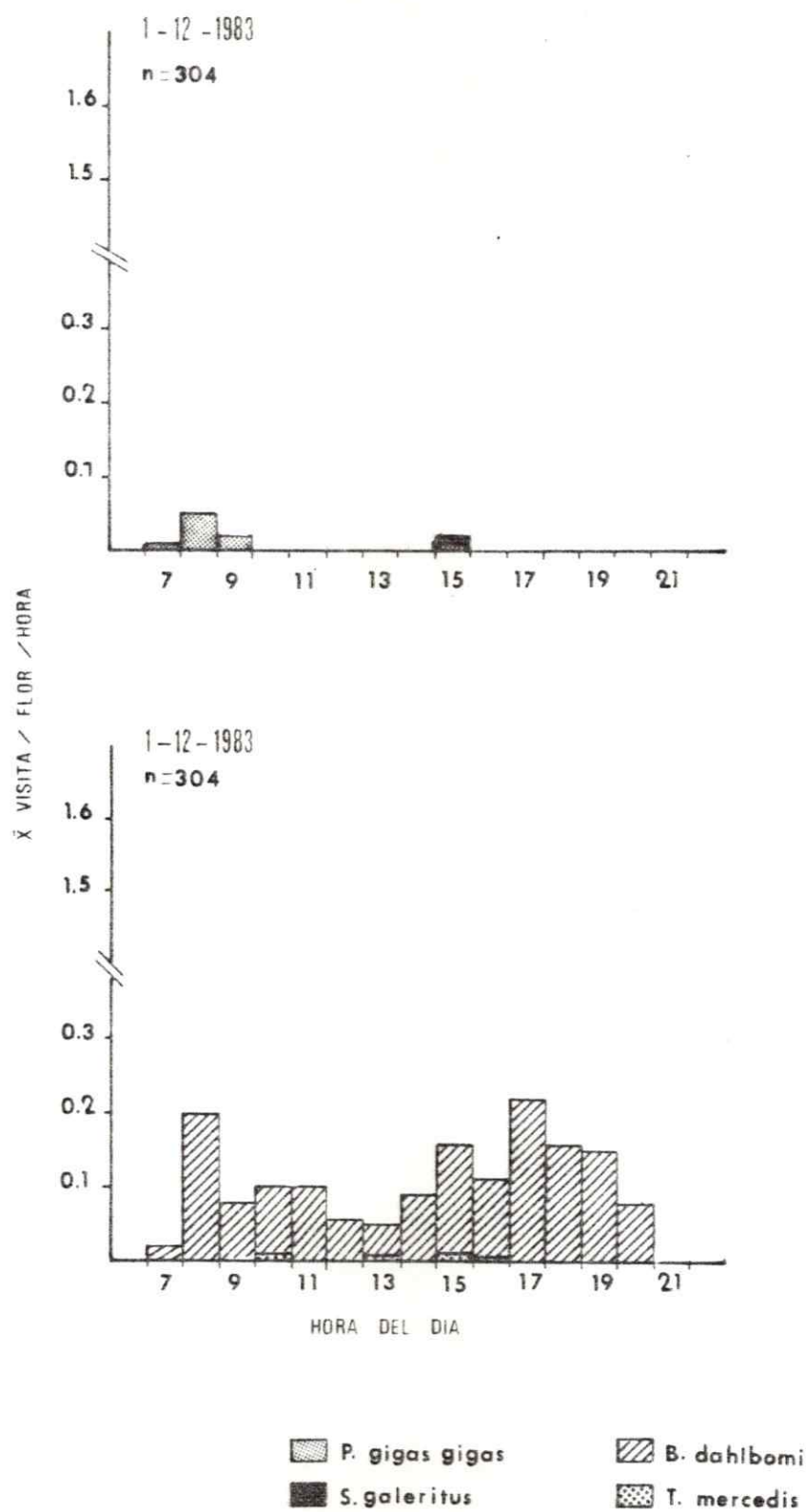
a). ACTIVIDAD DIURNA DE LOS POLINIZADORES.-

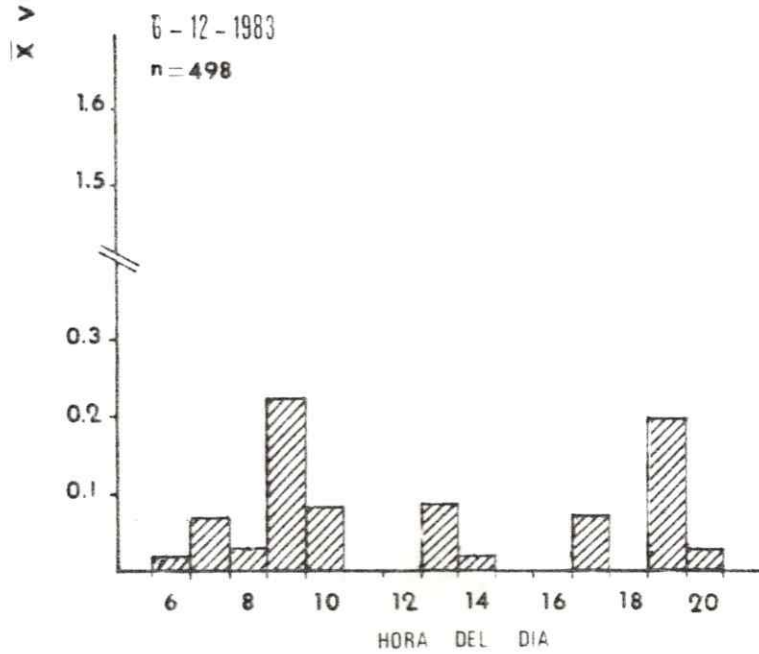
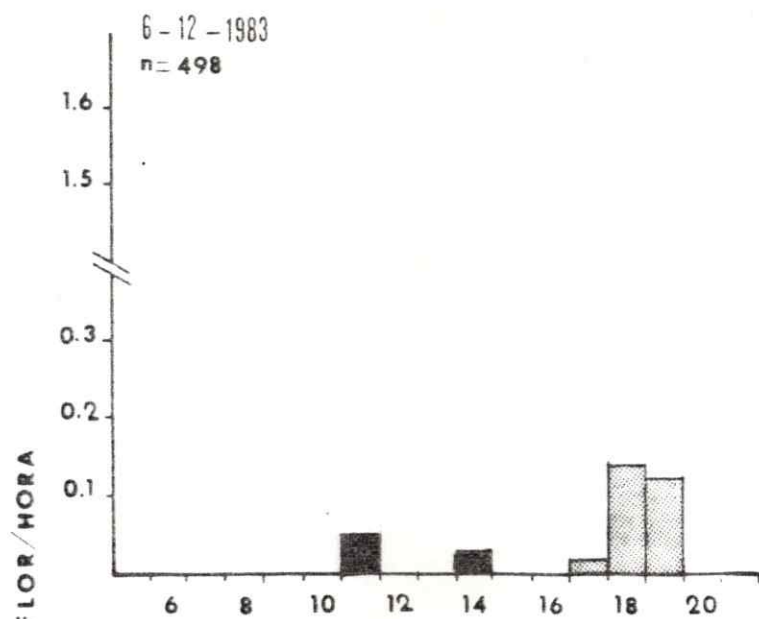
La Fig. 24 muestra el número de visitas efectuado cada hora, y la tasa de visita: promedio de visitas por flor por hora, para los siete días de observación en 1983 y 1984. Limitándonos a los dos polinizadores efectivos (P. gigas & Sephanoides galeritus) y considerando cada día separadamente, se observan patrones de visita altamente irregulares, con visitas restringidas a un número limitado de horas en cada día. Hubo algunas mañanas o tardes enteras en que no se registraron visitas. Mas aún, para una hora determinada, el número de visitas fue muy variable entre los días. Una causa esperada de la variación en el número de flores visitadas por hora fue el aumento del número de flores a lo largo de la estación de floración (Fig. 24A). Sin

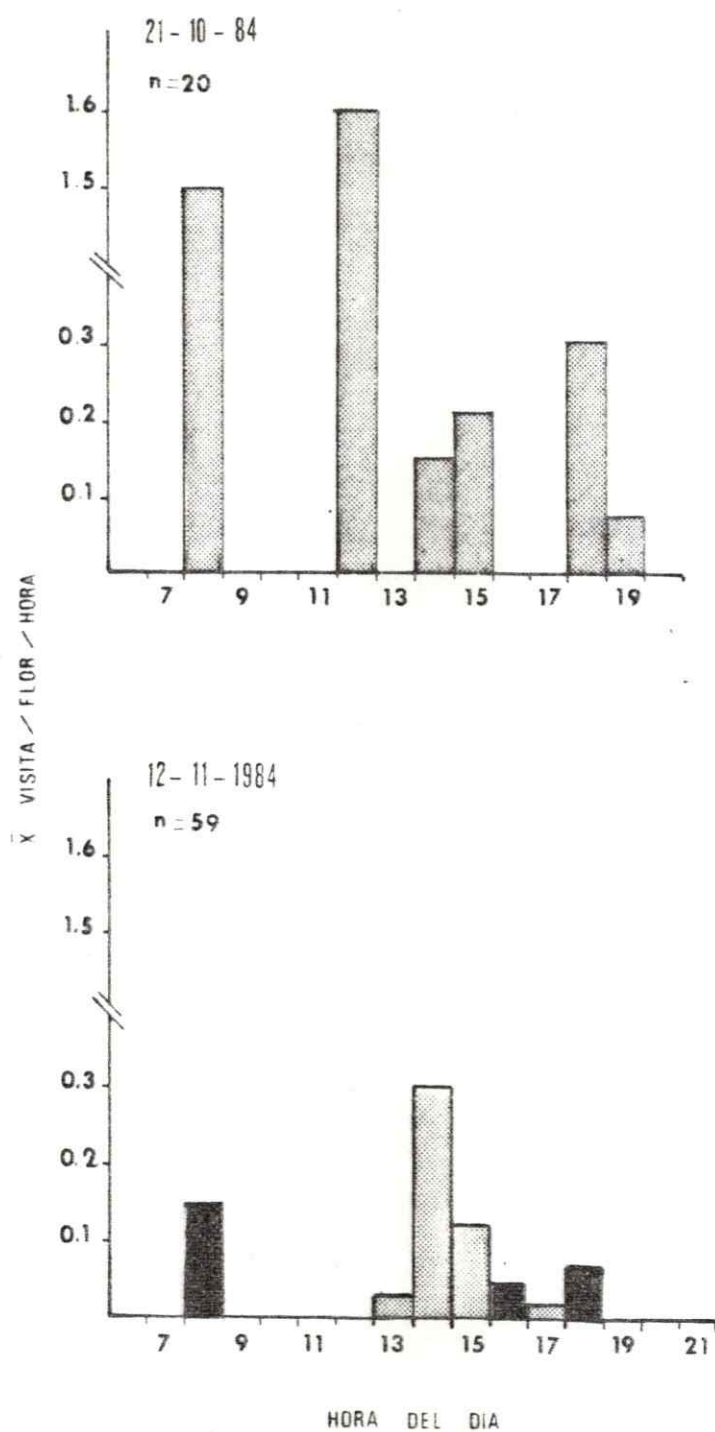
## FIGURA 24.-

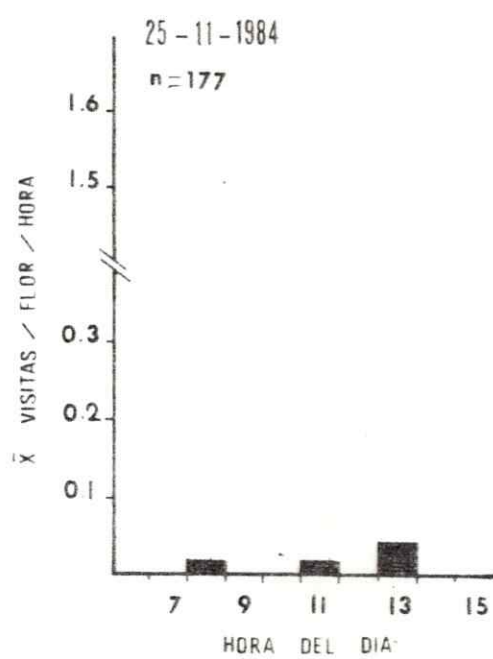
Patrón de visita diurno de Patagona gigas, Sephanoides galeritus, Bombus dahlbomi y Tatochila mercedis de siete fechas en la época de floración de Eccremocarpus scaber. Se muestra la tasa de visita por hora para cada fecha y para cada organismo.  $n$  = número de flores abiertas en el área observada.

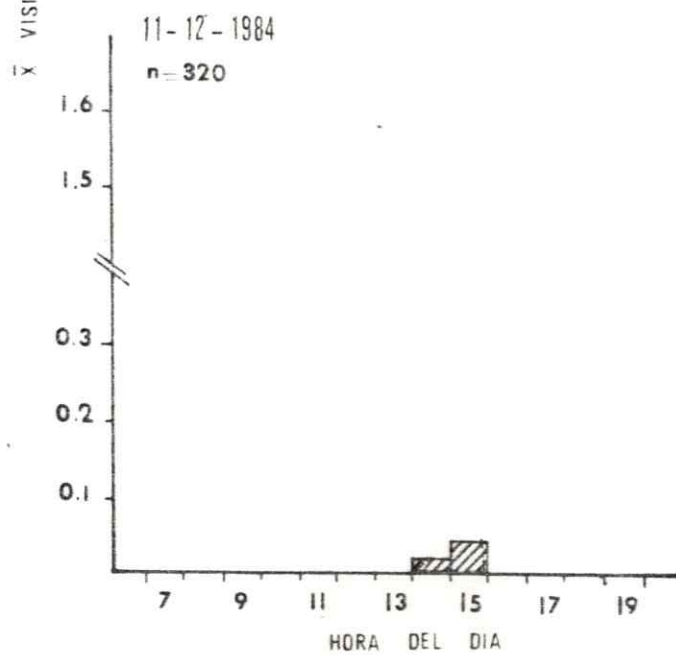
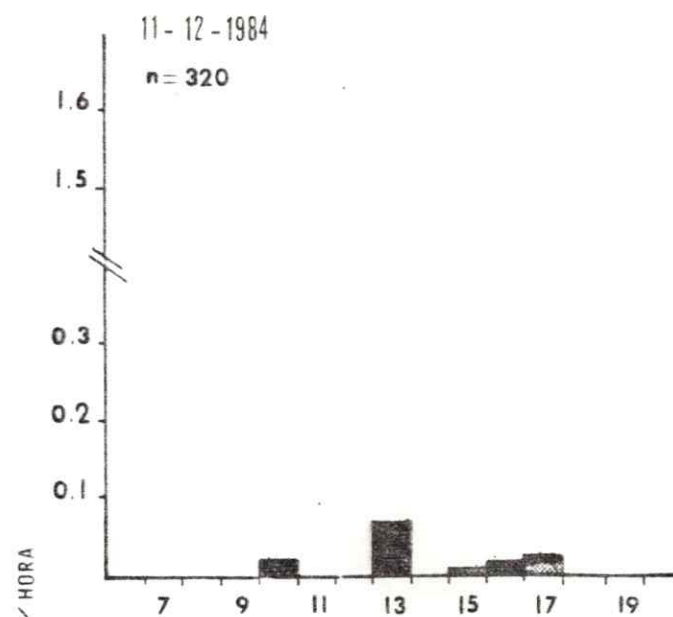


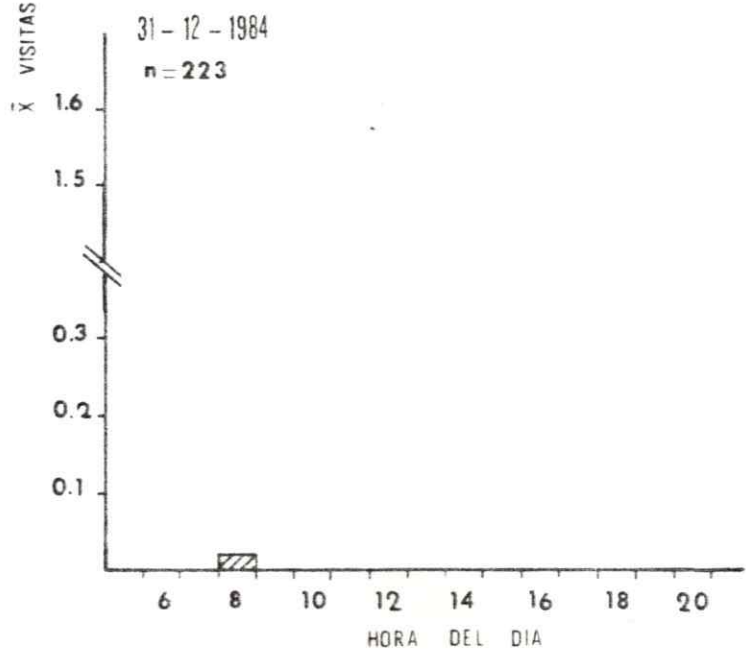
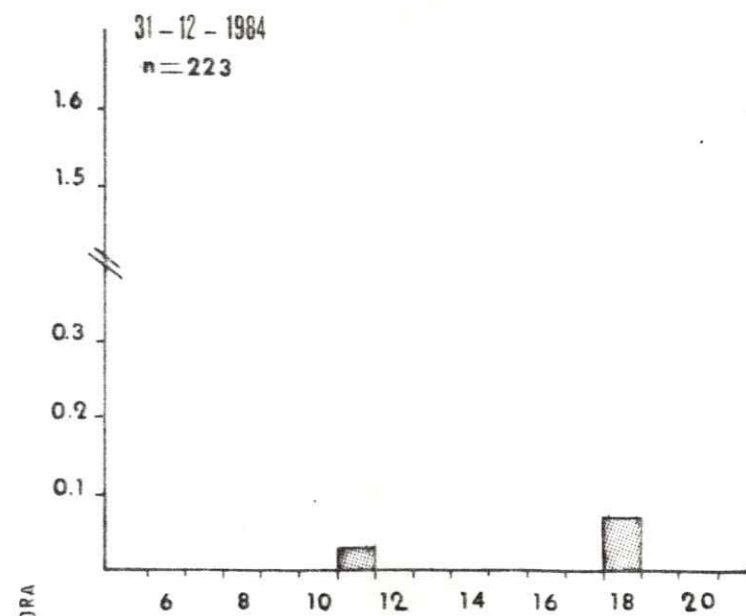












embargo, al contrario de lo esperado, dicho aumento no provocó un aumento equivalente en el número de visitas. Consecuentemente, para una hora determinada, las tasas de visita son también sumamente variables (Fig. 24B).

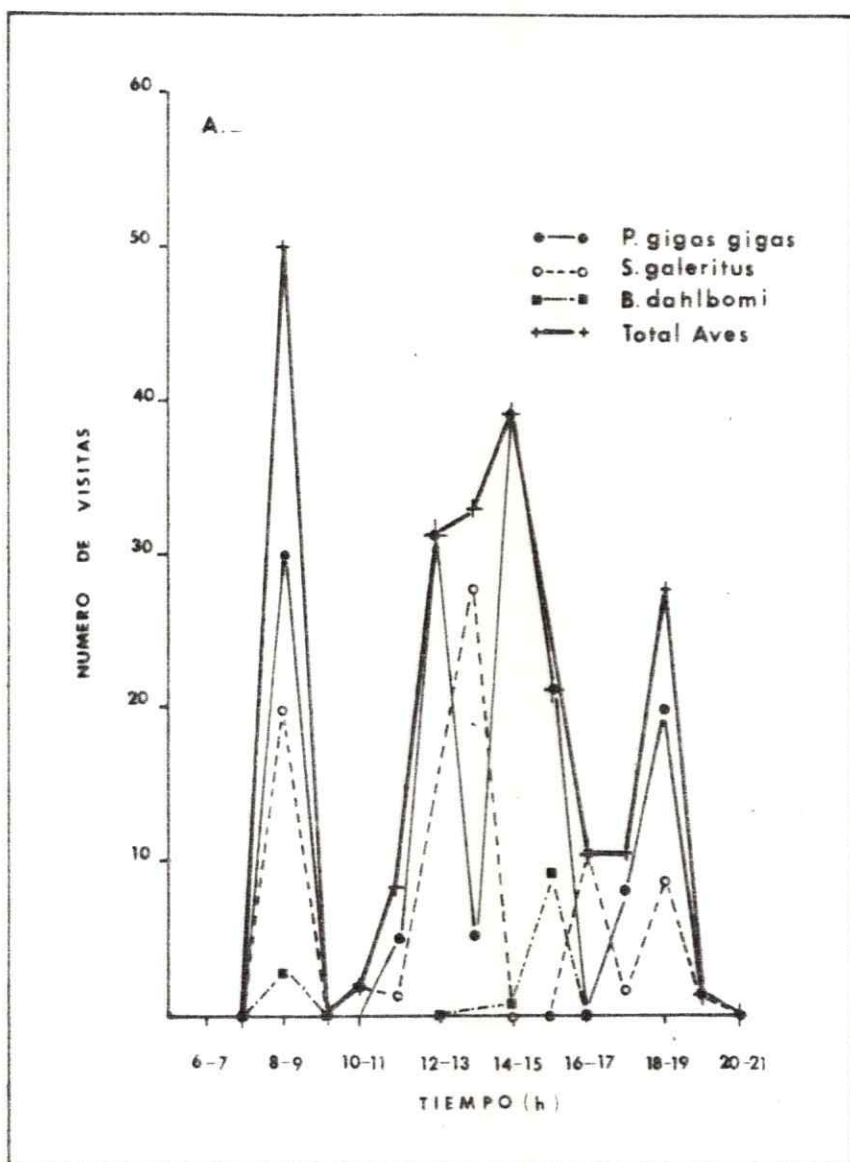
La Fig. 25 muestra el patrón diurno de visitas generado al combinar los datos de todos los días de muestreo de 1984 (año en que el muestreo es más representativo del período de floración de Eccremocarpus scaber). Para detectar primero si existen tendencias hacia mayores (o menores) números de visitas en algunas horas, se comparó la frecuencia de visitas por hora de ambas especies de picaflores separadamente y en conjunto (Fig. 25A) contra la hipótesis nula de igual frecuencia de visitas por hora, usando la Prueba de Kolmogorov-Smirnov. La hipótesis nula fue rechazada en los tres casos ( $p < 0.01$ ), encontrándose tres máximos distintos en el día al considerar el efecto combinado de las dos especies (Fig. 25A). Un primer máximo es evidente entre las 8-9 AM, 1.5-2 h después de la salida del sol, no habiéndose registrado visitas antes de esta hora. Es interesante que Bombus dahlbomi estuvo activo desde más temprano que los picaflores (Fig. 24). Los dos picaflores se sobreponen en este máximo, sin embargo, nunca se presentaron juntos en un día particular en 1984 (Fig. 24). La sobreposición es debida a la combinación de registros de diferentes días.

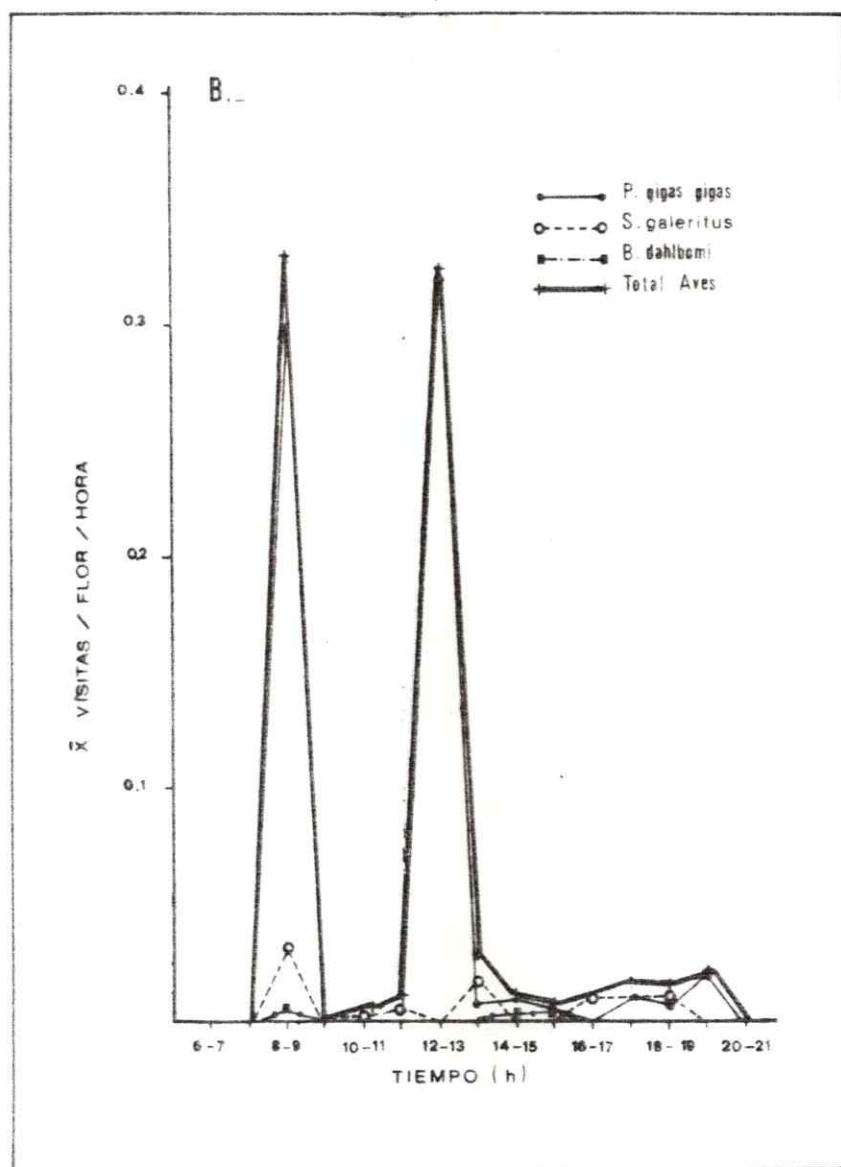
Un segundo máximo (Fig. 25B) se encuentra después del mediodía, entre la 1-3 PM. Este segundo máximo, a diferen-

## FIGURA 25.-

Patrón diurno de visitas generado a base del total de visitas efectuadas por Patagona gigas, Sephanoides galeritus, Bombus dahlbomi y Tatochila mercedis en los cinco días de muestreo de 1984, entre Octubre y Diciembre (ver también Tabla 12). A: Número de visitas por hora. B: Tasa promedio de visita por flor por hora.







cia de las horas de la mañana, está compuesto de períodos en que la actividad de Patagona gigas alterna con la de Sephanoides galeritus y en general, la actividad es más continua que en las horas de la mañana. Hubo varias instancias en que los dos picaflores se observaron juntos en una misma tarde, contrariamente a lo que ocurre en las mañanas (Fig. 24). Un tercer máximo es evidente con las últimas horas de luz (crepúsculo). Nuevamente la actividad de los dos picaflores se sobreponen, pero su actividad estuvo separada en diferentes días (Fig. 24), tal como se observó en las mañanas. A partir de las 7 PM, hubo un descenso notable en el número de visitas. Nuevamente, se destaca que Bombus dahlbomi estuvo activo hasta más tarde que los picaflores (Fig. 25 y 26).

Aunque los picaflores estén activos relativamente temprano en la mañana, el patrón de visitas señalado en las Fig. 24 y 25 no apoya la hipótesis de dos períodos de mayor actividad de los picaflores: uno en las primeras horas de la mañana y otro en las últimas del día, con una depresión al mediodía. Por el contrario, al menos en los sitios estudiados, parece que el período de mayor actividad en el día es en las primeras horas de la tarde, cuando la temperatura es alta (Tabla 12). Esto se puede apreciar al comparar la frecuencia de visitas entre las 6-12 AM, con las visitas entre las 12 AM y las 6 PM. En conjunto, los picaflores efectuaron más del doble del número de visitas en la tarde ( $\chi^2 = 33.761$ ;  $p < 0.001$  contra la hipótesis nula de igual

## FIGURA 26.-

Patrón de visita diurno de Bombus dahlbomi generado de dos días de muestreo en Diciembre, 1983.

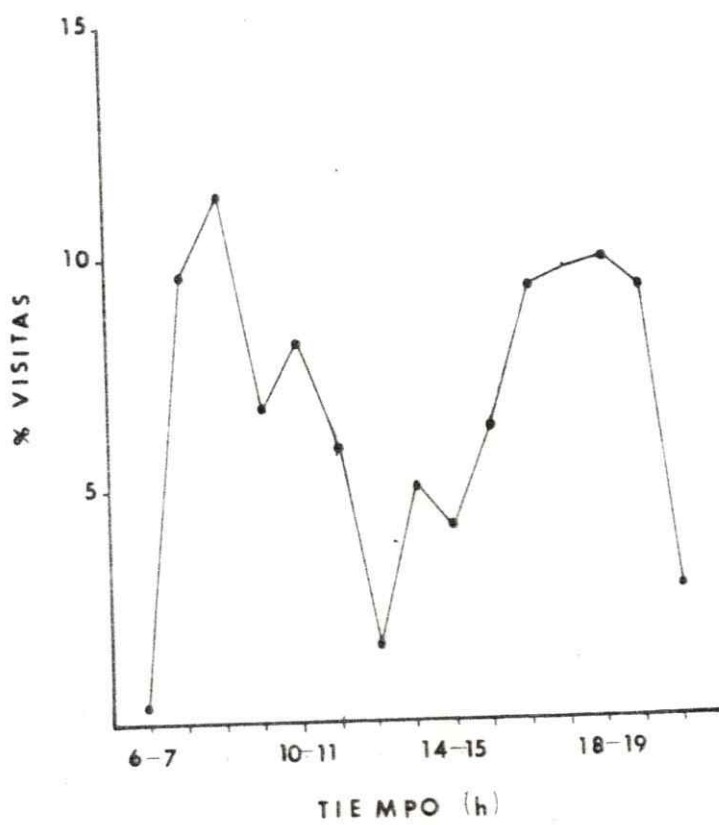


Tabla 12. Porcentaje relativo de visitas en los 3 periodos del día efectuado por los organismos antófilos de Eccremocarpus scaber en 1984.

	Mañana		Tarde		Crepúsculo	
	6 AM - 12 AM		12 AM - 6 PM		6 PM - 9 PM	
	n	%	n	%	n	%
P. gigas	35	21.74	104	64.59	22	13.66
S. galeritus	27	34.62	43	55.12	8	10.26
Total Aves	62	25.94	147	61.51	30	12.55
B. dahlbomi	3	23.08	10	76.92	0	0.0

NOTA. Los números absolutos de visitas fueron ajustados para compensar la desigualdad de número de intervalos de muestreo de 10 minutos.

frecuencia de visitas en los dos períodos). El efecto se debió principalmente a P. gigas puesto que efectuó, en la tarde, 3 veces el número de visitas que realizó durante las horas de la mañana; ( $\chi^2 = 33.27$ ;  $p < 0.001$ ). En el caso de Sephanoides galeritus la frecuencia de visitas no fue significativamente distinto en la tarde ( $\chi^2 = 3.214$ ;  $p = 0.073$ ). A pesar de la evidente gran variación entre una hora y otra (Fig. 25B), también hubo una cierta tendencia hacia mayores tasas de visita en la tarde en relación a la mañana ( $Z = 1.516$ ;  $p = 0.06$ ; PW).

b). PATRON DIARIO DE SECRECION DE NECTAR.-

Extracciones de néctar secretado durante cada uno de los 4 intervalos de 6 h a lo largo de 24 h (Tabla 13; Fig. 27), reveló que existe un patrón diario de secreción de néctar muy característico en Eccremocarpus scaber. Este patrón sin embargo, no es consistente con las predicciones ni está en correspondencia con los hábitos de los picaflores descritos arriba.

Con el objetivo de determinar si la hora del día influye en el volumen de néctar secretado, se sometió los datos a un Análisis de Varianza de Un Factor, encontrándose diferencias significativas tanto para volúmenes, concentración, azúcares y agua del néctar. Las flores secretaron casi tres veces más néctar en las horas del "día" (6 AM - 6 PM) que en las horas de la "noche" (6 PM - 6 AM) (Tabla 14) siendo la diferencia altamente significativa ( $Z = 3.01$ ;  $p =$

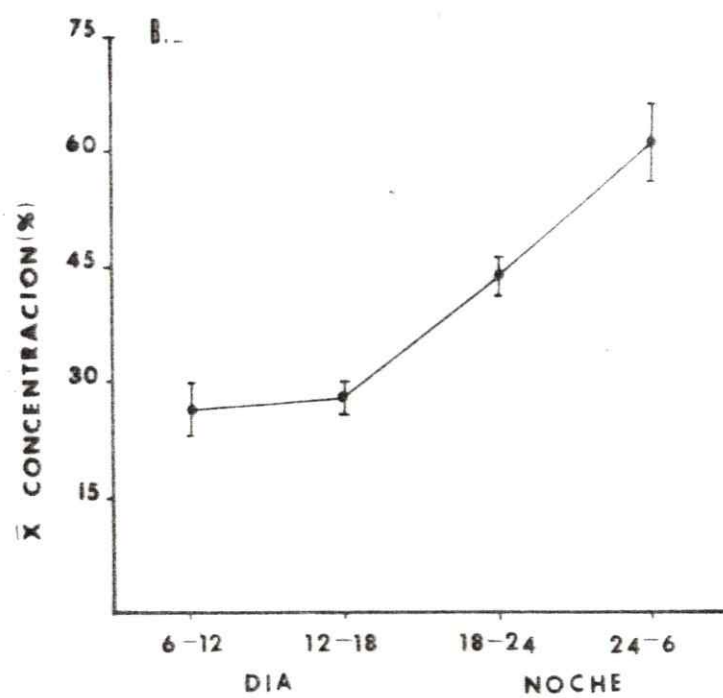
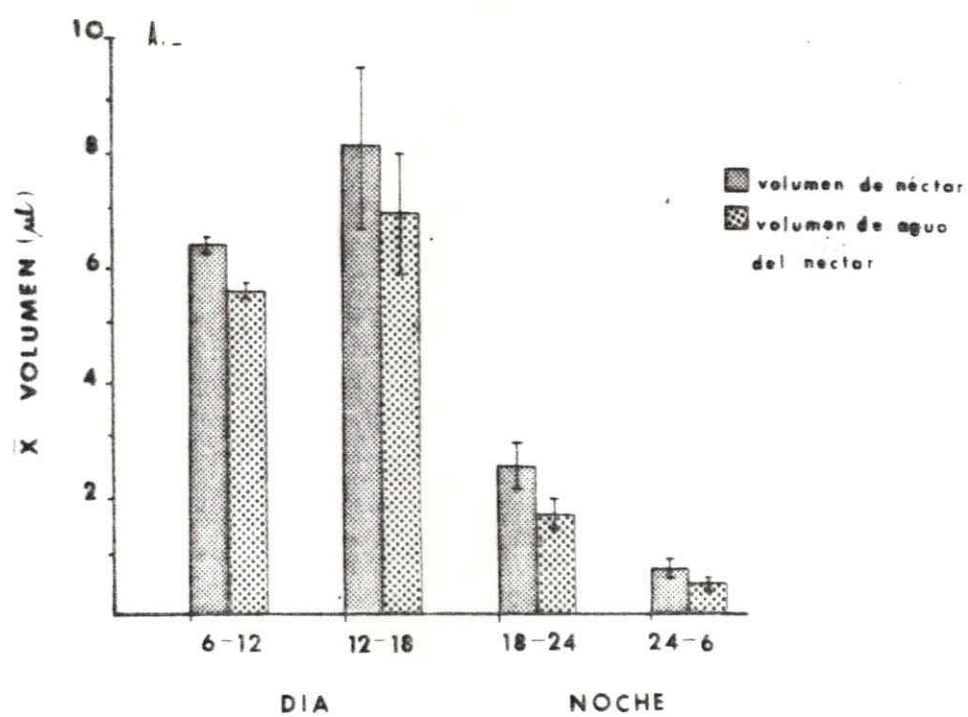
Tabla 13. Volumen, concentración de azúcares, cantidad de azúcares y de agua del néctar de Eccremocarpus scaber, secretado a intervalos de 6 horas a lo largo de 24 h. Se trabajó con 21 flores individualmente. Se indica rango de temperatura ambiental.

	Néctar secretado			
	Horas del día		Horas de la noche	
	6AM - 12AM	12AM - 6PM	6PM - 12PM	12PM - 6AM
Volumen de néctar ( $\mu$ l)				
$\bar{X}$	6.38	8.16	2.57	0.78
SE	0.87	1.54	0.33	0.10
Rango	0-13.5	0-20.8	0.4-6.5	0-1.6
Concentración del néctar (%)				
$\bar{X}$	25.91	25.81	42.84	61.95
SE	3.04	2.04	2.5	4.8
Rango	16.1-79.5	16.0-53.2	30.8-74.2	36.9-99.0
Azúcares (mg)				
$\bar{X}$	1.53	1.89	1.12	0.49
SE	0.19	0.39	0.10	0.03
Rango	0-2.9	0-5.4	0.8-2.6	0.3-0.7
Agua ( $\mu$ l)				
$\bar{X}$	5.34	6.84	1.87	0.52
SE	0.75	1.31	0.25	0.08
Rango	0-11.7	0-17.0	0.4-4.7	0-1.5
Temperatura				
( $^{\circ}$ C)	2.5 a 25	20 a 24	3 a 18	-3 a 3



## FIGURA 27.-

Promedio de néctar y agua secretado (A), concentración del néctar (B) y cantidad de azúcares (C), según hora del día. El experimento se inició a las 6 PM. Las barras corresponden a error estándar.



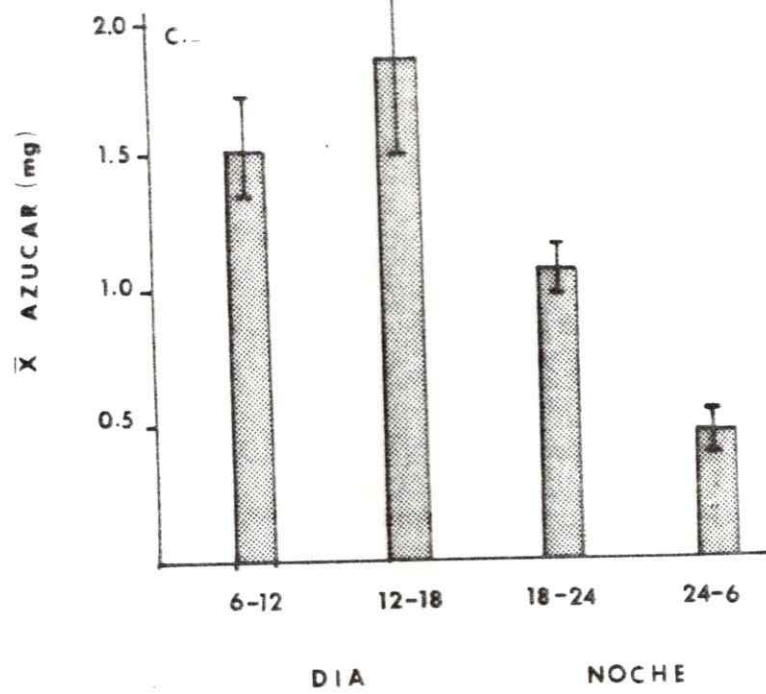


Tabla 14. Características del néctar secretado en las horas del "día" (6 AM - 6 PM) versus de la "noche" (6 PM - 6 AM).

	Día	Noche	PW	p
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$		
Volumen ( $\mu$ l)	14.39 $\pm$ 2.26	3.35 $\pm$ 1.82	3.01	1.32 $\times 10^{-3}$
Concentración (%)	25.01 $\pm$ 2.96	51.52 $\pm$ 2.96	-4.57	2.40 $\times 10^{-6}$
Azúcares (mg)	3.76 $\pm$ 0.58	1.64 $\pm$ 0.36	1.85	0.032
Agua ( $\mu$ l)	12.18 $\pm$ 1.98	2.39 $\pm$ 0.30	3.18	7.31 $\times 10^{-4}$

$1.32 \times 10^3$ ;PW). El volumen de néctar secretado en los dos períodos del día es similar (Fig. 27). Por el contrario, en la noche se observa una diferencia notable en el volumen de néctar secretado entre las primeras (6 PM - 12 PM) y las restantes seis horas (12 PM - 6 AM) ( $Z = 4.503$ ;  $p = 3.4 \times 10^{-6}$  PW). Las horas menos productivas son, claramente las comprendidas entre la medianoche y la madrugada.

La magnitud de las diferencias del volumen de néctar secretado a lo largo del día fueron notables. En la mañana y la tarde, las flores secretaron promedios de 6.38  $\mu$ l y 8.16  $\mu$ l de néctar cada seis horas respectivamente, en contraste con 2.57  $\mu$ l y 0.78  $\mu$ l que secretaron en las primeras horas de la noche y en la madrugada. La reducción desde un promedio de 8.16  $\mu$ l a 0.78  $\mu$ l entre la tarde y la madrugada respresenta un disminución de cerca del 90 % en un período de 12 h. De estos resultados es evidente que las flores de Eccremocarpus scaber no presentan un período de mayor secreción en la madrugada. Por el contrario, este es justamente el período en que las flores alcanzan un nivel mínimo de secreción. Tampoco hay evidencia de un período de secreción acentuado de néctar en la tarde. El ritmo de secreción parece consistir más bien de períodos de baja producción en la noche, que alternan con períodos de alta producción en el día.

Es lícito preguntarse si el patrón generado a nivel de la población de flores estudiadas (Fig. 27) se debe a un comportamiento consistente entre cada flor individual.

Esto se comprobó comparando las tendencias en el volumen de néctar secretado entre las horas del día y de la noche para cada flor, mediante la POW (Sokal & Rohlf, 1981), obteniéndose un valor altamente significativo ( $p < 0.005$ ). De las 21 flores, sólo 5 mostraron una tendencia a secretar menos néctar en las horas del día comparado con la noche. Además, las 6 flores que no obedecieron al patrón general, secretaron poco néctar a todas horas. La drástica disminución en el volumen de néctar secretado al comparar las primeras horas de la noche con la madrugada también es evidente en las flores individuales, ( $t_s = 3.32$ ;  $n = 21$ ;  $p < 0.005$ ). En este caso el comportamiento de las flores fue aún más consistente en vista que ninguna flor secretó más néctar en las horas de la madrugada que en las primeras horas de la noche.

Considerando que tanto el agua como los azúcares del néctar juegan un rol importante en la dieta de los picaflores resulta interesante preguntarse hasta qué punto habrá coincidencia entre los patrones de secreción de ambos componentes. Se sometieron a un Análisis de Varianza las cantidades de agua y azúcares secretadas cada seis horas (Tabla 13), obteniéndose en ambos casos efectos significativos de las horas del día. Aunque en líneas generales, la secreción de agua y de azúcares siguen patrones similares (Fig. 27), un examen más profundo de los resultados revela que difieren en algunos detalles. Mientras hubo reducciones marcadas en los azúcares y agua secretados comparando las

horas del día (6 AM - 6 PM) con las de la noche (6 PM - 6 AM); Tabla 14), la reducción en la cantidad de azúcares secretada es claramente menos pronunciada que la del agua. Efectivamente, esta diferencia se debe al hecho de que hay una clara tendencia hacia aportes más exagerados de agua al néctar en los períodos de máxima secreción de azúcares. La falta de concordancia entre los patrones de secreción del agua y los azúcares del néctar resulta en notables diferencias en la concentración del néctar a lo largo del día (Tabla 13 y 14; Fig. 27). El néctar producido en las horas de la noche es doblemente más concentrado que el de las horas del día (Tabla 14). El néctar producido en las últimas horas de la noche y en la madrugada (12 PM - 6 AM) es casi tres veces más concentrado que el néctar producido en el día. El néctar más diluido se produce entre las 6 AM - 12 AM (Fig. 27).

Aunque no se comprueba ninguna de las hipótesis particulares planteadas inicialmente con respecto al comportamiento de los picaflores y la secreción de néctar, no es menos cierto que la actividad de los picaflores y el patrón de secreción de néctar guardan cierta relación en el sentido que el período de máxima actividad de los picaflores coincide con un período de alta producción de néctar en la tarde.

#### c). FACTORES EXOGENOS EN LA SECRECION DE NECTAR.-

El ajuste fino entre dos organismos que interactúan

dependerá en gran medida de la capacidad de cada organismo de responder selectivamente, frente a la suma total de factores exógenos (ej. luz, temperatura, humedad relativa) y endógenos (ej. retroalimentación fisiológica) que determinan un carácter determinado. Aunque no fue un objetivo de este trabajo, es de interés preguntarse hasta qué punto el patrón de secreción de néctar en Eccremocarpus scaber está determinado por factores exógenos. Una faceta de los presentes resultados que podría iluminar esta pregunta son los cambios en concentración que se producen a medida que aumenta la tasa de secreción de néctar. Entre las 21 flores que se estudiaron individualmente para determinar su patrón de secreción diario, se vio que desde un principio existió una variación intrínseca en su capacidad secretora (ver rangos; Tabla 13). Si los factores endógenos determinan la relación entre la cantidad de agua y azúcares producidos, esto debería reflejarse internamente en la población de flores en cada uno de los cuatro periodos de muestreo, resultando en una tendencia general hacia menores concentraciones de néctar en las flores que producen relativamente mayores cantidades de azúcar. Para averiguar si esta posibilidad se da, se buscó las regresiones de mejor ajuste entre volumen de agua y mg de azúcar secretado por flor (Tabla 15; Fig. 28). Los mejores ajustes en 2 de los 4 casos fueron lineales y las regresiones altamente significativas (Tabla 15), indicando que la concentración del néctar en un determinado período del día, respecto de las

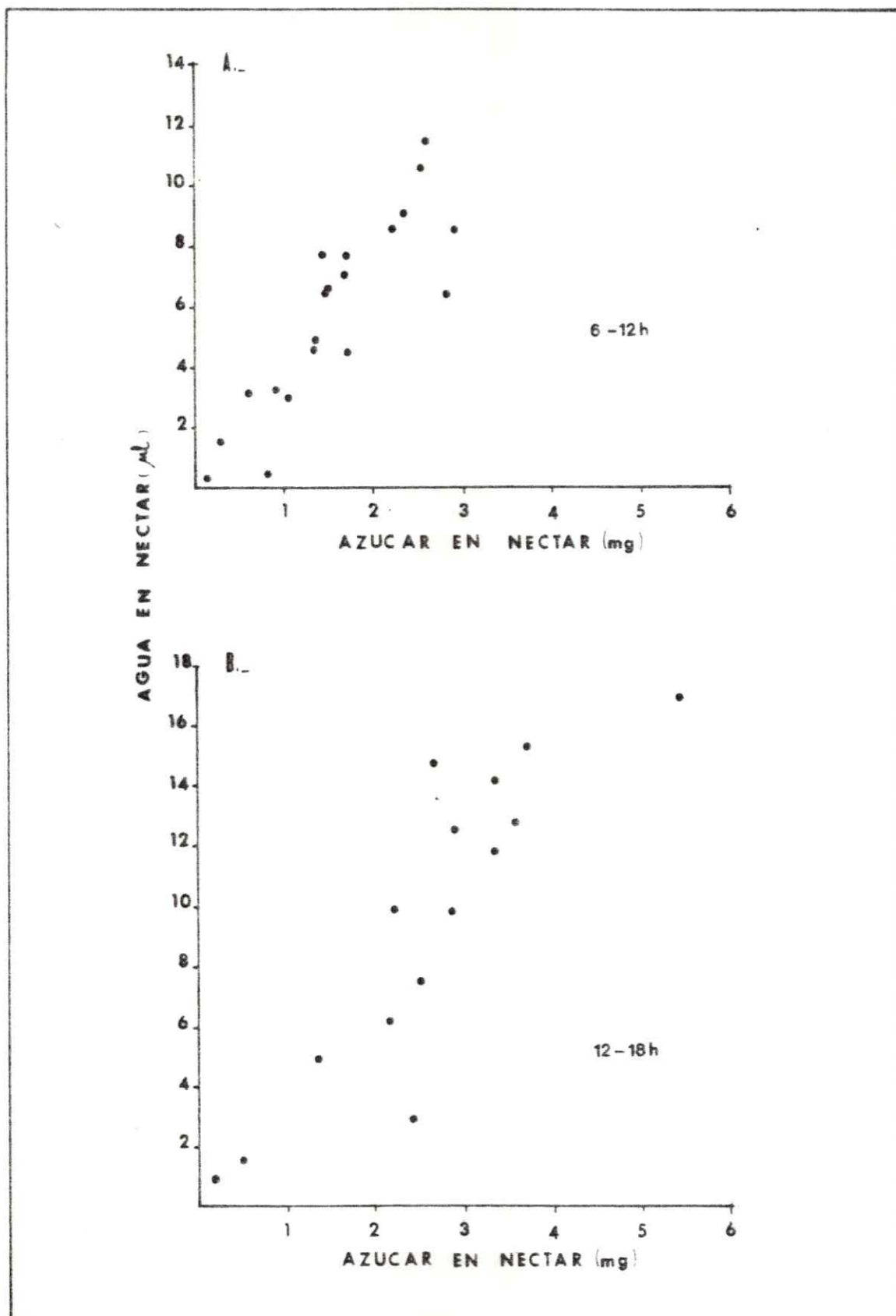


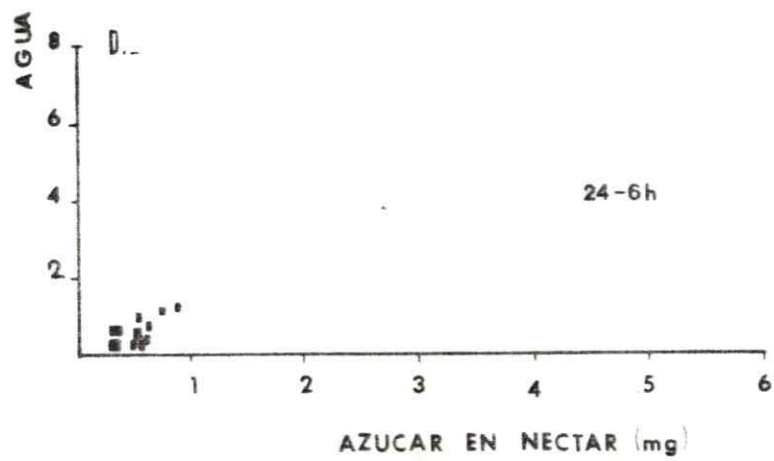
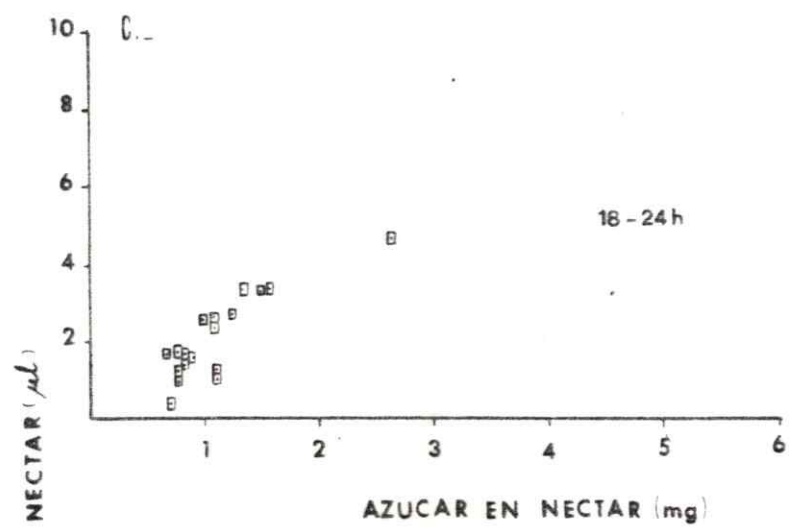
Tabla 15. Regresiones (mejor ajuste) de volumen de agua en cantidad de azúcar por flor del néctar de Eccremocarpus scaber secretado a diferentes horas del día.

Intervalo de tiempo	Ecuación de regresión	df	F-Ratio	p
6 AM - 12 AM	$y = 3.44x + 0.34$	17	59.29	$6.11 \cdot 10^{-7}$
12 AM - 6 PM	$y = 0.49x^{1.12}$	14	128.84	$1.90 \cdot 10^{-8}$
6 PM - 12 PM	$y = 6.99 \ln x + 1.91$	17	99.61	$1.59 \cdot 10^{-8}$
12 PM - 6 AM	$y = 1.26x - 0.09$	14	5.81	0.04

## FIGURA 28.-

Relación entre la cantidad de azúcar y agua secretada por flor en Eccremocarpus scaber en cuatro diferentes períodos de seis horas del día. Cada punto corresponde a una flor individual. Ver Tabla 15 para las ecuaciones de regresión y sus niveles de significancia. Una relación lineal entre las dos variables indica que la concentración de néctar es uniforme e independiente de las diferencias en cantidad de néctar secretado por flores individuales en dicho intervalo. Una relación log-log indica que hay una cierta tendencia hacia la producción de néctar menos concentrado en las flores con mayor capacidad secretora. Mayor pendiente significa néctar menos concentrado. Horas del día (A, B); horas de la noche (C, D).





diferencias en capacidad secretora de las flores, se mantiene uniforme. En un caso (6 PM - 12 PM) el ajuste fue ligeramente mejorado con una regresión semi-logrítica y en otro (12 AM - 6 PM) una regresión log-log dio el mejor ajuste (Tabla 15; Fig. 28). La diferencia entre las últimas curvas y el ajuste lineal es muy pequeña, y el ajuste log-log es insuficiente como para explicar las diferencias en concentración que se ve entre el día y la noche. Estos resultados sugieren que es improbable que las diferencias en concentración en el néctar entre el día y la noche se deban a factores endógenos. Más probablemente se deberían a diferencias en el flujo transpiratorio entre el día y la noche.

## V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.-

En aquellos estudios en los que se ha tratado de explicar la evolución de caracteres de un organismo como respuesta a la presión selectiva de otro(s), es deseable tener seguridad que los efectos observados han evolucionado en el contexto de la interacción observada. En este estudio se intentó cumplir con este requisito seleccionando una especie de planta de una tribu taxonómicamente aislada, perteneciente a una familia en la que la ornitofilia constituye una condición derivada (Gentry, 1974). La selección de una interacción en que uno de los participantes presenta características extremas en cuanto a requerimientos energéticos, también facilita la interpretación de los resultados en un contexto comparativo. Por ello, tomando en cuenta estos propósitos nos pareció ideal analizar la interacción entre Eccremocarpus scaber y Patagona gigas, el de mayor tamaño corporal entre los picaflores.

Se confirmó que los principales polinizadores de Eccremocarpus scaber son los picaflores Patagona gigas y Sephanoides galeritus. Comparados con Bombus dahlbomi y Tatochila mercedis, que también visitan las flores de E. scaber, los picaflores mostraron mayor constancia de visita entre años consecutivos y a lo largo de la estación de floración, y están mejor adaptados morfológicamente para la

extracción del néctar y para la transferencia de polen desde las anteras a los estigmas ocultos de las flores tubulares de E. scaber. Eccremocarpus scaber es parcialmente autocompatible (Uslar, 1982). La tendencia de los picaflores a visitar pocas flores de una planta por visita aseguraría la promoción de la fecundación cruzada en especies con este sistema de reproducción (Arroyo, 1976 b). Por el contrario, los hábitos de Bombus dahlbomi en particular, si bien resultan en la transferencia de polen, llevarían a un predominio de autofecundación. Desde la perspectiva de la calidad de las fecundaciones efectuadas, nuevamente los picaflores constituirían polinizadores más efectivos. Entre los picaflores Patagona gigas, caracterizado por un requerimiento energético de casi el doble que Sephanoides galeritus, efectuó la mayor proporción de visitas a E. scaber, y fue más fiel en su patrón de visita. Cabe analizar ahora, si los resultados entregan alguna evidencia de efectos selectivos de estos polinizadores en la secreción de néctar.

Entre los parámetros estudiados, se puede ver que el contenido de azúcares y cantidad de néctar producido por flor en Eccremocarpus scaber, son altamente consistentes con el alto requerimiento energético de Patagona gigas. La cantidad de azúcar ( $\bar{X}$  = 5.02 mg) producida en 24 h en las flores de E. scaber sobrepasa los 0.26-1.84 mg ( $\bar{X}$  de las especies = 0.88 mg) producidos en seis especies de plantas polinizadas por picaflores en Sierra Nevada de California

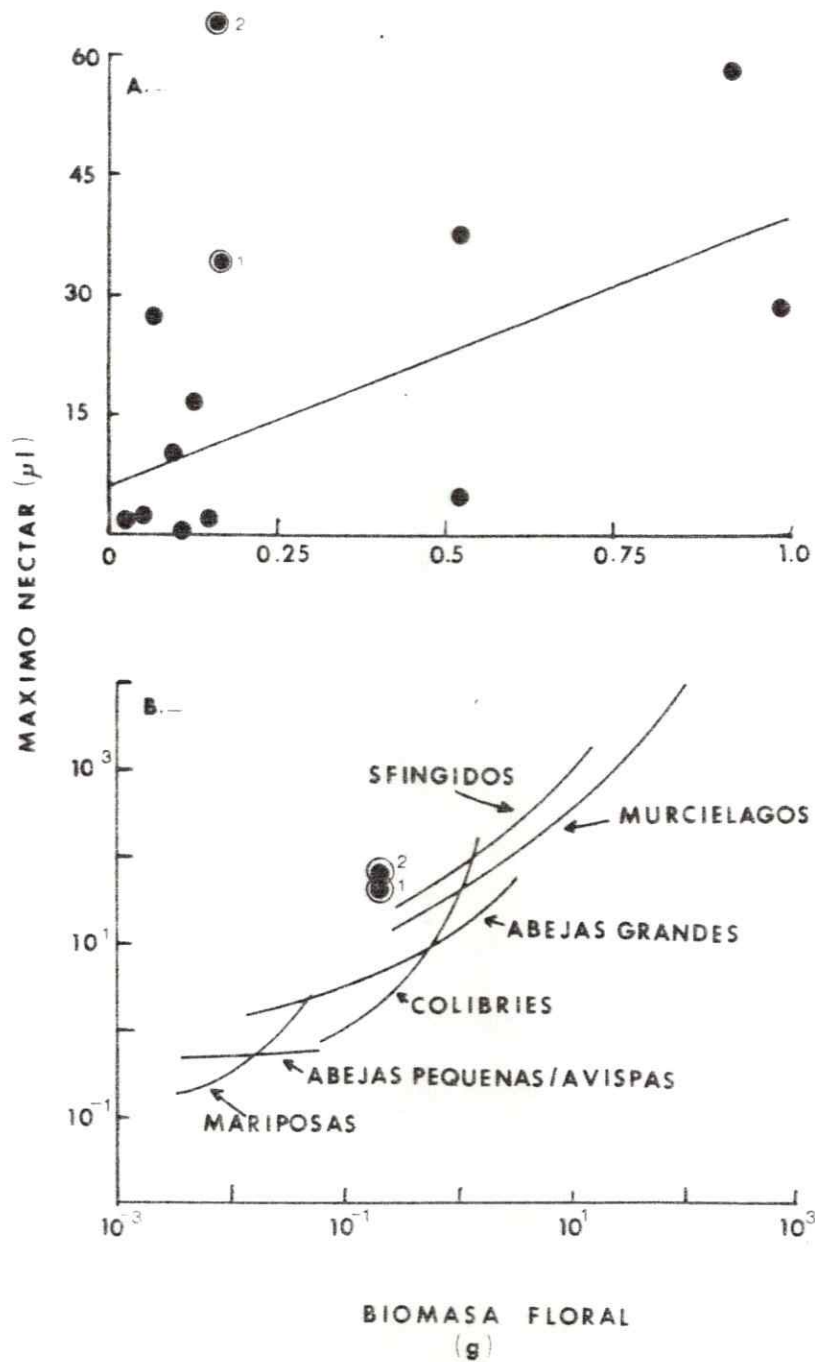
(1700-2800 m.s.n.m) (Carpenter, 1983). Los picaflorales que polinizan estas especies son de menor tamaño que Patagona gigas. El néctar disponible de E. scaber contiene más azúcares (6.32 mg) que el néctar disponible reportado por Cruden et al. (1983) para 16 especies polinizadas por picaflorales en México (2060-3110 m) (0.6-5.1 mg;  $\bar{X} = 2.19$  mg). Datos de la totalidad de néctar secretado a lo largo de la vida de una flor son escasos. Combretum farinosum (Combretaceae), polinizada por picaflorales en Costa Rica (Schemske, 1980), produce el doble del volumen de néctar que E. scaber, sin embargo el contenido de azúcares (ca. 5 mg) es muy inferior al producido en las flores de E. scaber (11.54 mg). Campsis radicans, otra especie de la familia Bignoniaceae polinizada por picaflorales produce ca. 29 mg de azúcar por flor. Las flores de esta especie, sin embargo son 3 veces mayores que las de E. scaber.

Para detectar efectos evolutivos, comparaciones de la relación entre la cantidad de néctar secretada y la biomasa floral son tal vez más útiles que las comparaciones directas de volúmenes (o azúcares). Los efectos selectivos de animales con alto requerimiento energético deberían dar como resultado relativamente más néctar considerando flores de un determinado tamaño. Opler (1983) mostró la relación entre estas variables para especies de plantas en Costa Rica, usando el "néctar máximo", o el máximo volumen de néctar secretado por una especie, después de embolsar flores, previo a la antesis (Fig. 29A; 29B). Los datos de Opler



## FIGURA 29.

A: relación entre néctar máximo (ver texto) y biomasa floral para plantas polinizadas por picaflor en Costa Rica, según Opler (1983). Ecuación de regresión  $y = 35.85x + 5.33$ ;  $r^2 = 0.45$ . B: relación entre néctar máximo y biomasa floral para plantas con distintos vectores de polinización (escala log-log), según Opler (1983). 1. Eccremocarpus saber (máximo néctar en 24 horas); 2. E. scaber (máximo néctar en la vida total de la flor).



probablemente son directamente comparables con los nuestros para néctar acumulado durante la vida de una flor, pero como Opler (1983) no explica claramente la forma de muestreo de las flores, hemos también incluido en la Fig. 29 el dato más conservador del volumen máximo de néctar secretado en un periodo de 24 h. Independientemente de cual de los dos valores sea empleado, es evidente que el nectario de E. scaber (Fig. 29A) tiene una producción de néctar por unidad de biomasa floral por encima del promedio de las especies polinizadas por picaflor. La Fig 29B muestra que E. scaber se ubica sorprendentemente cerca de especies polinizadas por murciélagos y esfíngidos (Fig. 29B). Esta tendencia es concordante con el efecto selectivo esperado de Patagona gigas en E. scaber, considerando su alta demanda energética.

El nectario en forma de disco anular en la base del ovario de Eccremocarpus scaber es similar en apariencia al de Campsis sp., otra especie de Bignoniaceae polinizada por picaflores (Elias & Gelband, 1976), y su posición es idéntica a la del nectario de Passiflora spp. perteneciente a otra familia, también polinizadas por picaflores. La ubicación similar de los nectaríos en estos casos no es sorprendente considerando que, dentro de la flor, esta posición es la más adecuada para recibir un aporte significativo de sacarosa.

Muchos de los aspectos de la anatomía y ultraestructura del nectario de Eccremocarpus scaber pueden in-

terpretarse como adaptaciones a resolver tres "problemas" evidentes en las plantas polinizadas por vectores con altos requerimientos energéticos: (a). las flores deben ofrecer volúmenes elevados de néctar, (b). debido a la naturaleza activa del proceso de secreción (Durkee, 1983) las flores deben disponer de una fuente de energía adecuada para sostener el proceso en sí, y (c). las flores en general, poseen espacio limitado para el almacenamiento de los constituyentes del néctar. Un análisis de los pocos estudios ultraestructurales del nectario indica que, el aumento en tamaño del nectario en diferentes taxa ha estado asociado con una tendencia hacia el almacenamiento de almidón previo a la etapa de secreción en plastidos cada vez más complejos. También se observa una tendencia al desarrollo de mecanismos de secreción rápidos. El almacenamiento de almidón por una parte permite la acumulación gradual de azúcares previo a la secreción, con un aprovechamiento máximo del espacio limitado del nectario. Por otra parte, los azúcares componentes del néctar y la energía necesaria para su transporte estarán asegurados independientemente del aporte directo de sacarosa del floema, lo cual podría variar con el estado fisiológico particular de la planta en los días de la floración.

En los nectarios más simples descritos (ej. Lonicera japonica (Caprifoliaceae); Rachmilevitz & Fahn, 1973), el néctar es secretado por tricomas unicelulares epidérmicos localizados en bandas angostas de 1 mm de ancho y 15 mm de

largo, ubicados en la base del tubo de la corola. En el momento de la secreción de néctar se observan abundantes vesículas derivadas del retículo endoplasmático, las que posteriormente se fusionan con el plasmalema. Se piensa que dichas vesículas reciben la sacarosa directamente del floema que se ubica en los tejidos subnectaríferos. La sacarosa llegaría hasta las células secretoras a través de los plasmodesmos (Fahn, 1979). La incorporación de sacarosa tritiada, suministrada en la base de los pedicelos de las flores, se detecta en las cisternas del retículo endoplasmático y en las vesículas que se derivan de ellas después de 20 minutos (Fahn & Rachmilevitz, 1975). Esto parece indicar que no hay un período previo de almacenamiento de azúcares en el nectario y que el azúcar secretada se derivaría directamente del flujo floemático en los mismos días de antesis. Si bien se observan amiloplastos en estos nectarios, estos son relativamente pequeños y escasos, y aparecen en el nectario sólo 2-3 días antes del inicio de la secreción (Fahn, 1979).

Un segundo nivel de complejidad es evidente en especies como Vinca rosea (Apocynaceae) y Citrus sinensis (Rutaceae) que producen cantidades moderadas de néctar (Fahn, 1979). En estas especies, las células secretoras conforman un órgano discreto, distinguiéndose una epidermis y un tejido secretor al que desembocan numerosos haces vasculares que alimentan al tejido secretor. En Vinca y Citrus, se observan abundantes vesículas provenientes del

retículo endoplasmático en las células secretoras en el período de secreción, y un desarrollo notable de espacios intercelulares. En este tipo de nectario se observa mayor desarrollo de amiloplastos, presentes desde los primeros estados de desarrollo del nectario, y que degradan progresivamente el almidón durante la secreción. Se supone que el néctar es secretado a través de estomas modificados (Rachmilevitz & Fahn, 1973) que están permanentemente abiertos durante la vida activa del nectario (Teuber et al., 1980).

En Passiflora spp. polinizadas por picaflores, se observan amiloplastos con un desarrollo aún más notorio y se caracterizan por presentar varios puntos de cristalización, degradándose al comenzar la secreción (Durkee et al., 1981). En el disco anular prominente de Eccremocarpus scaber los amiloplastos son similares a los de Passiflora, pero aún más voluminosos, encontrándose en todos los tejidos que conforman el nectario incluyendo la epidermis. Son evidentes en los nectarios previo a la antesis, desde los primeros estados de desarrollo de la flor. En Passiflora la degradación del almidón ocurre al interior del plastidio, en cambio en E. scaber se reportó por primera vez vacuolas fagocitarias en células del nectario, donde se desintegran los amiloplastos. La degradación de los amiloplastos dentro de la vacuola en E. scaber, tal vez indique una tendencia hacia una mayor especialización en cuanto a la ubicación de las enzimas hidrolíticas, otra caracterís-

tica que contribuiría a la eficiencia de la liberación del néctar. Otra característica muy interesante del nectario de E. scaber son los espacios intercelulares muy notorios que constituirían un laberinto de canales dentro del tejido secretor, probablemente facilitando el flujo rápido del néctar desde las células secretoras hacia el exterior. En el nectario de Passiflora se describió por primera vez la presencia de un material fibrilar (rodeado por una membrana), que guarda reminiscencia con la proteína-P del floema, en el parénquima asociado a los haces vasculares (Richardson, 1975). Llama la atención que material similar haya sido encontrado en el nectario de Eccremocarpus scaber, aunque en este caso no esté rodeado por membranas y las unidades fibrilares se observen más densas y más gruesas. (La ausencia de una membrana no es un artefacto de técnica ya que las membranas de otros organelos están intactas en las preparaciones). La función del material fibrilar es desconocido en ambas especies, pero evidentemente constituye otra caso de convergencia al nivel de ultraestructura entre dos especies polinizadas por vectores similares. En síntesis la estructura del nectario de E. scaber permite la acumulación de los componentes del prenéctar, lo que facilita la secreción rápida de néctar.

Aunque hemos detectado relaciones nítidas entre la cantidad de azúcar secretada y la estructura del nectario de Eccremocarpus scaber con los hábitos de sus polinizadores, la situación es más compleja al considerar la compo-

sición y concentración del néctar. Del análisis de un alto número de especies con diferentes polinizadores se ha establecido que hay relaciones evidentes entre las proporciones relativas de los azúcares del néctar y los vectores de polinización (Baker & Baker, 1983), a pesar de que el valor energético es igual para todos estos azúcares. En el néctar de especies polinizadas por paserinas y murciélagos, predominan las hexosas, determinando para estas especies valores bajos de la relación S/F+G (Lammers & Freeman, 1986). Por el contrario, el néctar de plantas polinizadas por picaflores, abejas de lengua larga, polillas y mariposas, es predominantemente rico en sacarosa (Lammers & Freeman, 1986), de modo que los valores de la relación S/F+G son altos. El néctar de especies polinizadas por dípteros y abejas con lengua corta es intermedio en cuanto a la proporción relativa de los dos tipos de azúcares. Los néctares más concentrados se encuentran entre las especies polinizadas por abejas (35%) y lepidópteros (25%) (Heyneman, 1983). Al otro extremo, y a pesar de sus altos requerimientos energéticos, el néctar de las plantas polinizadas por picaflores (23%) y murciélagos (17%), es normalmente más diluido (Pyke & Waser, 1981; Heyneman, 1983) Baker & Baker (1983) sugieren que el sabor del néctar determina las preferencias particulares de los polinizadores, como también su capacidad de ingerirlo. Hainsworth & Wolf (1976) han mostrado, por ejemplo, que los picaflores seleccionan néctar de acuerdo con el siguiente orden:

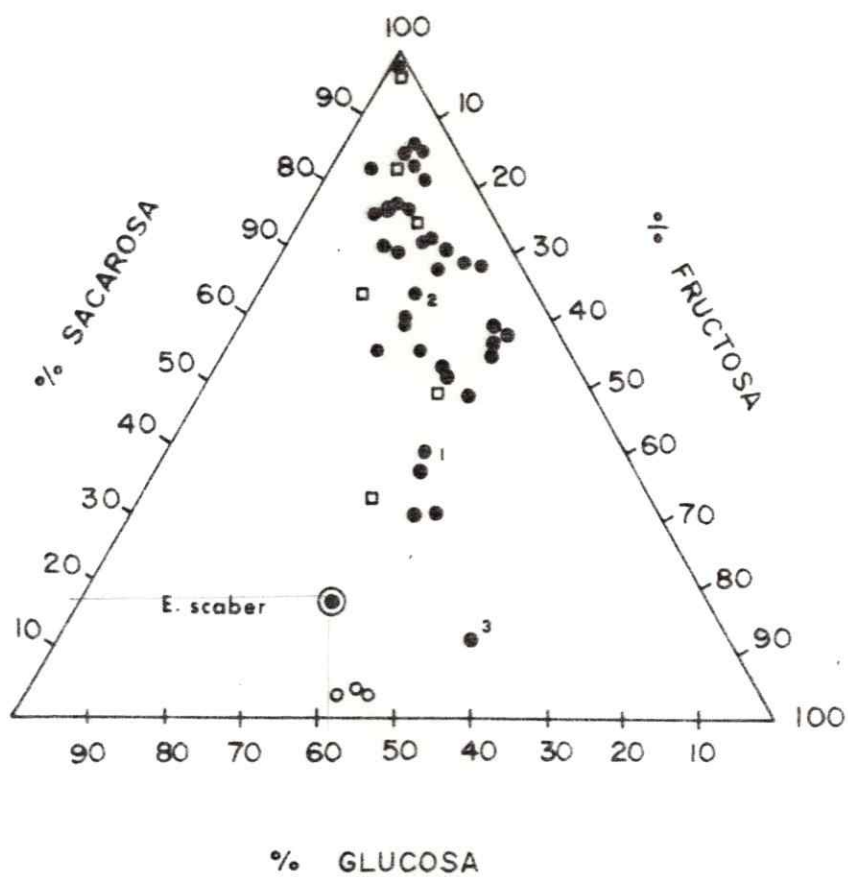


SFG = SF > S > FG > SG > F > G.

El néctar de Eccremocarpus scaber contiene dos monosacáridos, fructosa y glucosa y dos disacáridos, sacarosa y maltosa. Tanto los monosacáridos como los disacáridos se encuentran en proporciones similares entre sí. La concentración del néctar fresco secretado en las horas del día (período de máxima secreción) (26%) es similar al promedio conocido para otras especies de picaflores (Heyneman, 1983). Sin embargo, la composición de azúcares es atípica respecto a otras especies polinizadas por picaflores y se acerca más bien a la de las especies polinizadas por paserinas (Fig. 30). Es posible que esta última tendencia refleje las probables transformaciones que sufriría la sacarosa proveniente del floema, en especies que almacenan almidón, antes del momento de la secreción de néctar. En los nectarios primitivos no especializados de las angiospermas, el néctar habría derivado directamente del flujo floemático, tal como se observa actualmente en especies como Lonicera japonica. Percival (1962) ha mostrado que el néctar de los grupos basales de las principales líneas evolutivas de las angiospermas contiene una alta proporción de sacarosa, en contraste con los grupos terminales que presentan mayores proporciones de glucosa y fructosa. En nectarios que almacenan almidón, la sacarosa debe ser hidrolizada por invertasas en glucosa y fructosa, previo a la

## FIGURA 30.-

Diagrama ternario que sitúa especies según la proporción relativa de sacarosa, fructosa y glucosa del néctar. La maltosa se consideró como glucosa potencial. ● especies polinizadas por picaflor (datos tomados de Baker & Baker, 1983; Heyneman, 1983; Freeman et al., 1984); □ especies polinizadas por himenópteros (datos tomados de Southwick et al., 1981); ○ especies con el síndrome de polinización por paserinas (Meliphagidae) (datos tomados de Lammers & Freeman, 1986); ⊙ Eccremocarpus scaber; 1, 2 y 3, otras especies de la familia Bignoniaceae, polinizadas por picaflor.



formación de almidón. Los productos de la hidrólisis del almidón, que ocurre en el momento de la secreción, serían maltosa y glucosa. La presencia de maltosa en el néctar de E. scaber es consistente con esta hipótesis. Si estas vías metabólicas se diesen, con la progresiva incorporación del almidón al nectario, la sacarosa estaría proporcionalmente cada vez menos representada en el néctar. Esta misma hipótesis no sólo permite explicar porqué la composición del néctar de E. scaber es aberrante con respecto a otras especies polinizadas por picaflores sino también, porqué en general el néctar de las especies polinizadas por animales de gran tamaño corporal, como los murciélagos y passerinas es más rico en hexosas que el de especies polinizadas por animales de menor tamaño (Baker & Baker, 1983); en las especies con néctar rico en hexosas, se esperaría que la proporción del néctar derivado directamente de la degradación del almidón versus el flujo floemático sea cada vez mayor. La situación real, indudablemente, es mas compleja. El nectario de Passiflora con abundantes amiloplastos, produce néctar con predominio de sacarosa, algo de fructosa, pero carece de glucosa (Durkee et al. 1981). La ausencia de glucosa ha sido explicada como el resultado de la resíntesis de sacarosa a partir de la glucosa, producto de la degradación del almidón, en combinación con la fructosa proveniente de la hidrólisis original de la sacarosa del floema, o por la transformación de glucosa en fructosa (Durkee et al., 1981). La resíntesis de sacarosa, podría estar in-

dicando que los animales en algunos casos estarían seleccionando flores con néctar rico en sacarosa, como proponen Baker & Baker (1983). Las vías biosintéticas postuladas en Passiflora enfatizan que las transformaciones sufridas por la sacarosa en el néctar pueden ser muy complejas; en este momento cualquier generalización sobre los factores que determinan la composición del néctar, obviamente es prematura.

En Eccremocarpus scaber, no se obtuvo evidencia de un patrón bimodal de visitas como, se ha observado en otras especies polinizadas por nectarívoros (Stiles & Wolf, 1970; Stiles, 1973; Carpenter & MacMillen, 1976; Gass, 1978 Carpenter, 1983). Tampoco hubo evidencias de un patrón bimodal de secreción de néctar, y por último no hubo una clara relación entre los patrones de visita y los de secreción de néctar. En el lugar de estudio hubo tres máximos de visita, siendo el mayor en las horas de la tarde. La secreción de néctar fue mayor en el día que en la noche, y relativamente uniforme en los dos periodos del día considerados en conjunto. Es interesante preguntarse porqué no se observa acoplamiento entre los tres máximos de visitas y el patrón de secreción de néctar. Considerando el bajo número de flores visitadas por día en una localidad, para poder visitar los números de flores estimados como necesarios para mantener un balance energético positivo, cada individuo de Patagona gigas y de Sephanoides galeritus debería visitar diariamente numerosas localidades independientes de la po-

blación de E. scaber. Si tales puntos son visitados secuencialmente a lo largo de un circuito establecido, es muy probable que haya desplazamiento temporal entre los máximos períodos de visita entre diferentes puntos en la población. La presión selectiva de las aves sobre una población de E. scaber, debería ser, por lo tanto, espacialmente variable. Por otra parte, considerando que las aves son migratorias, el horario preciso de visita para cada punto de la población de E. scaber probablemente cambie de año en año. Las presiones selectivas que ejercen los picaflores en cuanto al horario de secreción de néctar en E. scaber también deberían ser temporalmente variables. Estas variaciones posiblemente expliquen la falta de relación estrecha entre el patrón de visitas y el patrón diario de secreción de néctar en E. scaber. Los cambios de concentración del néctar secretado entre el día y la noche en E. scaber tal vez estarían indicando que la secreción de néctar en esta especie guarda una relación más estrecha con factores abióticos del ambiente que con factores bióticos. Los montos elevados de agua del néctar de Eccremocarpus scaber en las horas del día cuando la humedad relativa es más baja, sugiere que por lo menos la secreción de agua en esta especie, estaría controlada principalmente por el flujo de transpiración (se desconocen los factores que controlan fisiológicamente la secreción de los azúcares del néctar - Durkee, 1983). Una prueba simple de esta hipótesis sería comparar los patrones de secreción de néctar bajo condi-

ciones experimentales variando controladamente la humedad relativa y la temperatura.

En conclusión, este estudio ha mostrado que las características generales de secreción de néctar en Eccremocarpus scaber son altamente consistentes con las predicciones generadas en torno a los requerimientos energéticos de sus polinizadores. En cambio, los patrones de visita de los picaflores y el horario de secreción de E. scaber sólo se acoplan levemente, como se desprende de la menor secreción de néctar en la noche cuando los picaflores están inactivos.

Tal vez uno de los aspectos mas relevantes de este estudio es nuestra demostración de que la selección de una producción de cantidades elevadas de néctar se asocia con cambios internos en el nectario, que a su vez pueden influir directamente en la composición del néctar mismo. Igualmente interesante, es la conclusión que el nectario es un órgano evolutivamente muy dinámico, cuyo rol se ha diversificado desde uno meramente secretor a uno de funciones duales, cuales son almacenamiento y secreción. Para llegar a una esquema más completo de la evolución sufrida por el nectario en las angiospermas, se requieren estudios integrales de las características de secreción de néctar de plantas polinizadas por organismos cuyos requerimientos energéticos son aún más altos que los de los polinizadores de E. scaber. Cualquier estudio futuro de los nectarios deberían complementarse con investigaciones más acuciosas de

los cambios bioquímicos que sufre la sacarosa proveniente del floema en su paso por el nectario hasta el momento de la secreción.



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.-

- Arroyo, M.T. Kalin. 1976a. The systematics of the legume genus Harpalyce (Leguminosae: Lotoideae). Mem. N.Y. Bot. Garden 26: 1-80.
- Arroyo, M.T. Kalin. 1976b. Geitonogamy in animal-pollinated tropical angiosperms: a stimulus for the evolution of self-incompatibility in the angiosperms. Taxon 25: 15-20.
- Arroyo, M.T. Kalin; R. Primack; J. Armesto. 1982. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. Am. J. Bot. 69: 82-97.
- Arroyo, M.T. Kalin, J. Armesto & R. Primack. 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate andes of central Chile. II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. Pl. Syst. Evol. 149: 187-203.
- Baker, H. & I. Baker. 1980. Studies of nectar constituents and pollinator plant coevolution. En: L. Gilbert & P. Raven (eds.), Coevolution of Animals and Plants. University of Texas Press, Austin, pp. 100-140.
- Baker, H. & I. Baker. 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. En: E. Jones y J. Little (eds.). Handbook of Experimental Pollination Biology. Scientific and Academic Editions, New York, pp. 117-141.
- Barros, R. 1952. Nuestros picaflores del genero Sephanoides. Leido en la sesion del 26 de Octubre de 1952 de la Academia Chilena de Ciencias Naturales.
- Bertin, R. 1982. Floral biology, hummingbird pollination and fruit production of trumpet creeper (Campsis radicans, Bignoniaceae). Amer. J. Bot. 69: 122-134.
- Brown, H., W. Calder & A. Kodric-Brown. 1978. Correlates and consequences of body size in nectar feeding birds. Am. Zool. 18: 687-700.
- Cardemil, L & M. Jordan. 1982. Light and electron microscopic study of in vitro cultured female gametophyte of Araucaria araucana (Mol.) Koch. Z. Pflanzenphysiol.

Bd. 107: 329-339.

- Carpenter, L. 1974. Torpor in an Andean hummingbird. *Science* 183: 545-547.
- Carpenter, L. 1976. Ecology and Evolution of an Andean Hummingbird (Oreotrochilus estella). University of California Press, Berkeley.
- Carpenter, L. 1983. Pollination energetics in avian communities: simple concepts and complex realities. En: E. Jones & J. Little (eds.), Handbook of Experimental Pollination Biology. Scientific and Academic Editions, New York, pp. 215-234.
- Carpenter, L. & R. MacMillen. 1976. Energetic cost of feeding territories in an hawaiian honey-creeper. *Oecologia* 26: 213-223.
- Contreras, J. 1978. Biota centro-andina. VII. Comentarios acerca de las razas del picaflor gigante Patagona gigas en las provincias de Mendoza y San Juan (Aves: Trochilidae). *Neotropica* 24: 47-49.
- Crepet, W. 1984. Advanced (constant) insect pollination mechanisms: pattern of evolution and implications vis-a-vis Angiosperm diversity. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 71(2):607-630.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.
- Cruden, R. 1972. Pollination in high elevation ecosystems: relative effectiveness of birds and bees. *Science* 176: 1439-1440.
- Cruden, R., S. Hermann & S. Peterson. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. En: B. Bentley & T. Elias (eds.), The Biology of Nectaries. Columbia University Press, New York, pp. 223-241.
- Dengler, N., R. Dengler & P. Hattersley. 1986. Comparative bundle sheath and mesophyll differentiation in the leaves of the C4 grasses Panicum effusum and P. bulbosum. *Amer. J. Bot.* 73: 1431-1442.
- Durkee, L., D. Gaal & H. Reisner. 1981. The floral and extra-floral nectaries of Passiflora. I. The floral nectary. *Amer. J. Bot.* 68: 453-462.
- Durkee, L. 1983. The ultrastructure of floral and extra-floral nectaries. En: B. Bentley & T. Elias (eds.),

The Biology of Nectaries. Columbia University Press, New York, pp. 1-26.

- Ehrlich, P. & P. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Elias, T. & H. Gelband. 1976. Morphology and anatomy of floral and extra-floral nectaries in Campsis (Bignoniaceae). *Amer. J. Bot.* 63: 1349-1353.
- Faegri, R. & L. van der Pijl. 1971. The Principles of Pollination Ecology. Pergamon Press, New York.
- Fahn, A. 1979. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *Am. J. Bot.* 66: 977-985.
- Fahn, A. 1979a. Secretory Tissues in Plants. Academic Press, London.
- Fahn, A. & L. Benouaiche. 1979. Ultrastructure of the nectary of Musa paradisiaca var. sapientum Kuntze and its relation to nectar secretion. *Ann. Bot.* 44: 85-93.
- Fahn, A. & T. Rachmilevitz. 1970. Ultrastructure and nectar secretion in Lonicera japonica. En: N. Robson, D. Cutler & M. Gregory (eds.), *New Research in Plant Anatomy. Suppl. J. Linn. Soc.*, Academic Press, London, pp. 51-56.
- Fahn, A. & T. Rachmilevitz. 1975. An autoradiographical study of nectar secretion in Lonicera japonica Thunb. *Ann. Bot.* 39: 975-976.
- Feinsinger, P. 1983. Coevolution and pollination. En: D. Futuyma & M. Slatkin (eds.), *Coevolution*. Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 282-310.
- Figier, J. 1968. Localisation infrastructurales de la phosphomonoesterase acide dans la stipule de Vicia faba L. au niveau du nectarie. *Planta* 83: 60-79.
- Findlay, N. & F. Mercer. 1971. Nectar production in Abutilon. II Submicroscopic structure of the nectary. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 657-664.
- Fox, L. 1981. Defense and dynamics in plant-herbivore systems. *Amer. Zool.* 21: 853-864.
- Freeman, E., W. Reid, J. Becvar & R. Scogin. 1984. Similarity and apparent convergence in the nectar sugar composition of some hummingbird pollinated flowers. *Bot. Gaz.* 145: 132-135.

- Gass, C. 1978. Rufous hummingbird feeding territoriality in a suboptimal habitat. *Can. J. Zool.* 56: 1535-1539.
- Gentry, A. 1974. Coevolutionary patterns in Central American Bignoniaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 61: 728-759.
- Gentry, A. 1980. Bignoniaceae. Part. I (Crescentieae and Tourrettieae). *Fl. Neotropica Monogr.* 25.
- Gentry, A & S. Tomb. 1979. Taxonomic implications of Bignoniaceae palynology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66: 756-777.
- Gilbert, L. & P. Raven. 1975. *Coevolution of Animals and Plants.* University of Texas Press, Austin.
- Goodall, J., A. Johnson, R. Philippi. 1946. *Las Aves de Chile. Su conocimiento y sus costumbres.* Platt Establecimientos Graficos, S.A., Buenos Aires.
- Grant, K. & V. Grant. 1968. *Hummingbirds and their flowers.* Columbia University Press, New York.
- Gunning, B. & J. Pate. 1969. Transfer cells-plant cell with wall ingrowths, specialized in relation to short transport of solutes - their occurrence, structure and development. *Protoplasma* 68: 107-133.
- Hainsworth, P. 1981. Energy regulation in hummingbirds. *American Scientific* 69: 420-429.
- Hainsworth, F. & L. Wolf. 1976. Nectar characteristics and food selection by hummingbirds. *Oecologia (Berlin)*: 25: 101-113.
- Heinrich, B & Pantle. 1975. Thermoregulation in small flies (*Syrphus* sp.) basking and shivering. *J. Exp. Biol.* 62: 599-610.
- Heinrich, B. 1979. *Bumblebee Economics.* Harvard University Press. Cambridge.
- Herrera, C. 1982. Seasonal variation in the quality of fruits and diffuse coevolution between plants and avian dispersers. *Ecology* 63(3): 773-787.
- Herbst, P. 1921. Beitrage zur Biologie des Bombus dahlbomi Guér. *Archiv für Bienenkunde* III: 115-B.
- Heyneman, A. 1983. Optimal sugar concentrations of floral nectars dependence on sugar intake efficiency and foraging costs. *Oecologia (Berlin)* 60: 198-213.

- Hickman, J. 1974. Pollination by ants: a low-energy system. *Science* 184: 1290-1292.
- Hunziker, A. 1984. Los géneros de fanerógamas de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 23: 1-389.
- Janzen, D. 1980. When is it coevolution? *Evolution* 34: 611-612.
- Joseph, C. 1926. Les mellifères du Chili. *Ann. Sc. Nat.* 58-60.
- Kruger, K., R. Prinzinger & K. Schuchmann. 1982. Torpor and metabolism in hummingbirds. *Biochem. Physiol.* 73A: 679-689.
- Lammers, Th. & E. Freeman. 1986. Ornithophily among the hawaiian Lobelioideae (Campanulaceae): evidence from floral nectar sugar compositions. *Am. J. Bot.* 73: 1613-1619.
- Lüttge, V. 1977. Nectar composition and membrane transport of sugar and aminoacids: a review on the present state of nectar research. *Apidologie* 8: 305-320.
- Lüttge, V. & E. Schnepf. 1976. Elimination processes by glands: organic substances. *En: V. Lüttge & M. Pitman (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Transport in Plants, Springer-Verlag, Berlin.*
- MacNab, B. 1983. Energetics, body size, and the limits to endothermy. *J. Zool. Lond.* 199: 1-29.
- Montealegre, A. 1931. *Biología de insectos chilenos.* *Rev. Ch. Hist. Nat.* 165-172.
- Montenegro, G; F. Riveros & C. Alcalde. 1980. *Flora* 170: 554-564.
- Mooney, H; J. Kummerov; A. Johnson; D. Parsons; S. Keeley; A. Hofmann; R. Hays; J. Giliberts & C. Chu. 1977. The producers - Their resources and adaptive responses. *En: H. Mooney (ed.), Convergent Evolution in Chile and California.* Dowden, Hutchinson & Ross, Penn.
- Navas, L. 1979. *Flora de la Cuenca de Santiago de Chile.* Ed. U. de Chile, Santiago.
- Opler, P. 1983. Nectar production in a tropical ecosystem. *En: B. Bentley & Th. Elias (eds.), The Biology of Nectaries.* Columbia University Press, New York.

- Ortiz-Crespo, F. 1974. The giant hummingbird Patagona gigas in Ecuador. *Ibis* 116: 347-359.
- Pearson, O. 1954. The daily energy requirements of a wild Anna hummingbird. *Condor* 56: 317-322.
- Percival, M. 1962. Types of nectars in Angiosperms. *New Phytol.* 46: 142-173.
- Primack, R. 1985. Patterns of flowering phenology in communities, populations, individuals, and single flowers. *En*: W. Junk Publishers. *The Population Structure of Vegetation*. Dordrecht, pp. 571-593.
- Pyke, G. & N. Waser. 1981. The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. *Biotropica* 13: 260-270.
- Rachmilevitz, T. & A. Fahn. 1973. Ultrastructure of nectaries of Vinca rosea L. Vinca major L. and Citrus sinensis Osbeck ov. Valencia and its relation to the mechanism of nectar secretion. *Ann. Bot.* 37: 1-9.
- Rachmilevitz, T & A. Fahn. 1975. The floral nectary of Tropaeolum majus L. The nature of the secretory cells and the manner of nectar secretion. *Ann. Bot.* 39: 721-734.
- Richardson, M. 1975. *Translocation in Plants*. The Camelot Press Ltd., Southampton.
- Roughgarden, J. 1983. The theory of coevolution. *En*: D. Futuyma & M. Slatkin (eds.), *Coevolution*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Schemske, D. 1980. Floral ecology and hummingbird pollination of Combretum farinosum in Costa Rica. *Biotropica* 12: 169-181.
- Schnepf, E. 1964. Zur Cytologie und Physiologie pflanzlicher Drüsen. 5. Teil: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cyathalnektarien von Euphorbia pulcherrima in verschiedenen Funktionszuständen. *Protoplasma* (Wien) 58: 193-219.
- Simpson, B. & J. Neff. 1983. Evolution and diversity of flower rewards. *En*: E. Jones & J. Little (eds.), *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Scientific and Academic Editions, New York, pp. 142-159.
- Smith, C. 1975. The coevolution of plants and seed predators. *En*: E. Gilbert & P. Raven (eds.), *Coevolution of Animals and Plants*. University of Texas Press, Austin.

- Sokal, R. & J. Rohlf. 1981. Biometry. W.H. Freeman & Co., New York.
- Southwick, E; G. Loper & S. Sadwick. 1981. Nectar production, composition, energetics and pollinator attractiveness in spring flowers of western New York. Amer. J. Bot. 68: 994-1002.
- Stiles, F. 1973. Food Supply and the Annual Cycle of the Anna Hummingbird. Univ. Calif. Publ. Zool. 97.
- Stiles, F; L. Wolf. 1970. Hummingbird territoriality at a tropical flowering tree. Auk 87: 467-491.
- Teuber, L., M. Albertsen, D. Barnes & G. Heichel. 1980. Structure of floral nectaries of alfalfa (Medicago sativa L.) in relation to nectar production. Amer. J. Bot. 67: 433-439.
- Uslar, P. 1982. Sistemas de Reproducción en Plantas. Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias. Universidad de Chile, Santiago.
- Waser, N. 1983. The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. En: L. Real (ed.), Pollination Biology, Academic Press, New York, pp. 242-277.
- Walker, J. 1976. Evolutionary significance of the exine in the pollen of primitive Angiosperms. En: I. Ferguson & J. Muller (eds.), The Evolutionary Significance of the Exine, Academic Press, London.
- Wergin, W., C. Elmore, B. Hanny & B. Ingber. 1975. Ultrastructure of the subglandular cells from the foliar nectaries of cotton in relation to the distribution of plasmodesmata and the symplastic transport of nectar. Amer. J. Bot. 62: 842-849.
- Wolf, L. & F. Gill. 1986. Physiological and ecological adaptations of high montane sunbirds and hummingbirds. En: F. Vuilleumier & M. Monasterio (eds.), High Altitude Tropical Biogeography, Oxford University Press, New York, pp. 103-119.