

**IMPORTANCIA DE LA GUIA DE NECTAR EN LA INTERACCION ENTRE  
HERBIVORIA FLORAL Y POLINIZACION EN *Mimulus luteus*.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

por

Nélida Beatriz Mercedes Pohl Pohl

Agosto, 2003

Director de tesis: Dr. Rodrigo Medel Contreras

Co-Director: Dr. Jorge Mpodozis Marín

**IMPORTANCIA DE LA GUIA DE NECTAR EN LA INTERACCION ENTRE  
HERBIVORIA FLORAL Y POLINIZACION EN *Mimulus luteus*.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

por

Nélida Beatriz Mercedes Pohl Pohl

Agosto, 2003

Director de tesis: Dr. Rodrigo Medel Contreras

Co-Director: Dr. Jorge Mpodozis Marín

*A Mercedes*

## AGRADECIMIENTOS

Por su comprensión y apoyo permanente, agradezco enormemente a mis tutores, Dr. Rodrigo Medel y Dr. Jorge Mpodozis.

A los miembros de la comisión examinadora, Dr. Mary Kalin-Arroyo y Dr. Rodrigo Vásquez por sus valiosas intervenciones y sugerencias aportadas.

Por sus sugerencias, tiempo, disposición y materiales, agradezco al Dr. Adrián Palacios, Dr. Pablo Sabat y al Dr. Michel Sallaberry.

Agradezco especialmente a Gastón Carvallo por su ayuda invaluable tanto en el trabajo de terreno como de laboratorio.

Por la colaboración brindada en terreno y en laboratorio agradezco a Solano Henríquez, Andrés Sazo, Gonzalo Herrera, Juan Armesto, Sebastián Armesto, Iván Díaz, Camila Arredondo, Ximena Morales y Fanny Venegas.

Gracias a mis compañeros y profesores por sus sugerencias y apoyo.

Finalmente, quisiera agradecer a mi madre, a mi tío, a Juan, y a todos mis amigos, cuyo cariño incondicional hizo posible la realización de este trabajo.

Esta tesis fue posible gracias al financiamiento otorgado por: Proyecto FONDECYT 1010660; TNAC 160201 (DID, Universidad de Chile); Beca Centro Milenio de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad Proyecto P99-103 FICM; Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile, Beca PG/55/02.

**INDICE DE MATERIAS**

<b>PAGINAS PRELIMINARES</b>	<b>PAGINA</b>
Página de título	<b>i</b>
Informe de aprobación	
Dedicatoria	<b>ii</b>
Agradecimientos	<b>iii</b>
Indice de materias	<b>iv</b>
Lista de tablas	<b>vi</b>
Lista de figuras	<b>vii</b>
Resumen	<b>viii</b>
Abstract	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES DE HISTORIA DE VIDA</b>	<b>6</b>
<b>HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>

MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS	17
CONCLUSIONES	32
DISCUSIÓN	33
BIBLIOGRAFIA	41

**LISTA DE TABLAS**

	<b>PAGINA</b>
Tabla 1: Número de cápsulas que forman fruto según tratamiento de cruce aplicado	<b>21</b>
Tabla 2: Análisis de varianza del efecto del los tratamientos aplicados y su interacción sobre el número de semillas producidas	<b>26</b>

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1:</b> Fenotipos florales de <i>M. luteus</i> .	<b>9</b>
<b>Figura 2:</b> a) y b) Mallas de exclusión de picaflores. c) Perforación artificial del pétalo de aterrizaje de <i>M. luteus</i> .	<b>15</b>
<b>Figura 3:</b> Tasa de visita de insectos y picaflores a lo largo del día	<b>18</b>
<b>Figura 4:</b> Dinámica de secreción de néctar tras vaciado.	<b>19</b>
<b>Figura 5:</b> Promedio del número de semillas producidas por flor según tratamiento de cruce.	<b>22</b>
<b>Figura 6:</b> Efecto de la localización de la herbivoría natural sobre la producción promedio de semillas por flor.	<b>24</b>
<b>Figura 7:</b> Relación entre el daño artificial y la exclusión de picaflores sobre la producción promedio de semillas por flor en <i>Mimulus luteus</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 8:</b> Promedio del logaritmo de las sensibilidades espectrales registradas a diferentes longitudes de onda mediante electro-retinografía de <i>O. leucopleurus</i> .	<b>29</b>
<b>Figura 9:</b> Porcentaje de reflectancia de distintas zonas de la corola de <i>M. luteus</i> .	<b>31</b>

## RESUMEN

*Mimulus luteus* es una planta herbácea cuyas flores son visitadas por insectos y por el picaflor cordillerano, *Oreotrochilus leucopleurus*. Presenta una guía de néctar que puede ser blanco de herbivoría floral. En el presente trabajo se analiza la relación entre herbivoría de señales y polinización en *M. luteus*, relación que no ha sido abordada en los escasos estudios que asocian herbivoría y polinización, y sus efectos sobre los caracteres vegetales.

Una serie de cruzamientos experimentales demostraron que *M. luteus* requiere un vector de polen para asegurar su reproducción. La herbivoría natural sobre la guía de néctar disminuyó la producción de semillas de *M. luteus*. Al evaluar la producción de semillas en un experimento factorial de 2 X 2 con exclusión de picaflores y daño artificial como factores principales, se observó que el efecto del daño es contingente a la presencia de los picaflores. Las flores dañadas artificialmente y que no excluyen a los picaflores presentaron una menor producción de semillas, lo que indica que tales visitantes florales discriminan negativamente las flores con la guía de néctar dañada. Se sugiere que esta discriminación se debería a una preferencia aprendida por los fenotipos florales de mayor tamaño de guía de néctar, señal que los picaflores asociarían a una mayor recompensa.

Se concluye que la guía de néctar afecta no sólo la polinización de *M. luteus*, sino también la interacción entre herbivoría floral y polinización, a través de su efecto sobre la atracción al polinizador *O. leucopleurus*.

## ABSTRACT

*Mimulus luteus* is an herbaceous plant whose flowers are visited by insects and by the Andean Hillstar hummingbird, *Oreotrochilus leucopleurus*. Its flowers have a nectar guide in the lower petal that may be affected by floral herbivory. This work deals with the relationship between nectar guide herbivory and pollination in *M. luteus*. This approach has not been previously undertaken in the literature on herbivory x pollination interactions.

Experimental crossings reveal that *M. luteus* needs a pollen vector in order to achieve successful reproduction. Flowers with herbivorized nectar guides decreased seed production in comparison to intact flowers. Results from a 2 x 2 factorial experiment, with hummingbird exclusion and artificial nectar guide damage as main factors, revealed that the effect of damage on seed production was contingent to the presence of hummingbirds. Damaged flowers had a lower seed production in the presence than in the absence of hummingbirds. This result indicates that hummingbirds discriminate against flowers with damaged nectar guides. I suggest that learning processes may be involved in hummingbird discrimination. In conclusion, nectar guides affect not only *M. luteus* pollination, but also the interaction between floral herbivory and pollination through behavioral discrimination of the hummingbird *O. leucopleurus*.

## INTRODUCCION

Numerosos estudios han explorado la relación entre herbivoría y sus efectos directos sobre los caracteres reproductivos de la planta, tanto femeninos (producción de semillas, Crawley 1985; número y tamaño de los óvulos, Frazee y Marquis 1994) como masculinos (largo de la antera, Frazee y Marquis 1994; número de flores estaminadas y número de granos de polen, Quesada y col. 1995; tasa de crecimiento del tubo polínico, Mutikainen y Delph 1996; número y tamaño de los granos de polen, Lehtilä y Strauss 1999), pero pocos han tomado en cuenta los efectos que la herbivoría floral produce de manera indirecta sobre el éxito reproductivo de la planta, a través de cambios en los caracteres responsables de atraer a los polinizadores (Strauss 1997). El estudio de la adecuación biológica de las plantas comúnmente ha involucrado el efecto de los polinizadores como principales responsables de la evolución de los caracteres florales (Brody 1997), en tanto que el rol de organismos tales como herbívoros florales ha sido históricamente poco estudiado a pesar de la elevada incidencia de la herbivoría sobre una amplia diversidad de especies vegetales (Crawley 1983). El estudio conjunto de las plantas y los distintos animales que interactúan con ellas permitiría un acercamiento más preciso a los factores que determinan la adecuación biológica de las especies involucradas (Schemske y Horvitz 1988).

## **Herbivoría y polinización en la literatura**

Un número reducido de estudios han abordado la interacción existente entre polinización y herbivoría (Augspruger 1981, Herrera 1993, Juergen y Bergelson 1997). Es así como Heithaus y colaboradores (1982) describen el efecto conjunto de los polinizadores y diversos tipos de herbívoros sobre la producción de semillas de la leguminosa *Bauhinia unguolata*, encontrando que ambos grupos de animales afectan significativamente la producción de semillas de la planta. Por su parte Cunningham (1995) encontró que las flores de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* visitadas por herbívoros no presentaban visitas posteriores de polinizadores, lo que determinaba una producción de semillas muy reducida. Además, dado que los herbívoros eran atraídos por caracteres florales diferentes a aquellos que atraían a los polinizadores, ambos tipos de animales representarían presiones selectivas diferentes sobre los caracteres florales. Herrera (2000) describe una interacción significativa entre los efectos que herbívoros y polinizadores ejercen sobre la producción de semillas de la hierba *Paeonia broteroi*, registrándose una relación positiva entre ambos fenómenos, debido a que los mamíferos herbívoros se alimentaban preferentemente de los frutos provenientes de flores polinizadas, los cuales son de mayor tamaño que aquellos de flores no fecundadas, por lo que la oportunidad de selección de caracteres florales mediada por polinizadores sería secundaria y dependería de la oportunidad de selección mediada por los herbívoros de frutos.

Estos estudios describen efectos sobre los caracteres vegetales que no se habrían podido encontrar mediante el análisis parcializado de la polinización .

## **Efectos de la herbivoría sobre la atracción a polinizadores**

Mutikainen y Delph, en su revisión del año 1996 sugieren que la herbivoría afectaría el número de flores producidas (Karban y Strauss 1993, Quezada y col. 1995), el tamaño de la corola (Karban y Strauss 1993, Strauss y Conner 1996, Lehtila y Strauss 1999) la calidad y cantidad de néctar y la época de floración (Frazee y Marquis 1994), todos caracteres asociados a la atractividad y recompensa que ofrece la planta a sus potenciales polinizadores (Strauss 1997). De esta manera, en reiteradas ocasiones se ha descrito una relación significativa entre el número de flores abiertas y la tasa de visita de polinizadores. Así por ejemplo, Willson y Price (1977) demuestran que las inflorescencias de *Asclepias syriaca* con mayor número de flores, atraen mayormente a sus insectos polinizadores, resultando en una mayor remoción de polinios, un resultado similar al reportado en los estudios de Heithaus y col. (1982), Geber (1985), Rodríguez-Robles y col. (1992), Cunningham (1995) y Conner y Rush (1996). Por su parte Brody (1997) no encuentra una relación entre el número de flores abiertas disponibles y la tasa de visita de polinizadores sobre flores de *Polemonium foliosissimum* e *Ipomopsis aggregata*. También se ha reportado una relación positiva entre tamaño de la corola y tasa de visita de polinizadores, así es como Stanton y Preston (1988) demuestran que a mayor tamaño de corola de *Raphanus sativus* existe una mayor tasa de visita de polinizadores, al igual que en *Raphanus raphanistrum* (Conner y Rush 1996). También se ha encontrado una correlación genética entre el tamaño de la corola y la producción de polen (Stanton y col. 1991) lo que podría significar una mayor tasa de visita en especies vegetales en las que la principal recompensa floral recolectada sea el polen.

Karban y Strauss (1993) encuentran por su parte que las flores herbivorizadas de *Erigeron glaucus* presentan menores tasas de visita que aquellas que permanecen intactas, en tanto que la herbivoría artificial ("clipping") aplicada en el trabajo de Juergen y Bergelson (1997) desencadena el atraso de la floración, la alteración de la arquitectura de la planta y la disminución de la producción de semillas en *Ipomopsis aggregata*, efectos atribuidos a una reducida tasa de visita de polinizadores. Tales efectos pudieron deberse a una menor atractividad de la planta como consecuencia del cambio en su forma, o a un desfase temporal con el pico de abundancia de los polinizadores efectivos como consecuencia del atraso en la floración (Frazee y Marquis 1994). Augspurger (1981) encuentra que los polinizadores de *Hybanthus prunifolius* se ven más atraídos hacia aquellos individuos que florecen sincrónicamente con respecto al resto de la población, en tanto que en el trabajo de Brody (1997) no se registran diferencias en la tasa de visita entre flores que florecen en distintos momentos de la temporada.

Los estudios que relacionan ambas interacciones biológicas, herbivoría floral y polinización biótica, han considerado los efectos de los herbívoros sobre la corola completa, sin especificar si el daño ocurre sobre caracteres florales que pudiesen ser empleados como señales de discriminación por los polinizadores. De esto se desprende que la relación entre herbivoría de señales y polinización, no ha sido aún explorada en la literatura.

En el presente trabajo se analizarán los efectos que la herbivoría floral y la polinización ejercen sobre la producción de semillas de *Mimulus luteus*, y en qué medida la herbivoría afecta las señales utilizadas por los polinizadores, particularmente el picaflor cordillerano, *Oreotrochilus leucopleurus*, y cómo la herbivoría de señales afecta la polinización y subsecuente fecundidad de *M. luteus*. Más específicamente, en este trabajo se abordarán las siguientes preguntas, 1) ¿Cuál es el efecto de la herbivoría floral sobre la fecundidad de *M. luteus*?, 2) ¿Cuál es el efecto de la herbivoría floral de guías de néctar sobre la polinización y fecundidad de *M. luteus*?, 3) ¿Cuál es el papel del picaflor *O. leucopleurus* en la interacción herbivoría x polinización? Todas estas interrogantes se relacionan con la pregunta más general, 4) ¿Cuál es la importancia de las guías de néctar en la interacción herbivoría x polinización en *M. luteus*?

## ANTECEDENTES DE HISTORIA NATURAL

*Mimulus luteus* var. *luteus* (Scrophulariaceae) es una hierba anual o perenne que crece en riberas y lugares pantanosos de Chile desde la III hasta la XI regiones. Esta especie habita desde el nivel del mar hasta los 3650 msnm y es visitada por diversas especies entre las que se destacan numéricamente los insectos himenópteros *Centris nigerrima*, *Bombus dahlbomii*, *B. terrestris*, *Megachile semirufa*, y el picaflor cordillerano (*Oreotrochilus leucopleurus*). Presenta flores solitarias y terminales y una corola amarilla cuyo lóbulo inferior central a menudo presenta una guía de néctar de color rojo y de tamaño variable tanto intra como interpoblacionalmente, (von Bohlen 1995, figura 1). Se define guía o señal de néctar como un patrón de coloración determinado que facilita a los visitantes el descubrimiento de las recompensas que ofrece la flor (Waser 1983). Tanto en el lóbulo inferior central, o pétalo de aterrizaje, como en los pétalos laterales y superiores, es común encontrar marcas de herbivoría, de la cual son responsables el himenóptero *Mesonychium sp.* y larvas de lepidópteros de la familia Noctuidae.

El principal grupo de aves nectarívoras del Neotrópico corresponde a los picaflores (familia Trochilidae), los que presentan una morfología única que les permite aprovechar el recurso néctar ofrecido por numerosas especies de plantas tanto de zonas tropicales como templadas (Campbell y Lack 1985). Aunque se ha documentado extensamente la preferencia que presentan estas aves por el color rojo (Pickens 1930,

Proctor y Proctor 1978, Faegri y van der Pijl 1979, Proctor y col. 1996), no existe consenso respecto a los mecanismos de percepción involucrados en tal elección.

Mientras algunos autores sostienen que la preferencia por el color rojo sería innata (Vickery 1995), otros cuestionan esta posibilidad, sugiriendo que existe un aprendizaje mediado por la experiencia a través de colores particulares y recompensa floral (Endress 1996, Meléndez-Ackerman 1997).

*Oreotrochilus leucopleurus*, el picaflor cordillerano, habita las praderas de la puna de la cordillera de los Andes, entre los 1500 metros de altura hasta los 3500 msnm (Goodall y col. 1946). Su rango de distribución se extiende desde la Provincia de Tarija en Bolivia y la II Región en Chile, hasta Laguna del Laja en la VIII Región de Chile, en Argentina está presente desde Salta hasta Jujuy (Fjeldså y Krabbe 1990.) Se alimenta del néctar de flores de *M. luteus*, *Tropaeolum polyphyllum*, *Stachys sp.* *Mutisia sp.*, entre otras.

En la Cordillera de la IV Región, localidad de Pelambres (31° 45' S, 70° 30' O, 2730 msnm), se ha descrito un proceso de selección natural divergente sobre *M. luteus*, en que flores de corola y guía de gran tamaño son visitadas preferentemente por insectos, en horas de la mañana, mientras que los fenotipos de corola y guía floral de menor tamaño son visitados preferentemente por *O. leucopleurus* en horas de la tarde (Medel y col., en prensa). Ambos fenotipos presentan cantidades de néctar que no difieren entre sí.

Los resultados encontrados en la localidad de Pelambres sugieren que ambos tipos de visitantes florales interactúan entre sí afectando a su vez a los individuos de *M. luteus*.

## Figura 1

*Figura 1:* Fenotipos florales de *M. luteus* En rojo, guía de néctar.



## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

La guía de néctar afecta no sólo la polinización de *M. luteus*, sino también la interacción entre herbivoría floral y polinización, a través de su efecto sobre la atracción al polinizador *O. leucopleurus*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

- Determinar los efectos de la herbivoría floral y de la polinización sobre la producción de semillas de *Mimulus luteus*.
- Cuantificar el impacto de la herbivoría floral de señales sobre la polinización y éxito reproductivo de *M. luteus*.

## MATERIALES Y METODOS

### **Sitio de estudio:**

Los experimentos se llevaron a acabo en una vega cordillerana de la localidad El Yeso (33° 37' S, 70° 01' W, 2580 msnm), Región Metropolitana, Chile. El sitio se caracteriza por contar con una extensa población de *M. luteus*, así como por ser lugar de nidificación de verano del picaflor cordillerano, *Oreotrochilus leucopleurus*, el cual se encuentra allí en abundancia.

### **Historia Natural de *Mimulus luteus*:**

#### a) Tasas de visita

Durante 4 días se observaron los visitantes florales, tanto insectos como picaflores en un total de 42 horas distribuidas entre las 08:00 y las 20:00. Se registró la identidad del visitante y el número de plantas y flores visitadas. La tasa de visita se calculó como el cuociente entre el número de flores visitadas, el número de flores observado en el parche y la cantidad de horas en que se acumularon las observaciones. Esta variable se asoció a las diferentes horas del día en que se realizaron las observaciones.

b) Dinámica de secreción de néctar

Con el fin de determinar la dinámica de secreción de néctar tras vaciado, se aislaron 20 flores de diferentes individuos de *M. luteus* mediante bolsas de tela, impidiéndose la extracción de néctar por visitantes florales, tras lo cual se procedió a vaciar su contenido de néctar cada tres horas a partir de las 10:00, y durante un día completo, por medio de un capilar de 10 microlitros ( $\mu\text{l}$ ).

Los datos se analizaron mediante Análisis de Varianza (ANDEVA), utilizando las horas de registro como medida repetida, y el volumen del néctar en  $\mu\text{l}$  como variable respuesta.

c) Sistema Reproductivo de *M. luteus*

Se efectuaron tres tratamientos de cruzamiento, con 20 flores de diferentes plantas cada uno. El primer tratamiento es auto-polinización automática (Aau), el cual consistió en aislar las flores mediante bolsas de tela que impidieron la llegada de animales vectores de polen, sin realizar mayor manipulación en ellas hasta la recolección de la cápsula madura. Las semillas producidas en estas flores poseen un origen autógeno y demuestran cierto grado de auto-compatibilidad y ausencia de necesidad de un vector de polen. El segundo tratamiento, auto-polinización artificial (Aar), consistió en embolsar yemas florales de la manera anteriormente descrita para su posterior cruce con polen proveniente de la misma flor. Este procedimiento entrega una visión más clara acerca del nivel de auto-compatibilidad de la planta. El tercer y último

tratamiento, polinización cruzada artificial (Pcr), entrega como resultado, el número de semillas que se produciría por medio de la reproducción cruzada, sirviendo así como punto comparativo para el cálculo de la auto-compatibilidad. El procedimiento es similar al descrito para el tratamiento Aar, salvo que la proveniencia del polen es exógama, es decir, de un individuo diferente.

Los datos se analizaron mediante ANDEVA, utilizando el tratamiento de cruce como factor fijo, y el número de semillas por flor como variable respuesta. También se realizó una prueba de G con el fin de determinar si la proporción de frutos formados es dependiente del tratamiento de cruce.

Una vez recolectadas las cápsulas maduras, 23-26 días tras la antesis o apertura de la flor, se procedió a fotografiar y cuantificar las semillas mediante programas de análisis de imágenes (Photoshop 6.0, Sigma Scan Pro 5, Image Tool).

### **Herbivoría y polinización:**

#### a) Monitoreo de Herbivoría Natural

Durante febrero de los años 2002 y 2003 se marcaron 200 yemas florales en total, pertenecientes a diferentes individuos, las cuales fueron monitoreadas desde su apertura hasta su muerte, registrándose la ocurrencia de herbivoría floral. También se registró el tipo de pétalo dañado (lateral, superior y/o de aterrizaje). Otras variables monitoreadas fueron la lateralidad del daño (lado izquierdo, derecho o al centro de la corola), cantidad de pétalos afectados, y la temporalidad del daño después de la antesis.

El efecto del daño natural y de las otras variables estudiadas se analizó mediante ANDEVA usando como variable respuesta el número de semillas.

b) Área de la corola y guía de néctar

Con el fin de determinar el área de la corola y de la guía de néctar, se fotografiaron todas las flores incluidas en el monitoreo, las cuales fueron analizadas mediante programas de análisis de imágenes, e incluidas posteriormente como co-variables en los ANDEVA mencionados con anterioridad.

c) Daño artificial y exclusión de picaflores

Durante la temporada 2002 se diseñó un experimento factorial de 2 X 2 con exclusión de picaflores y daño artificial como factores principales. El factor exclusión se llevó a cabo mediante mallas plásticas de tamiz de 625 mm<sup>2</sup> (figura 2), área que permite el acceso de insectos pero no de picaflores. Se instalaron 100 mallas sobre yemas marcadas de diferentes individuos. El factor daño artificial consistió de una perforación circular de 28,3 mm<sup>2</sup> realizada sobre el pétalo de aterrizaje a 100 flores marcadas desde yema, pertenecientes a diferentes individuos. Para este experimento se emplearon 250 flores de distintos individuos, 50 flores dañadas y excluidas (DE), 50 flores dañadas y no excluidas (D), 50 flores no dañadas y excluidas (E), y 100 flores control, es decir, que no presentaban ni daño ni exclusión (C). Estas últimas provinieron del monitoreo anteriormente descrito.

Los resultados fueron analizados mediante ANDEVA de dos vías, con daño artificial y exclusión de picaflores como factores fijos, y utilizando como variable respuesta el número de semillas producidas por flor.

## **Figura 2**

**Figura 2:** a) y b) Mallas de exclusión de picaflores. c) Perforación artificial del pétalo de aterrizaje de *M. luteus*.



**Mecanismos de percepción de *Oreotrochilus leucopleurus*:**

a) Sensibilidad espectral

Se caracterizó el rango de longitudes de onda a las que un individuo de *O. leucopleurus* es sensible, a través de dos procedimientos electro-retinográficos, el primero sobre el animal completo y el segundo sobre el ojo aislado, ambos sobre el

mismo individuo. Esta técnica consiste en la aplicación de diferentes longitudes de onda sobre la retina, sea del animal anestesiado o del ojo aislado y con la córnea retirada, obteniéndose una respuesta eléctrica de cierta amplitud medida en microvoltios ( $\mu\text{v}$ ). El cociente entre la amplitud de la respuesta y la intensidad del estímulo, medida como fotones por micrón<sup>2</sup>, corresponde a la sensibilidad relativa del individuo a las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético (Chen y Goldsmith 1984).

b) Reflectancia de *M. luteus*

Con el fin de describir el patrón de coloración de la corola de *M. luteus* se procedió a examinar 200 flores de diversos fenotipos de guía de néctar con un espectrómetro modelo S2000 Miniature Fiber Optic Spectrometer (Ocean Optics ®), el cual cuantifica las longitudes de onda reflejadas por la corola. De este modo es posible detectar picos de reflectancia no percibidos por el ojo humano (ultravioleta), que pudiesen mediar el comportamiento de los polinizadores y/o herbívoros.

## **RESULTADOS**

### **Historia Natural de *Mimulus luteus*:**

a) Tasas de visita

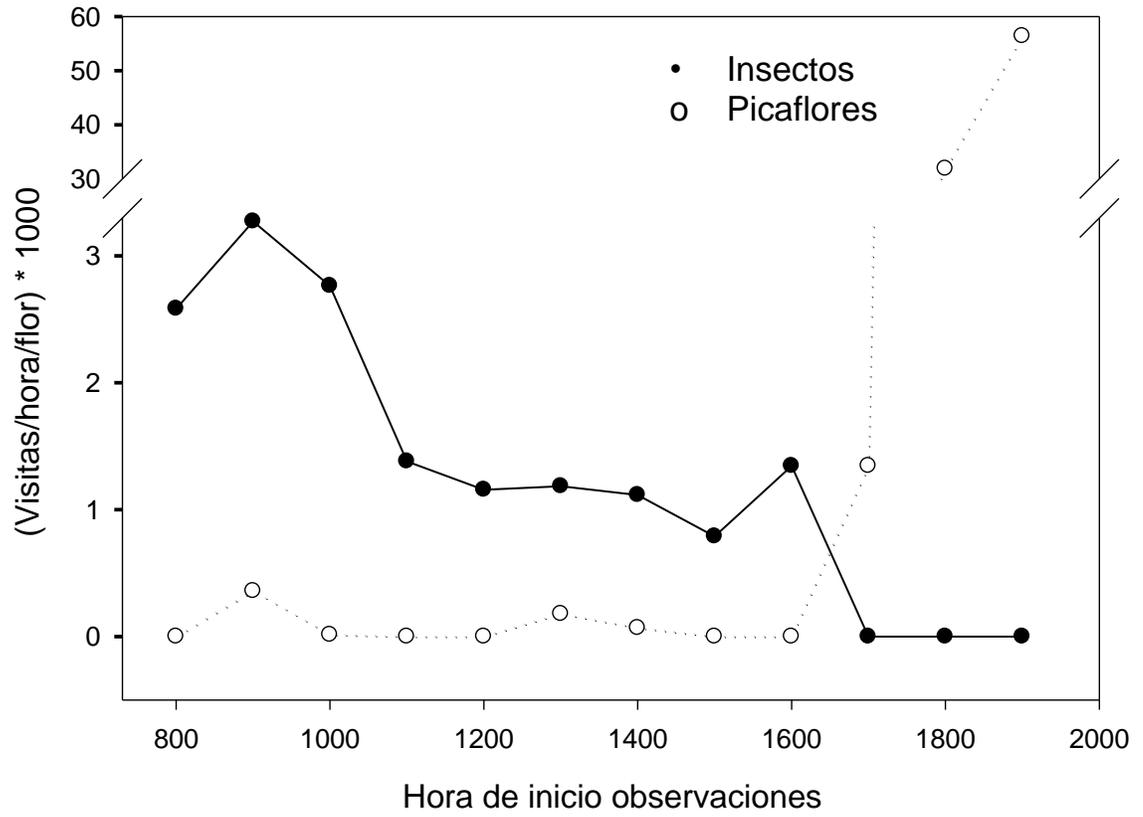
Los insectos (*Centris nigerrima*, *Megachile semirufa*, *Bombus dahlbomii*, *Bombus terrestris*, *Mesonychium sp.*, Halictidae sp.) visitaron preferentemente las flores de *Mimulus luteus* durante horas de la mañana, en tanto que el picaflor *Oreotrochilus leucopleurus*, realizó sus visitas principalmente en horas de la tarde (figura 3). Se verifica entonces un patrón temporal equivalente al descrito en la localidad de Pelambres, IV Región, en el que las visitas de insectos y picaflores se distribuyen diferencialmente a lo largo del día.

b) Dinámica de secreción de néctar

La hora en que se realizó la extracción afectó significativamente la dinámica de relleno de néctar en términos de volumen secretado (ANDEVA de medidas repetidas,  $F(7,133)= 4,182$ ,  $P<0,001$ ). Las diferencias entre horas fueron dadas por el volumen de néctar secretado a las 04:00 y a las 10:00, ambos significativamente superiores a los volúmenes secretados entre las 16:00 y las 22:00 (prueba a posteriori de Tukey, figura 4).

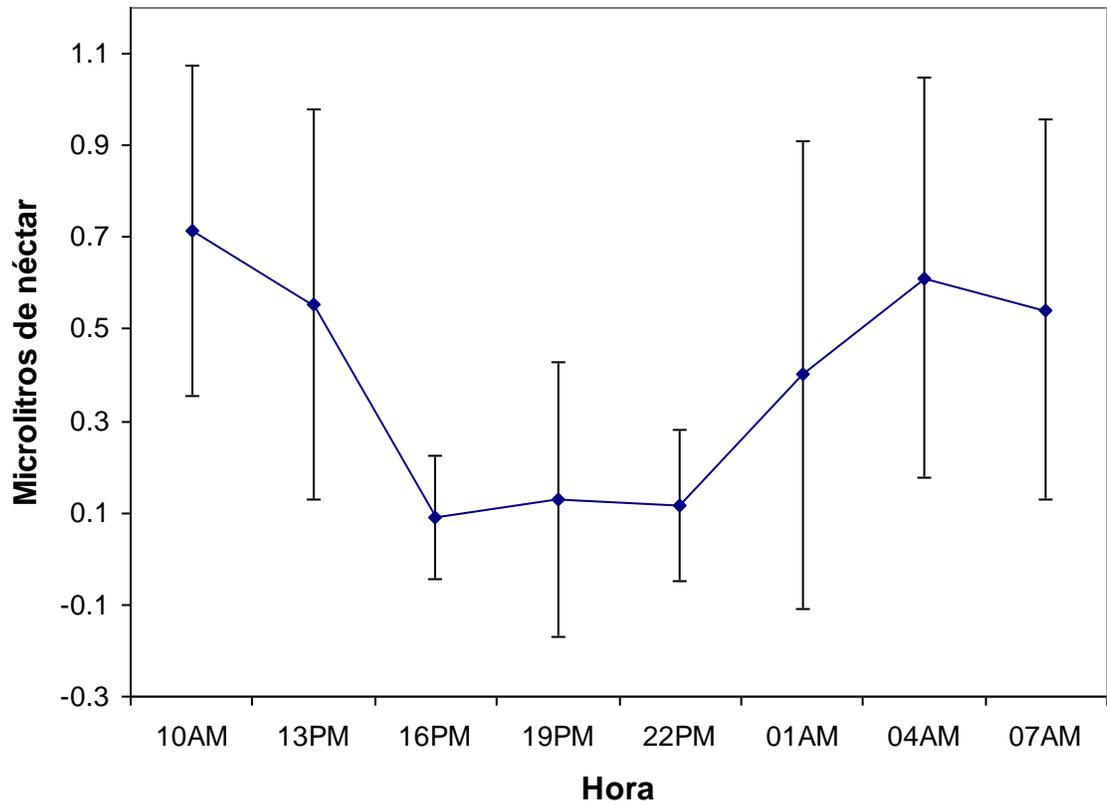
### **Figura 3**

**Figura 3.** Tasa de visita de insectos y picaflores a lo largo del día



**Figura 4**

**Figura 4:** Dinámica de secreción de néctar tras vaciado (barras de error equivalentes a 2 EE).



c) Sistema Reproductivo de *M. luteus*

El tipo de tratamiento de cruce ejerció un efecto significativo sobre el número de semillas producidas (ANDEVA,  $F(2,56) = 7,916$ ,  $P < 0,001$ ). Las diferencias están dadas por el tratamiento de auto-polinización automática (Aau) el cual presentó una

producción de semillas menor que la de los tratamientos, auto-polinización artificial y polinización cruzada artificial (prueba a posteriori de Student-Neuman-Keuls, figura 5). La polinización automática no contribuiría a la reproducción de *M. luteus*, puesto que la producción de semillas sería prácticamente nula en ausencia de vectores de polen. Como la producción de semillas de estos dos últimos tratamientos no fue diferente entre sí, se sugiere que el nivel de auto-compatibilidad que presenta la población de *M. luteus*, es del 100%.

Con respecto a la proporción de cápsulas que forman fruto, ésta es dependiente del tratamiento aplicado (prueba de G, G corregido = 33,013 > 13,816 =  $\chi^2$  (2), P<0,001, tabla 1), siendo esta proporción mayor en las flores pertenecientes al tratamiento de polinización cruzada en relación a aquellas auto-polinizadas. Esto indica que si bien la población es altamente auto-compatible, la polinización cruzada sería ventajosa para la planta. Dentro de las flores auto-polinizadas, las cruzadas artificialmente presentan una mayor proporción de frutos formados que las flores auto-cruzadas automáticamente.

En conclusión, si bien la población de *M. luteus* presentaría un 100% de auto-compatibilidad, se verifica la necesidad de un vector de polen para asegurar la reproducción de la planta.

Tabla 1: Número de cápsulas que forman fruto según tratamiento de cruce aplicado

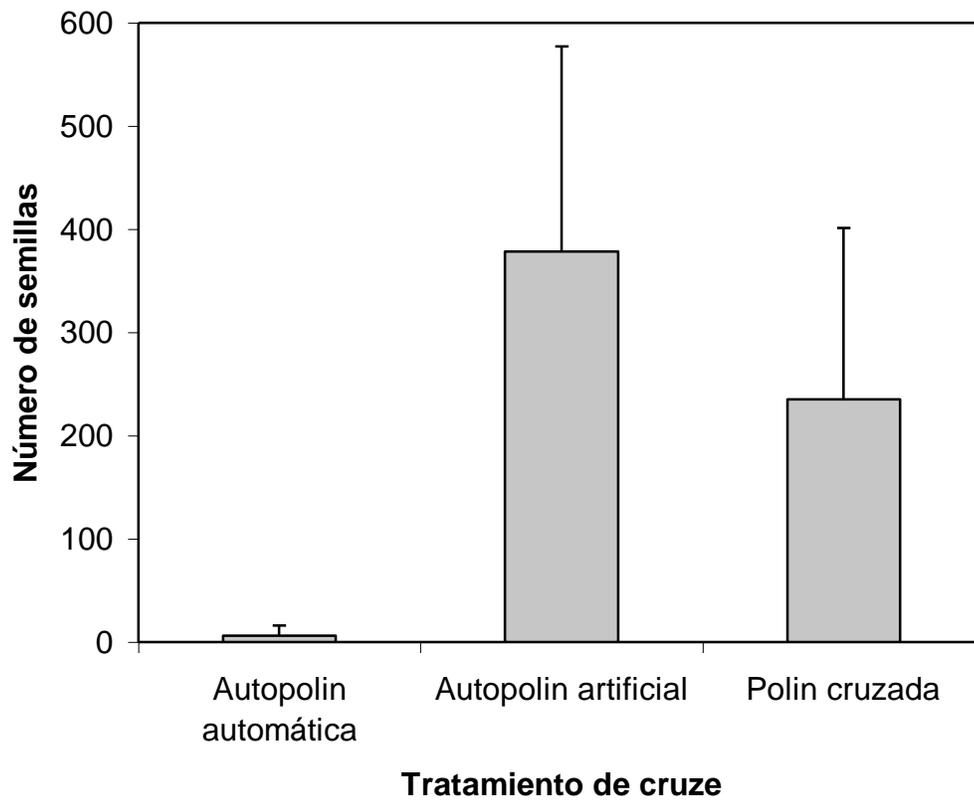
Prueba de G	categorías
-------------	------------

Tratamientos de cruce	N° cápsulas que producen fruto	N° cápsulas que no producen fruto	TOTALES
Aau <sup>a</sup>	2 (8,7%)	21	23
Aar <sup>b</sup>	10 (52,6%)	9	19
Pcr <sup>c</sup>	16 (94,1%)	1	17
TOTALES	28	31	59

- <sup>a</sup>: Autopolinización automática
- <sup>b</sup>: Autopolinización artificial
- <sup>c</sup>: Polinización cruzada artificial

**Figura 5**

**Figura 5:** Promedio del número de semillas producidas por flor según tratamiento de cruce (barras de error equivalentes a 2 EE).



**Herbivoría y polinización:**

- a) Monitoreo de Herbivoría Natural

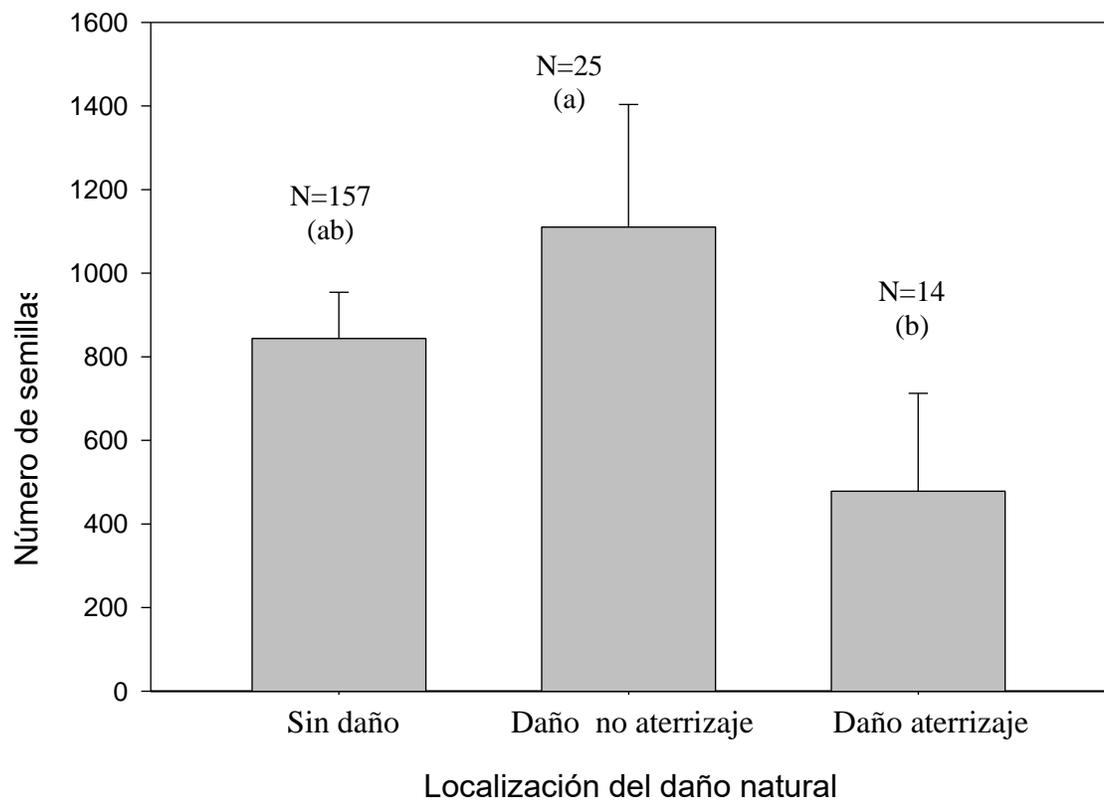
Un 24,35 % de las flores monitoreadas durante ambos años presentó herbivoría, dentro de las cuales un 34,56 % presentó daño natural en el pétalo de aterrizaje, un 72,06 % en algún pétalo lateral y un 31,62% en algún pétalo superior. La incidencia de daño natural durante ambos años no afectó la producción de semillas (ANDEVA,  $F(1,194) = 0,103$ ,  $P > 0,5$ ). La presencia/ausencia de daño natural tampoco afectó los resultados luego de considerar la temporalidad del daño, es decir, si ocurrió durante el primer día de antesis (ANDEVA,  $F(1,127) = 0,018$ ,  $P > 0,1$ ), durante los dos primeros días de antesis (ANDEVA,  $F(1,126) = 0,001$ ,  $P > 0,1$ ), o durante los tres primeros días de antesis (ANDEVA,  $F(1,123) = 0,619$ ,  $P > 0,1$ ).

Ninguna de las otras variables registradas, lateralidad del daño ni cantidad de pétalos afectados, ejercieron un efecto sobre la producción de semillas (ANDEVA,  $F(3,125) = 1,292$ ,  $P > 0,1$ ;  $F(2,126) = 0,566$ ,  $P > 0,5$  respectivamente). La ausencia de efecto se mantuvo luego de analizar los datos según la temporalidad del daño.

El tipo de pétalo afectado por la herbivoría natural ejerció un efecto significativo sobre la producción de semillas, pues si bien el daño en el pétalo lateral y superior no fueron importantes, el daño en el pétalo de aterrizaje determinó una disminución en el número de semillas (ANDEVA,  $F(2,193) = 3,893$ ,  $P < 0,05$ , prueba a posteriori de Scheffe, figura 6).

## **Figura 6**

**Figura 6:** Efecto de la localización de la herbivoría natural sobre la producción promedio de semillas por flor (barras de error equivalentes a 2 EE).



b) Área corola y guía de néctar

El área de la corola y de la guía de néctar no se relacionaron con la incidencia de daño natural. Es así como las regresiones logísticas del logaritmo del área de la corola o guía, versus la presencia/ausencia de daño natural, no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2(1) = 1,123, P > 0,1$ ;  $\chi^2(1) = 0,027, P > 0,5$ , respectivamente)

De igual manera, al incluir las áreas de corola y guía como co-variables en los ANDEVA anteriormente descritos, los resultados no se vieron afectados cualitativamente, de modo que la producción de semillas tampoco se afectó por estas variables.

c) Daño artificial y exclusión de picaflores

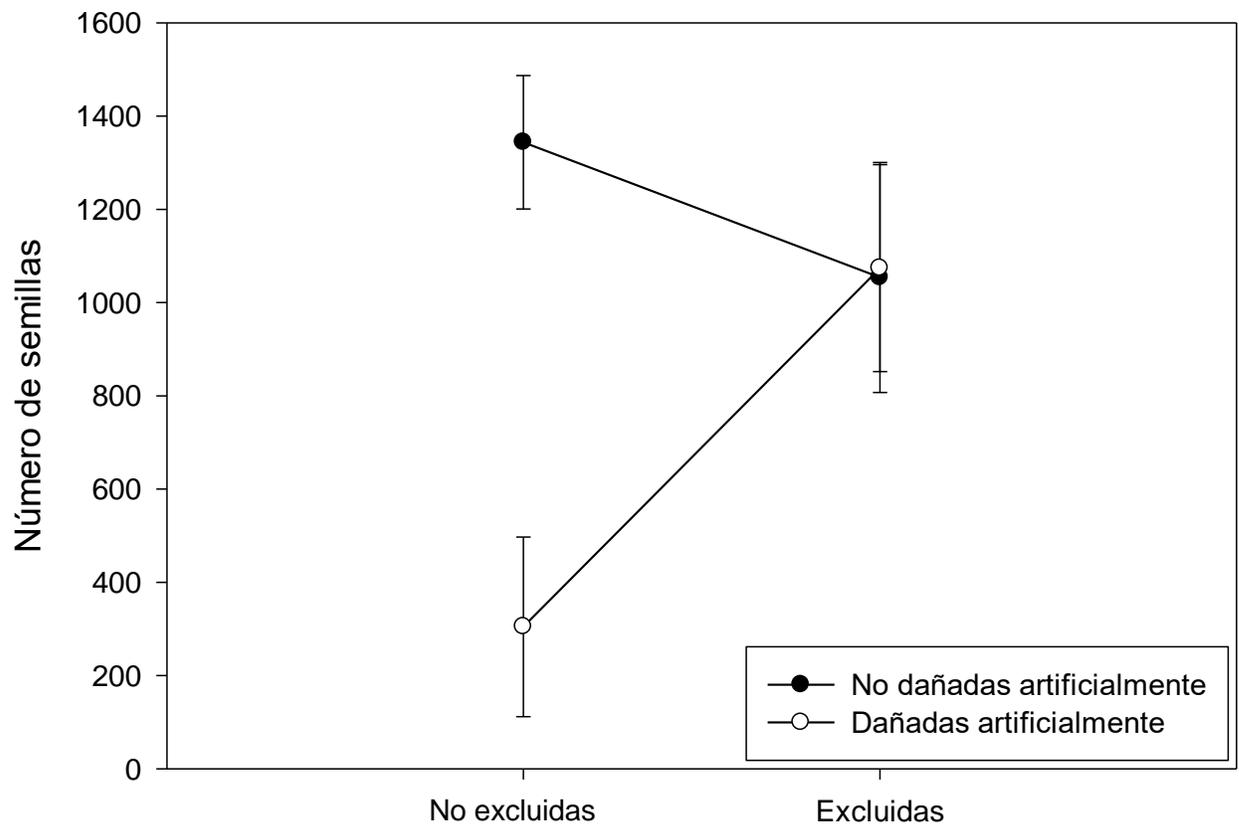
Tanto el daño artificial sobre el pétalo de aterrizaje como la exclusión de picaflores y la interacción entre ambos tuvieron un efecto significativo sobre la producción de semillas de *M. luteus* (ANDEVA, tabla 2). Contrastes a posteriori revelaron que las diferencias están dadas por el tratamiento sin exclusión – con daño artificial, el cuál presentó un número de semillas menor al de los otros tratamientos (figura 7). La interacción entre factores fue significativa ya que el efecto del daño es contingente a la presencia de picaflores, lo cual indica que las flores herbivorizadas en el pétalo de aterrizaje fueron menos visitadas por *O. leucopleurus*. Globalmente, la exclusión de picaflores ejerció un efecto sobre la producción de semillas solamente en presencia del daño, mientras que en su ausencia, el efecto de la exclusión de picaflores fue irrelevante. Asimismo, el efecto del factor daño sobre la producción de semillas fue significativo solamente en presencia de picaflores (o ausencia de malla).

Tabla 2: Análisis de varianza del efecto de los tratamientos aplicados y su interacción sobre el número de semillas producidas.

ANDEVA				
	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	P
Exclusión	1	5,461	10,095	= <b>0,002</b>
Perforación	1	13,543	25,033	< <b>0,001</b>
Exclusión * Perforación	1	18,528	34,247	< <b>0,001</b>
Error	156	0,541		

**Figura 7**

**Figura 7:** Relación entre el daño artificial y la exclusión de picaflores sobre la producción promedio de semillas por flor en *Mimulus luteus* (barras de error equivalentes a 2 EE).



**Mecanismos de percepción de *Oreotrochilus leucopleurus*:**

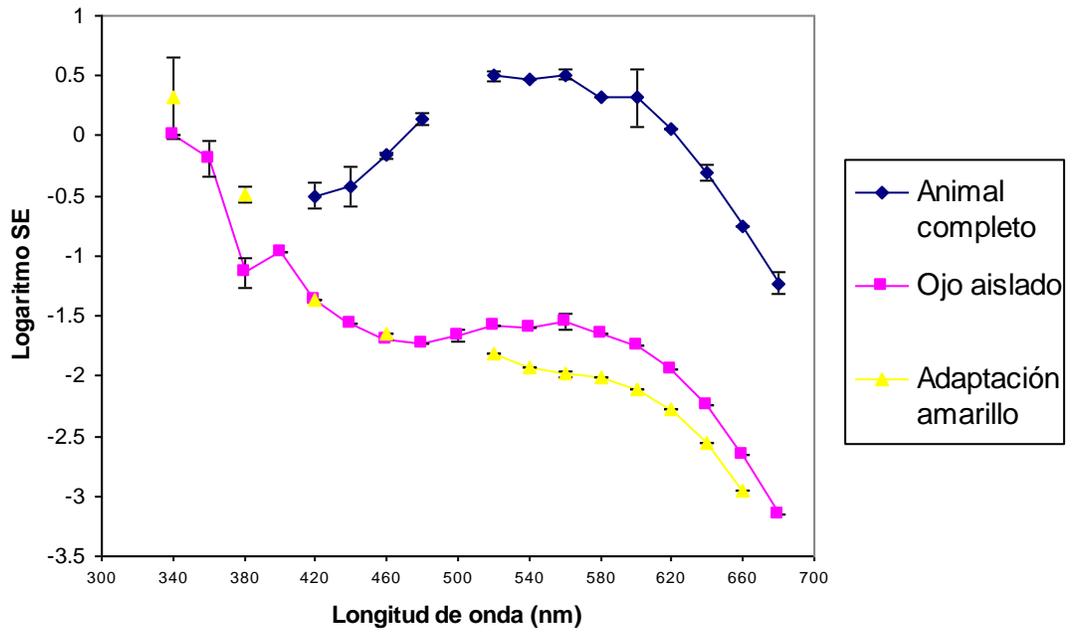
- a) Sensibilidad espectral

Al realizar la electro-retinografía sobre el animal completo se observó que *O. leucopleurus* presenta un máximo de sensibilidad a las longitudes de onda situadas alrededor de los 560 nanómetros (nm), lo que corresponde al color que percibimos como amarillo. La sensibilidad espectral decae en la zona de longitudes de onda correspondientes al color rojo, es decir sobre los 600 nm, y también bajo los 460 nm, es decir, en la zona del espectro electromagnético correspondiente al ultravioleta (figura 8, curva superior).

Al repetir el procedimiento en el ojo aislado, con la córnea retirada, se observa que la sensibilidad espectral decae, pero la sensibilidad a longitudes de onda ultravioleta aumenta su contribución relativa a la sensibilidad total (figura 8, curva del centro). Este resultado pudo deberse a una excitación de la retina no asociada a fotorreceptores, sino a daño producido por la alta frecuencia de esas longitudes de onda. Para descartar esta posibilidad, se procedió a adaptar al ojo aislado a una longitud de onda de 450 nm (amarillo para la visión humana) lo que reduce la respuesta de los fotorreceptores a longitudes de onda superiores, manteniendo su reactividad a longitudes de onda inferiores. De este modo, luego de adaptar el ojo aislado al amarillo, la sensibilidad espectral se redujo solamente por sobre esa longitud de onda, lo cual indica que si bien la respuesta al ultravioleta es mediada por fotorreceptores, no se utiliza en las conductas del animal, puesto que las longitudes de onda ultravioleta son filtradas por la córnea.

## **Figura 8**

**Figura 8:** Promedio del logaritmo de las sensibilidades espectrales registradas a diferentes longitudes de onda mediante electro-retinografía de *O. leucopleurus* (barras de error equivalentes a 2 EE).

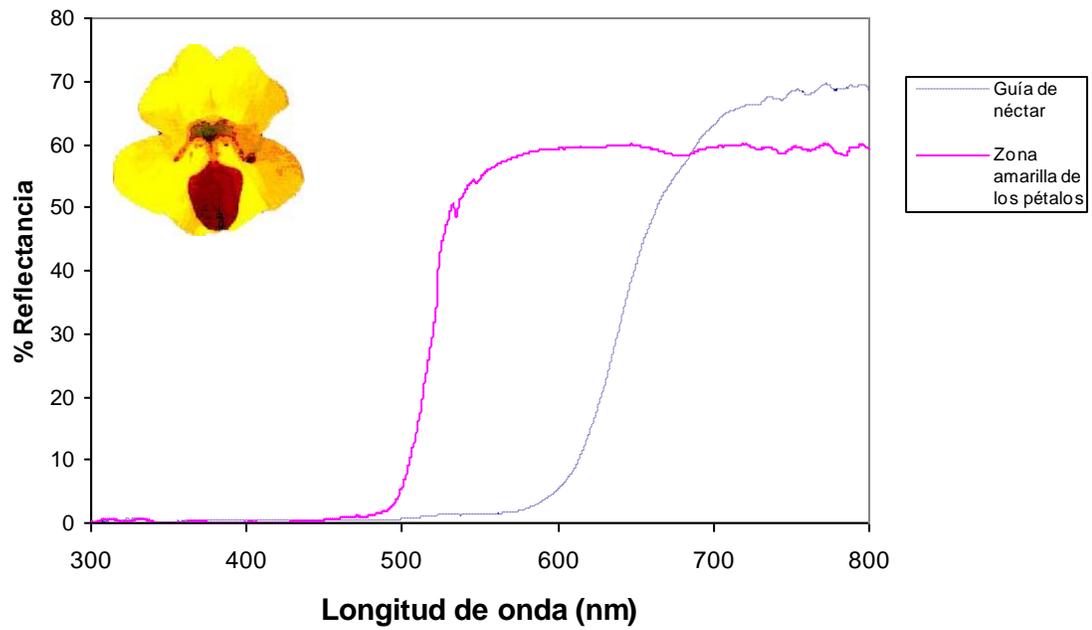


b) Reflectancia de *M. luteus*

La figura 9 muestra el patrón de reflectancia de la corola de *M. luteus*, la cual no refleja longitudes de onda ultravioleta. La zona amarilla de los pétalos se comportó ópticamente como un filtro de paso alto, reflejando longitudes de onda superiores a 500 nm, correspondientes a los colores amarillo, naranja y rojo. La guía de néctar reflejó por sobre los 600 nm, es decir, longitudes de onda correspondientes a los colores naranja y rojo.

## Figura 9

**Figura 9:** Porcentaje de reflectancia de distintas zonas de la corola de *M. luteus*.



## CONCLUSIONES

1. Si bien la población de *Mimulus luteus* es auto-compatible, se requiere un vector de polen para asegurar la reproducción de la planta.
2. La herbivoría floral no afecta globalmente la producción de semillas en *M. luteus*. Sin embargo, el daño en el pétalo de aterrizaje determina una importante reducción en el número de semillas.
3. El área de la corola y la guía de néctar no se relacionan con la incidencia de herbivoría natural, y tampoco afectan la producción de semillas.
4. La menor producción de semillas de las flores dañadas artificialmente y sin mallas de exclusión indican que los picaflores son los visitantes florales que discriminan negativamente las flores dañadas en el pétalo de aterrizaje.
5. *Oreotrochilus leucopleurus* no utiliza señales visuales ultravioleta en sus conductas. Por su parte, las flores de *M. luteus* no presentan reflectancia en el U.V. *O. leucopleurus* no posee una especialización sensorial especial asociada al fenotipo de coloración de *M. luteus*.
6. Los picaflores discriminarían negativamente las flores herbivorizadas en el pétalo de aterrizaje por una preferencia aprendida por aquellas flores que presentan un mayor tamaño de guía de néctar, señal que asociarían a una mayor recompensa.

## DISCUSION

### **Herbivoría natural de *Mimulus luteus***

Si bien la herbivoría natural global no afectó la producción de semillas, al considerar el tipo de pétalo afectado se observó que la herbivoría en el pétalo de aterrizaje afectaría el área de la señal, tornando las flores poco atractivas para los picaflores polinizadores. La preferencia de picaflores por fenotipos florales que presentan una guía de néctar por sobre aquellos que no la presentan fue demostrada por Waser y Price (1985) al estudiar la conducta forrajera de picaflores de las especies *Selasphorus platycercus* y *S. rufus*, sobre flores de *Delphinium nelsonii*. La herbivoría en el pétalo de aterrizaje sería mucho más perjudicial para la reproducción de la planta que el daño ejercido en cualquier otra zona de la corola. Si la guía floral es una señal atractiva tanto para los polinizadores como para los herbívoros existiría entonces un conflicto entre atraer a los polinizadores y evitar a los herbívoros. Conflictos semejantes han sido reportados con anterioridad. Es así como tanto polinizadores como escarabajos depredadores de semillas se ven atraídos por parches de mayor densidad en *Cassia biflora* (Silander 1978), mismo efecto presentado por Brody (1992) en *Ipomopsis aggregata*, quién además encuentra una correlación positiva entre el tamaño de corola y la presencia de huevos de depredadores de semillas del género *Hylemya*. Por último, Galen y Cuba (2001) registran que tanto los polinizadores como los herbívoros de *Polemonium viscosum* prefieren flores de corola abierta. Sin embargo, en

el presente caso, ese conflicto no existiría, pues los insectos herbívoros no basan su elección floral según el tamaño de la corola o de la guía de néctar, las que no guardan ninguna relación con la incidencia de herbivoría floral. Si bien estas variables tampoco se relacionan con la producción de semillas, serían importantes en la elección floral que realiza *Oreotrochilus leucopleurus*, visitante que si bien no da cuenta de la mayoría de la producción de semillas, es capaz de discriminar el daño, probablemente por su preferencia por guías de néctar de gran tamaño.

Es interesante notar que la cantidad de pétalos herbivorizados no afectó la producción de semillas, lo cual sugiere que el área dañada no es importante para la elección floral efectuada por los polinizadores. Es posible que los insectos polinizadores no perciban el daño por una percepción visual gruesa, o no asocien la presencia del daño a recompensas de menor calidad o cantidad. En el caso de los picaflores, es posible que el rango de áreas en que ocurre la herbivoría floral se encuentre por sobre el área umbral de detectabilidad del daño, de modo que éste se perciba globalmente, como todo o nada.

### **Interacción entre herbivoría y polinización**

El efecto de la exclusión fue marginalmente significativo entre las flores no dañadas (figura 7), siendo la producción de semillas de las flores excluidas, menor a la de las flores control. Esto sugiere una eficiencia menor de los picaflores en relación a los insectos como polinizadores de *M. luteus* en la población en cuestión. Considerando

que, aunque el porcentaje de auto-compatibilidad en *M. luteus* sería del 100%, se requiere de vectores de polen para asegurar la reproducción, la polinización cruzada dependería en mayor medida de polinizadores insectos. El rol de los picaflores como polinizadores de *M. luteus*, podría variar temporalmente de acuerdo a la abundancia relativa del ave en distintas temporadas.

Existen dos explicaciones tentativas para la disminución en la producción de semillas como respuesta al daño efectuado sobre la corola. En primer lugar, las estructuras florales reproductivas podrían también haberse dañado, o, la producción de semillas podría haber decrecido si los polinizadores evitaron visitar las flores dañadas. Lo primero puede descartarse al considerar que la perforación no produjo diferencias en el número de semillas en condiciones de exclusión. Por lo tanto, puede decirse que el daño en la corola afecta negativamente el número de semillas mediante un mecanismo de discriminación negativa de las flores dañadas por parte de los polinizadores. La discriminación negativa de flores dañadas ha sido sugerida por Cunningham (1995) quién documentó que las flores dañadas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* no presentaron visitas subsecuentes de los polinizadores murciélagos. Asimismo Irwin (2000), documentó que picaflores de las especies *Selasphorus platycercus* y *S. rufus* evitan flores con robo de néctar en *Ipomopsis aggregata*.

El efecto negativo del daño floral en el pétalo de aterrizaje desaparecería en ausencia de picaflores debido a que precisamente son éstos quienes discriminan

negativamente las flores dañadas, a diferencia de los polinizadores insectos. Una posibilidad es que los insectos no hagan su elección floral utilizando la guía de néctar presente en el pétalo de aterrizaje. Sin embargo no es posible descartar que la malla empleada en la exclusión sea en sí un objeto conspicuo y atrayente para los insectos polinizadores.

El efecto significativo de la interacción de los factores daño y exclusión de picaflores tiene varias consecuencias para la reproducción de la planta. Por un lado, dado que el daño ejercido sobre la corola no afecta las estructuras reproductivas, se deduce que los picaflores perciben cuando una flor ha sido atacada por un herbívoro, probablemente reconociendo las zonas afectadas desde un área dañada umbral de detección; y que además evitan estas flores, con consecuencias negativas para la producción de semillas de la planta. Es posible que los picaflores eludan las flores dañadas debido a una experiencia previa negativa con otras flores herbivorizadas, en términos de una menor producción de néctar u otros factores asociados a recompensa, cuya medida se encuentra fuera de los alcances de este estudio.

La discriminación negativa efectuada por *O. leucopleurus* podría deberse a una preferencia espontánea aprendida por los fenotipos florales que presentan néctar en el momento en que ocurren las visitas de los picaflores.

Información preliminar de experimentos de conducta en laboratorio sugieren que *O. leucopleurus* prefiere flores de guía de néctar de gran tamaño. El experimento en cuestión consistió en enfrentar a un individuo de *O. leucopleurus* capturado en la

localidad El Yeso y mantenido en cautiverio, a flores artificiales que simulaban distintos fenotipos florales de *M. luteus*. El diseño experimental constaba de 40 flores artificiales las cuales presentaban un tamaño de corola grande o pequeño, tamaño de guía de néctar grande o pequeño, y presencia o ausencia de néctar artificial. El individuo fue sometido a 4 sesiones experimentales de 2 horas cada una, durante las cuales fueron registradas todas las visitas realizadas a las flores artificiales. Como resultado se encontró que el picaflor elegía consistentemente flores artificiales de gran tamaño de guía de néctar (65 visitas de 83), y que no basaba su elección floral evaluando directamente la presencia de néctar, pues visitó un número similar de flores artificiales con y sin néctar (36 visitas a flores con néctar, 47 sin néctar). Esta elección consistente o preferencia por la guía de néctar se manifestaba en las primeras visitas de cada viaje de forrajeo, los cuales estaban separados entre sí por períodos en los cuales el individuo no se alimentaba sino permanecía perchado realizando otras actividades como por ejemplo acicalándose. En las siguientes visitas de cada viaje de forrajeo, la preferencia descrita desapareció, sugiriéndose que si bien es espontánea, no es innata sino una asociación aprendida relacionada a la recompensa floral, y que no es fija sino que si la relación se pierde, la preferencia también es lábil.

### **Percepción visual de *O. leucopleurus* y patrón de coloración de *M. luteus***

Si bien las especies de picaflores estudiadas hasta la fecha muestran una percepción del ultravioleta cercano, es decir, alrededor de los 370 nm, al nivel de los

fotorreceptores (*Archilochus colubris*, Chen y col. 1984), así como el uso de esta sensibilidad en conductas de forrajeo (*Archilochus alexandri*, *Lampornis clemenciae* y *Eugenes fulgens*, Goldsmith 1980), el picaflor *O. leucopleurus* no percibe longitudes de onda ultravioleta, a pesar de que a nivel de fotorreceptores sí posee cierta sensibilidad. Esta potencialidad sensorial no es utilizada en su conducta pues las longitudes de onda ultravioleta son absorbidas por la córnea.

La falta de sensibilidad al ultravioleta podría guardar relación con el medio en el que *O. leucopleurus* se desenvuelve, sobre los 1500 msnm, alturas en las cuales el contenido ultravioleta del espectro electromagnético es alto y potencialmente dañino para las estructuras oculares del picaflor. La sensibilidad al ultravioleta que poseen los fotorreceptores de *O. leucopleurus* correspondería a una condición ancestral al origen del género, cuyas especies habitan ambientes de montaña.

La curva de sensibilidad espectral de *O. leucopleurus* muestra una correspondencia con el espectro de longitudes de onda reflejadas por la corola de *M. luteus*, el cual no incluye ultravioleta ni otras longitudes de onda menores a 500 nm. La sensibilidad espectral del picaflor es máxima alrededor de los 560 nm, zona correspondiente al color amarillo para la visión humana. La sugerida preferencia que *O. leucopleurus* tendría por flores de guía de néctar de gran tamaño sería entonces aprendida y no producto de una sensibilidad visual particular o restringida hacia la zona del espectro electromagnético correspondiente al color rojo.

*Oreotrochilus leucopleurus* abandona sus hábitats de verano migrando hacia el norte, alimentándose de diferentes especies vegetales. La guía de néctar podría facilitar

el reconocimiento rápido de fuentes de alimento a distancia, lo que ha sido descrito como potencial explicación de la preferencia por el color rojo por Grant (1966), Grant y Grant (1968), Gilbert y Raven (1975), entre otros. Bleiweiss (1990) propuso que el color rojo facilitaría la detección a distancia si los picaflores discriminaran con menor eficiencia la longitud de onda en la zona donde se encuentra el color rojo, percibiéndose todos los matices de rojo como una señal única convergente. Este es un escenario posible considerando los resultados del experimento de electro-retinografía, en el cual se observa que el máximo de sensibilidad, y probablemente de discriminación fina entre longitudes de onda, ocurre alrededor de los 560 nm, y no en la zona del espectro electromagnético correspondiente al color rojo. Goldsmith y col. (1981) describen en el picaflores *Archilochus alexandri* un deterioro en la discriminación de diferentes longitudes de onda en la zona correspondiente al rojo, en relación al azul y al violeta.

Si bien la interpretación preponderante es que las flores visitadas por picaflores carecen de reflexión en el ultravioleta (Gilbert y Raven 1975), debido a que las antocianinas responsables del color rojo absorben esas longitudes de onda (Raven 1972), la corola de *M. luteus* posee vastas zonas de color amarillo, el cual no presenta la restricción mencionada (Jones y Little 1983) y que incluso posee una alta probabilidad de reflejar ultravioleta (Guldberg y Atsatt 1975). Aún así, se verifica la ausencia de reflectancia ultravioleta en la corola de *M. luteus*. Guldberg y Atsatt (1975) describen a su vez la baja probabilidad de que las guías de néctar, independientemente de su color, reflejen U.V., citando como ejemplo el caso de la planta Californiana *Mimulus guttatus*, cuya guía de néctar absorbe aquellas longitudes de onda.

En conclusión, tanto la polinización como la herbivoría de señales y su interacción, afectan la producción de semillas de *Mimulus luteus* a través de la discriminación negativa que el picaflor cordillerano, *Oreotrochilus leucopleurus*, ejerce sobre las flores dañadas en el pétalo de aterrizaje. El análisis de la herbivoría de señales y de la polinización por separado estaría ocultando parte de la riqueza de interacciones que determinan la supervivencia y el éxito reproductivo de *M. luteus*.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Augspurger, C.K.** 1981. Reproductive synchrony of a tropical shrub: experimental studies on effects of pollinators and seed predators on *Hybanthus prunifolius* (Violaceae). *Ecology* 62: 775-788.

**Bleiweiss, R.** 1990. Spectral confusion by hummingbirds and the evolution of red coloration in their flowers: a new hypothesis. *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters* 78: 33-38.

**Brody, A.K.** 1992. Oviposition choices by a pre-dispersal seed predator (*Hylemya* sp.). *Oecologia* 91: 56-62.

**Brody, A.K.** 1997. Effects of pollinators, herbivores, and seed predators on flowering phenology. *Ecology* 78: 1624-1631.

**Campbell, B. & Lack, E.** 1985. A dictionary of birds. Buteo Books, Vermillion, SD, USA.

**Chen, D.M. Collins, J.S. & Goldsmith, T.H.** 1984. The ultraviolet receptor of bird retinas. *Science* 225: 337-340.

**Chen, D.M. & Goldsmith, T.H.** 1986. Four spectral classes of cone in the retinas of birds. *Journal of Comparative Physiology* 159: 473-479.

**Conner, J.K. & Rush, S.** 1996. Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 105: 509-516.

**Crawley, M.J.** 1983. Herbivory: the dynamics of animal-plant interactions. Blackwell Scientific, Oxford, U.K.

**Crawley, M.J.** 1985. Reduction of oak fecundity by low-density herbivore populations. *Nature* 314: 163-164.

**Cunningham, S.A.** 1995. Ecological constraints on fruit initiation by *Calyptranthes ghiesbreghtiana* (Arecaceae): floral herbivory, pollen availability, and visitation by pollinating bats. *American Journal of Botany* 82: 1527-1536.

**Endress, P.K.** 1996. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge, MA, USA.

**Faegri, K. & van der Pijl L.** 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford, UK.

**Fjeldså, J. & Krabbe, N.** 1990. Birds of the high Andes. Zoological Museum, University of Copenhagen and Apollo Books, Svendborg, Denmark.

**Frazer, J. & Marquis, R.** 1994. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *American Journal of Botany* 81: 206-215.

**Galen, C. & Cuba, J.** 2001. Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skypilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 55: 1963-1971.

**Geber, M.A.** 1985. The relationship of plant size to self-pollination in *Mertensia ciliata*. *Ecology* 66: 762-72.

**Gilbert, L.W. & Raven, P.H.** 1975. Coevolution of animals and plants. Texas University Press, Austin, TX, USA.

**Goldsmith, T.H.** 1980. Hummingbirds see near ultraviolet light. *Science* 207: 786-788

**Goldsmith, T.H., Collins, J.S. & Perlman, D.L.** 1981. A wavelength discrimination function for the hummingbird *Archilochus alexandri*. *Journal of Comparative Physiology* 143: 103-110.

**Goodall, J.D., Johnson, A.W. & Philippi, R.A.** 1946. Las aves de Chile. Platt Establecimientos Gráficos, Buenos Aires, Argentina.

**Grant, K.A.** 1966. A hypothesis concerning the prevalence of red coloration in California hummingbird flowers. *American Naturalist* 100: 85-97.

**Grant, K.A. & Grant, V.** 1968. Hummingbirds and their flowers. Columbia University Press, New York, NY, USA.

**Guldberg, L.D. & Atsatt, P.R.** 1975. Frequency of reflection and absorption of ultraviolet light in flowering plants. *American Midland Naturalist* 93: 35-43

**Heithaus, E.R., Stashko, E. & Anderson, P.K.** 1982. Cumulative effects of plant-animal interactions on seed production by *Bauhinia unguolata*, a Neotropical legume. *Ecology* 63: 1294-1302.

**Herrera, C.M.** 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63: 251-275.

**Herrera, C.M.** 2000. Measuring the effects of pollinators and herbivores: evidence for non-additivity in a perennial herb. *Ecology* 81: 2170-2176.

**Irwin, R.E.** 2000. Hummingbird avoidance of nectar-robbed plants: spatial location or visual cues. *Oikos* 91: 499-506.

**Jones, C.E. & Little, R.J.** 1983. Handbook of experimental pollination biology. Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY, USA.

**Juenger, T. & Bergelson, J.** 1997. Pollen and resource limitation of compensation to herbivory in scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Ecology* 78: 1684-1695.

**Karban, R. & Strauss, S.** 1993. Effects of herbivores on growth and reproduction of their perennial host, *Erigeron glaucus*. *Ecology* 74: 39-46.

**Lehtilä, K. & Strauss, S.** 1999. Effects of foliar herbivory on male and female reproductive traits of wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Ecology* 80: 116-124.

**Medel, R, Botto-Mahan, C. & Kalin-Arroyo, M.** 2003. Pollinator mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology*: en prensa.

**Melendez-Ackerman, E., Campbell, D.R. & Waser, N.M.** 1997. Hummingbird behaviour and mechanisms of selection on flower color in *Ipomopsis*. *Ecology* 78: 2532-2541

- Mutikainen, P. & Delph, L.** 1996. Effects of herbivory on male reproductive success in plants. *Oikos* 75: 353-358.
- Pickens, A.L.** 1930. Favorite colors of hummingbirds. *The Auk* 47: 346-352.
- Proctor, J. & Proctor, S.** 1978. Color in plants and flowers. Everest House Publishers, New York, NY, USA.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A.** 1996. The natural history of pollination. Timber Press, Portland, OR, USA.
- Quezada, M., Bollman, K. & Stephenson, A.** 1995. Leaf damage decreases pollen production and hinders pollen performance in *Cucurbita texana*. *Ecology* 76: 437-443.
- Raven, P.H.** 1972. Why are bird-visited flowers predominantly red? *Evolution* 26: 674.
- Rodriguez-Robles, J.A., Melendez, E.J. & Ackerman, J.D.** 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 79: 1009-1017.
- Schemske, D.W. & Horvitz, C.C.** 1988. Plant-animal interactions and fruit production in a Neotropical herb: a path analysis. *Ecology* 69: 1128-1137.

- Silander, J.A.** 1978. Density-dependent control of reproductive success in *Cassia biflora*. *Biotropica* 10: 292-296.
- Stanton, M.L. & Preston, R.E.** 1988. Ecological consequences and phenotypic correlates of petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 75: 528-539.
- Stanton, M.L., Young, H.L., Ellstrand, N.C. & Clegg, J.M.** 1991. Consequences of floral variation for male and female reproduction in experimental populations of wild radish, *Raphanus sativus* L. *Evolution* 45: 268-280.
- Strauss, S.Y.** 1997. Floral characters link herbivores, pollinators and plant fitness. *Ecology* 78: 1640-1645.
- Vickery, R.K.** 1995. Speciation in *Mimulus*, or, can a simple flower color mutant lead to species divergence? *Great Basin Naturalist* 55: 177-180.
- von Bohlen, C.** 1995. El género *Mimulus* L. (Scrophulariaceae) en Chile. *Gayana Botanica* 52: 7-28.

**Waser, N.M.** 1983. The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. En L. Real (ed.), *Pollination biology*. Pp 241-285. Academic Press. New York, NY, USA.

**Waser, N.M. & Price, M.V.** 1985. The effect of nectar guides on pollinator preference: experimental studies with a montane herb. *Oecologia* 67: 121-126.

**Willson, M.F. & Price, P.W.** 1977. The evolution of inflorescence size in *Asclepias* (Asclepiadaceae). *Evolution* 31: 495-511.