

UCh-FC  
B. Ambiental  
C271p  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

## **PREFERENCIA FLORAL Y CORRELACIONES SEÑAL- RECOMPENSA EN UN SISTEMA PLANTA-POLINIZADOR**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

ROXANA ALEJANDRA CARES SUÁREZ

Director de Seminario de Título: Dr. Rodrigo Medel

Co-Director de Seminario de Título: Dra. Carezza Botto

Agosto, 2012

Santiago – Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Roxana Alejandra Cares Suárez.

#### “Preferencia floral y correlaciones señal-recompensa en un sistema planta-polinizador”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

*Dr. Rodrigo Medel*  
**Director Seminario de Título**

*Dra. Carezza Botto*  
**Co-Director Seminario de Título**

#### **Comisión de Evaluación**

*Dra. Alejandra González*  
**Presidente Comisión**

*Dr. Luis Flores*  
**Evaluador**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Santiago de Chile, Agosto de 2012.

## BIOGRAFÍA



La Rox, o Roxy, como cariñosamente la llaman sus amigos, nació un 25 de mayo en la Serena. Dio sus primeros pasos en el precioso Valle de Elqui, antes de viajar a Santiago, ciudad que la acogería desde antes de entrar al colegio. Desde sus inicios, siempre fue una niña responsable y esforzada, exigente



consigo mismo y muy estudiosa. Fue una alumna destacada en el colegio y desde temprano mostró interés en el área científica, lo que la llevaría a ingresar a la carrera de Biología Ambiental de la Universidad de Chile el año 2007, donde se interesó principalmente por el estudio de la ecología. Desde el año 2010 ha trabajado en el laboratorio de Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias, lugar en el cual su principal área de investigación se ha centrado en la interacción planta-polinizador. Consecuente en sus convicciones, firme, perseverante y muy responsable, son características que la han llevado a conseguir sus objetivos y a obtener grandes logros en su vida académica, y que hoy la conducen a obtener su título profesional en Biología con mención en Medio Ambiente.

Finalmente, siempre recuerda: “Si realmente has caminado, entonces entenderás”. La vida tiene formas misteriosas de enseñarnos a vivir, y tú, cada vez que te has caído, te has levantado con más fuerza. Por eso hermanita, estoy orgullosa de ti.

Rocío



*“Lo importante es cuánto amor ponemos en el trabajo que realizamos”*

Madre Teresa de Calcuta.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, Rodrigo Medel y Carezza Botto, por todo el apoyo que me han brindado durante la realización de esta investigación. A mis revisores, Alejandra González y Luis Flores, cuyos aportes han contribuido a enriquecer este trabajo. Este seminario de título fue financiado por el proyecto FONDECYT 1120155 del Dr. Rodrigo Medel.

Quiero agradecer a toda esa gente que forma parte de este largo camino. A mis padres, porque gracias a ellos estoy aquí hoy en día. A mi hermana, que considero uno de los pilares fundamentales de mi vida y a mi hermano, por siempre sacarme una sonrisa con sus tonteras. Quiero agradecer a mi familia de Tao por el cariño y la guía en este camino. Agradezco inmensamente a Dios por darme esta oportunidad maravillosa de vivir. Gracias a mi mejor amiga, por el apoyo incondicional de tantos años. A todos mis amigos, quienes me han soportado histérica y estresada por el estudio, pero que también han compartido conmigo tantos buenos momentos. A la gente del laboratorio de Ecología Evolutiva, con quienes tengo muy gratos recuerdos, más allá de lo académico. Quiero agradecer también a las cabras de Juncal, por no comerse todas mis flores y dejarme suficientes para hacer los análisis.

Finalmente, quiero agradecer a todo aquel que me ha regalado una sonrisa a lo largo de estos años.

*“Estoy despierto, veo el sol. Voy a entregarle mi gratitud, y también a todas las cosas y todas las personas, porque todavía estoy vivo. Un día más para ser yo mismo” Miguel Ruiz*

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. *Mimulus luteus* y *Centris nigerrima*, uno de sus polinizadores más importantes en el sitio de estudio. 3
- Fig. 2. Parches monoespecíficos de *M. luteus* en el sitio de estudio 6
- Fig. 3. Frecuencia de los fenotipos florales de *M. luteus* en el sitio de estudio, para los años 2011 y 2012. 9
- Fig. 4. Contribución de cada especie (en término de visitas) al servicio total de polinización de *M. luteus*. 10
- Fig. 5. Número de visitas del ensamble global de polinizadores a flores sin mancha, a flores con una mancha y a flores con dos a cinco manchas durante los años 2011 y 2012. 11
- Fig. 6. Número de visitas del polinizador más frecuente en cada año de estudio, *M. saulcyi* en el 2011 y *C. nigerrima* en el 2012. 13
- Fig. 7. Volumen y concentración de néctar por flor de *M. luteus*, correspondiente a flores sin mancha, flores con una mancha y flores con más de una mancha. 14
- Fig. 8. Número de semillas por flor de *M. luteus*, correspondiente a flores sin mancha, flores con una sola mancha y flores con más de una mancha. 15

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Riqueza y diversidad de polinizadores para las tres categorías florales en estudio. 12

## RESUMEN

Los polinizadores representan una fuerza selectiva crucial sobre las flores que visitan, en parte, debido a su habilidad para discriminar entre distintos rasgos fenotípicos. Manchas, puntos y líneas en las flores han sido tradicionalmente interpretados como rasgos que guían a los polinizadores hacia recompensas, a menudo, ocultas en la flor. A pesar de la importancia de las guías de néctar en la comunicación flor-polinizador, los mecanismos involucrados en la preferencia floral han sido poco investigados en poblaciones naturales. El objetivo de este estudio es examinar la preferencia de los polinizadores (si existe) por los diferentes fenotipos florales en una población de *Mimulus luteus* y la relación de tales preferencias con los niveles de recompensa asociados (néctar). *M. luteus* es una especie herbácea que posee una guía de néctar ubicada en el lóbulo inferior de la corola (una mancha roja), aunque también es posible encontrar flores sin guías y con más de una mancha dentro de las poblaciones. Este estudio fue realizado en una población de Chile Central (Juncal) durante el verano de los años 2011 y 2012. Se registró la abundancia relativa de tres fenotipos florales (flores sin mancha, flores con sólo una mancha, flores con más de una mancha). Además, se registró el número de visitas recibido por cada fenotipo floral, la recompensa en forma de néctar (volumen y concentración) y la producción de semillas. Los resultados muestran que flores con una única mancha no fueron solamente más abundantes, sino que también recibieron más visitas y produjeron una mayor cantidad de néctar y más concentrado que fenotipos alternativos. Sin embargo, la ventaja exhibida por este fenotipo, no se tradujo en una mayor producción de semillas. Es probable que el alto nivel de autogamia que presenta *M. luteus* excluya la ventaja de fenotipos con una sola mancha en el proceso de comunicación planta-animal.

**Palabras claves:** Polinización, guía de néctar, fenotipo floral, preferencia floral.

## ABSTRACT

Pollinators represent a critical selective force on the flowers they visit, in part, due to their ability to discriminate among different phenotypic traits. Flower blots, spots and lines have been traditionally interpreted as traits that guide pollinators towards rewards often concealed within the flower. In spite of the importance of nectar guides for pollinator-flower communication, the mechanisms involved in flower preference have received limited attention in natural populations. The aim of this study is to analyze the pollinator preference (if any) for different flower phenotypes in a population of the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*, and relate such preference with nectar reward levels. *M. luteus* is an herbaceous species that shows a conspicuous nectar guide on the lower lobe of the corolla (a red spot), albeit flowers without guides and with more than one spot are also found within populations. This study was performed in a population of central Chile (Juncal) during the summer seasons of 2011 and 2012. I recorded the relative abundance of three flower phenotypes (flowers without spots, flowers with only one spot, flowers with more than one spot). In addition, I recorded the number of pollinator visits received by each flower phenotype, its nectar reward (nectar volume and concentration), and seed production. Results revealed that flowers with a single spot were not only more abundant, but received more pollinator visits and produced more abundant and concentrated nectar than the alternative phenotypes. The advantage of single-spotted flowers, however, did not translate into higher seed production. It is likely that the high level of autogamy present in *M. luteus* rules out the advantage of single-spotted phenotypes in the animal-plant communication process.

**Keywords:** Pollination, nectar guide, floral phenotype, floral preference.



## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de las especies de angiospermas han adquirido a lo largo de su evolución diversos fenotipos que les permiten atraer a polinizadores. Actualmente es bien conocido que los polinizadores representan una fuerza selectiva crucial sobre las flores que visitan, ya que son capaces de discriminar entre diferentes rasgos fenotípicos intra-poblacionales, tales como aquellos relacionados con la simetría, color, tamaño y forma de las flores, promoviendo así algunas variantes por sobre otras (Faegri y Van der Pijl, 1979; Strauss y col., 1996; Morgan y Conner, 2001; Jones y Reithel, 2001). Es por ello que diversos estudios se han enfocado en analizar la relación existente entre las características florales de las plantas, sus visitantes y las consecuencias reproductivas de las preferencias (e.g., Bateman, 1951; Moller, 1995; Schemske y Bradshaw, 1999; Spaethe y col., 2001; Ishii, 2006; Cares-Suárez y col., 2011).

Un rasgo fenotípico que ha evolucionado, en principio, en relación a la atracción de polinizadores son las llamadas guías de néctar, que corresponden a regiones de la corola que presentan un color contrastante con el fondo de la misma. El contraste de colores entre la guía y la corola hace las flores más conspicuas para sus visitantes, pudiendo orientar las decisiones de polinizadores a una pequeña escala espacial (Sprengel, 1793 citado en Manning, 1956). Por lo tanto, este rasgo puede ser considerado como una especie de señal para los visitantes florales. En algunos casos el contraste de colores ocurre en el espectro ultravioleta, tornando esta señalización indistinguible para el ojo humano (Penny, 1938; Chittka y Reine, 2006). Las señales se encuentran dispuestas en la corola de tal manera que dirigen los polinizadores hacia los nectarios de la flor (Sprengel, 1793 citado en Manning, 1956), minimizando el tiempo de búsqueda y aumentando su eficiencia de forrajeo sobre la recompensa floral. Por lo tanto, este rasgo prevalecería en diversas especies de plantas como una respuesta evolutiva común a la

preferencia de flores cuya recompensa puede ser localizada y extraída de manera eficiente por parte de los polinizadores (Waser, 1983).

A pesar de la importancia de las guías de néctar para la interacción planta-polinizador, hay pocos trabajos que examinan el rol funcional de tales rasgos en poblaciones naturales (Medel y col., 2003; Botto-Mahan y col., 2004; Pohl y col., 2006; Varela, 2009; Botto-Mahan y col., 2011, Hansen y col., 2012). Una buena proporción de los trabajos sobre esta temática ha sido llevado a cabo en condiciones de laboratorio y/o utilizando flores artificiales. Al ser simplificaciones de la realidad, se pierde información sobre el contexto en el que se desarrollan estas interacciones biológicas, como también de la identidad de los polinizadores que se encuentran realmente participando en la interacción (Waser y Price, 1985; Johnson y Dafni, 1998; Dyer y col., 2006; Ishii, 2006). A pesar de todo, la literatura sugiere que las guías de néctar incrementan la atracción de las flores, pero que ello depende de las características de la señal (posición, olor, forma, tamaño, entre otros) (Manning, 1956; Free, 1970; Medel y col., 2003).

El presente estudio se focaliza en *Mimulus luteus*, una especie herbácea que posee una conspicua mancha roja ubicada generalmente en el lóbulo inferior de la corola que representa una guía de néctar para los polinizadores (Figura 1). Sin embargo, este rasgo floral puede estar presente también en otros pétalos e incluso estar completamente ausente en la corola. Varios estudios han examinado el valor funcional que posee esta mancha como guía de néctar. Para el caso de una población de *M. luteus* ubicada en localidad de Pelambres (IV Región), se han descrito preferencias divergentes de las especies de polinizadores presentes en el lugar. Flores con corola y guías de gran tamaño son visitadas más frecuentemente por insectos en horas de la mañana y por el contrario, flores de corola y guías pequeñas son preferidas por picaflores en horas de la tarde (Medel y col., 2003). Además, la forma de la mancha y no su simetría serían

relevantes a la hora de analizar las preferencias de sus polinizadores (Botto-Mahan y col., 2004). Un aspecto aún desconocido es la relación existente entre el número de manchas (que pueden ir desde completa ausencia hasta una mancha por pétalo en poblaciones naturales), la preferencia de los polinizadores por estos diferentes fenotipos, y la recompensa ofrecida por las variantes fenotípicas a los visitantes florales.



Fig. 1. *Mimulus luteus* y *Centris nigerrima*, uno de los polinizadores más importantes de la especie en el sitio de estudio.

El objetivo general de este estudio es examinar si existe preferencia de los polinizadores por alguno de los fenotipos existentes en la población y si esta preferencia se asocia con los niveles de recompensa ofrecidos respecto a fenotipos alternativos.

Los objetivos específicos son los siguientes: (i) Registrar en terreno la preferencia de los polinizadores de *M. luteus* por los diferentes fenotipos florales, (ii) Analizar la recompensa asociada a cada fenotipo mediante la cuantificación de la cantidad y calidad del néctar y (iii)

Evaluar el éxito reproductivo de los diversos fenotipos florales a nivel de producción de semillas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Sitio de estudio e historia natural

El estudio fue llevado a cabo en el sector de Juncal en Portillo, V Región (32°51'S, 70°08'O, 2398 m.s.n.m.). Este lugar se encuentra en una zona alto-andina y presenta nevadas invernales que cubren completamente el sector. La vegetación corresponde a asociaciones del piso subandino (Hoffmann y col., 1998) e incluye especies como *Chuquiraga oppositifolia* D. Don (Asteraceae), *Brassica campestris* (Brassicaceae), *Verbascum thapsus* L. (Scrophulariaceae), *Solidago chilensis* Meyen. (Asteraceae), *Taraxacum officinale* Weber. (Asteraceae), *Junellia scoparia* Gillies & Hook. (Verbenaceae), *Lathyrus subandinus* Phil. (Fabaceae) y *Senecio glaber* Less. (Asteraceae), entre las más abundantes. En el sector, es posible encontrar parches mono-específicos de *Mimulus luteus* L. (Phrymaceae) (Figura 2). Esta especie corresponde a una herbácea perenne autocompatible que crece en zonas húmedas de Chile hasta los 3650 m.s.n.m. y entre los 29°S y 45°S (von Bohlen, 1995). En Chile florece y fructifica desde Diciembre a Febrero y las plantas producen una a cuatro flores zigomórficas. Sus flores hermafroditas presentan una corola formada por cinco pétalos amarillos lobulados con una mancha roja como guía de néctar ubicada usualmente en el lóbulo inferior (Medel y col., 2003). Tanto la corola, como la guía de néctar no reflejan el espectro UV (Botto-Mahan y col., 2004). En el sitio de estudio se puede encontrar una gran variación en la forma y posición de mancha roja, pudiendo estar presente en más de un pétalo (hasta una mancha por pétalo) o completamente ausente en la corola.



Fig 2. Parches monoespecíficos de *M. luteus* en el sitio de estudio.

## 2.2. Frecuencia de fenotipos florales y preferencia de los polinizadores

En el sitio de estudio se detectó que las flores presentaban un número variable de manchas, por lo que se procedió a realizar un censo en la población durante enero de los años 2011 y 2012. Para ello se muestrearon plantas al azar, registrándose el número de manchas que presentaba una de sus flores (2011:  $n = 355$  plantas; 2012:  $n = 538$  plantas). Asimismo, para controlar por posibles efectos modulares de desarrollo floral se registró la variabilidad intra-planta en el número de señales por flor ( $n = 94$  plantas, Enero 2012). Las frecuencias de cada fenotipo floral en la población fueron comparadas utilizando una prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (Sokal y Rohlf, 1995).

Con el fin de analizar las preferencias de los polinizadores por los fenotipos florales disponibles en el sitio de estudio se registraron las visitas durante el 2011 (27-30 enero: 785,4

min.) y 2012 (7-16 enero:1366,8 min.). Durante ese periodo de tiempo, se realizaron observaciones diarias durante todo el horario de mayor actividad de los polinizadores (9:30-12:00 h. aproximadamente). Una visita fue considerada sólo cuando los polinizadores contactaron la estructura reproductiva de las flores o ingresaron al tubo floral.

Una inspección previa de los datos reveló que la frecuencia de los fenotipos en la población no fue homogénea, encontrándose en mayor proporción el fenotipo que presenta sólo una mancha, siendo las flores con más de una mancha mucho menos representadas en la población. Por lo tanto, para efectos de este estudio, las flores fueron agrupadas en tres categorías: Flores sin mancha (F0), flores con 1 mancha (F1) y flores con 2-5 manchas (F2+). Estos fenotipos naturales permitieron examinar en qué medida la presencia de menos o más de una mancha por flor influyen en la visita de los polinizadores. El número de visitas recibido por cada fenotipo floral fue comparado mediante una prueba de G, utilizando las proporciones observadas de los fenotipos en la población para calcular los valores esperados de visitas (Sokal y Rohlf, 1995). La diversidad de polinizadores fue estimada como el número de especies visitantes  $S_{obs}$  (Mao Tao) y por medio del Índice  $H'$  de Shannon-Wiener (Gotelli y Colwell, 2001). Ambos índices fueron calculados con un intervalo de confianza del 95%, obtenido después de 500 corridas y muestras aleatorias con remplazo, usando el software EstimateS versión 7.5.2 (Colwell, 2009). Los datos fueron analizados con una prueba de t de a pares con ajuste de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1995).

### *2.3. Cantidad y calidad del néctar*

Con el fin de examinar posibles variaciones en recompensa entre los fenotipos florales se midió el volumen y la concentración del néctar de las flores en enero del 2012. Utilizando microcapilares (volumen = 10  $\mu$ L; longitud = 60 mm.) se tomaron muestras de néctar de

plantas (una flor recién abierta por planta) pertenecientes a los diferentes fenotipos florales (F0=34 flores, F1=22 flores, F2+= 86 flores). El muestreo fue realizado en un periodo de 6 días corridos entre las 7:30 y 9:00 h, horario durante el cual el sol matinal aún no cubre el sitio de estudio y no hay polinizadores activos. Cada día se colectó néctar desde todos los fenotipos florales. Las muestras fueron medidas utilizando un caliper (precisión 0,01) y luego esta medida fue extrapolada a volumen mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen muestra} = \text{Volumen capilar} * \text{longitud muestra} / \text{longitud capilar}$$

La concentración de azúcares fue evaluada utilizando un refractómetro digital, para lo cual el néctar fue diluido en 20  $\mu\text{L}$  debido al bajo volumen presente en las flores. El volumen y la concentración de azúcar en el néctar de cada fenotipo floral fue comparado por separado, mediante un ANDEVA de una vía y utilizando una prueba *a posteriori* de Tukey. Los datos fueron transformados con logaritmo para satisfacer los requerimientos de la estadística paramétrica (Sokal y Rohlf, 1995).

#### 2.4. Éxito reproductivo

Durante enero de 2012 se marcaron flores correspondientes a cada uno de los fenotipos florales presentes en terreno (una flor por planta, flores independientes a las del punto 2.2) y luego, aproximadamente 1 mes después, se recolectaron sus cápsulas (F0=21 flores, F1=20 flores, F2+ = 45 flores). Posteriormente en el laboratorio, se realizó el conteo de semillas con el fin de evaluar el éxito reproductivo asociado a cada fenotipo. Las semillas fueron dispuestas en una placa Petri y luego fotografiadas, realizándose el conteo sobre estas fotografías. El número de semillas por fenotipo floral fue comparado mediante un ANDEVA de una vía, utilizando una prueba *a posteriori* de Tukey. Los datos fueron transformados con logaritmo para satisfacer los requerimientos de la estadística paramétrica (Sokal y Rohlf, 1995).



## RESULTADOS

### 3.1. Frecuencia de fenotipos florales y preferencia de polinizadores

La frecuencia de los fenotipos en la población fue consistentemente distinta a lo esperado por azar en cada año analizado (2011:  $\chi^2 = 636,80$ ;  $P < 0,001$ ; 2012:  $\chi^2 = 350,37$ ;  $P < 0,001$ ), encontrándose en mayor proporción el fenotipo que presenta sólo una mancha (Figura 3). La variabilidad intra-planta encontrada en el número de manchas fue baja. El 86,2% de las plantas (81 plantas) presentó flores con igual número de manchas, mientras que en el 13,8% (13 plantas) las flores tuvieron un número variable de éstas.

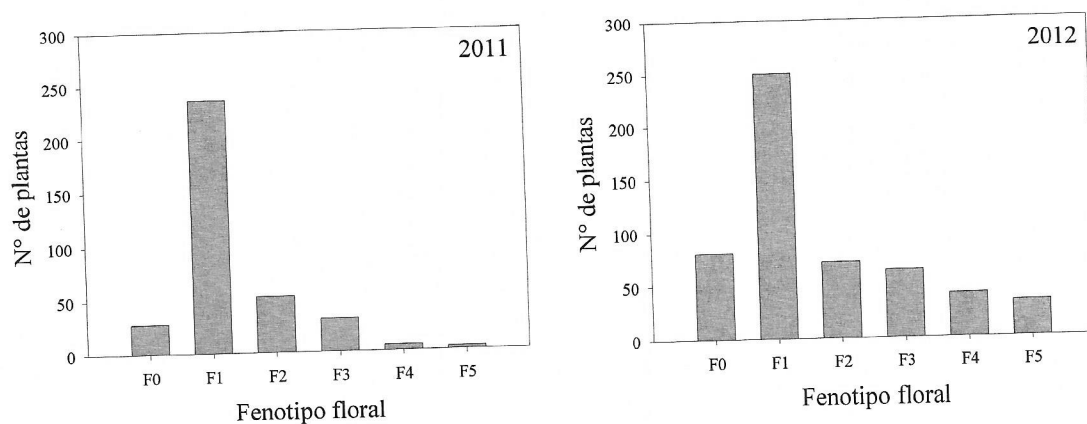


Fig.3. Frecuencia de los fenotipos florales de *M. luteus* en el sitio de estudio, para los años 2011 y 2012. F0 = Flores sin mancha, F1 = Flores con una mancha, F2 = Flores con dos manchas, F3 = Flores con tres manchas, F4 = Flores con cuatro manchas, F5 = Flores con cinco manchas.

El ensamble de polinizadores en el año 2011 estuvo compuesto por cinco especies, correspondientes a cuatro especies de abejas: *Centris nigerrima* (Apidae), *Centris chilensis* (Apidae), *Megachile saulcyi* (Megachilidae) y *Megachile semirrufa* (Megachilidae) y una especie de picaflor: *Oreotrochilus leucopleurus* (Trochilidae). En el año 2012, el ensamble de polinizadores estuvo compuesto por seis especies de abejas: *Centris nigerrima* (Apidae),

*Centris chilensis* (Apidae), *Megachile saulcyi* (Megachilidae), *Megachile semirrufa* (Megachilidae), *Bombus terrestris* (Apidae) y *Bombus dahlbomii* (Apidae). Para el año 2011 la especie más importante en términos de visitas fue *M. saulcyi* (41,2%) y en 2012 la especie predominante fue *C. nigerrima* (69,4 %) (Figura 4).

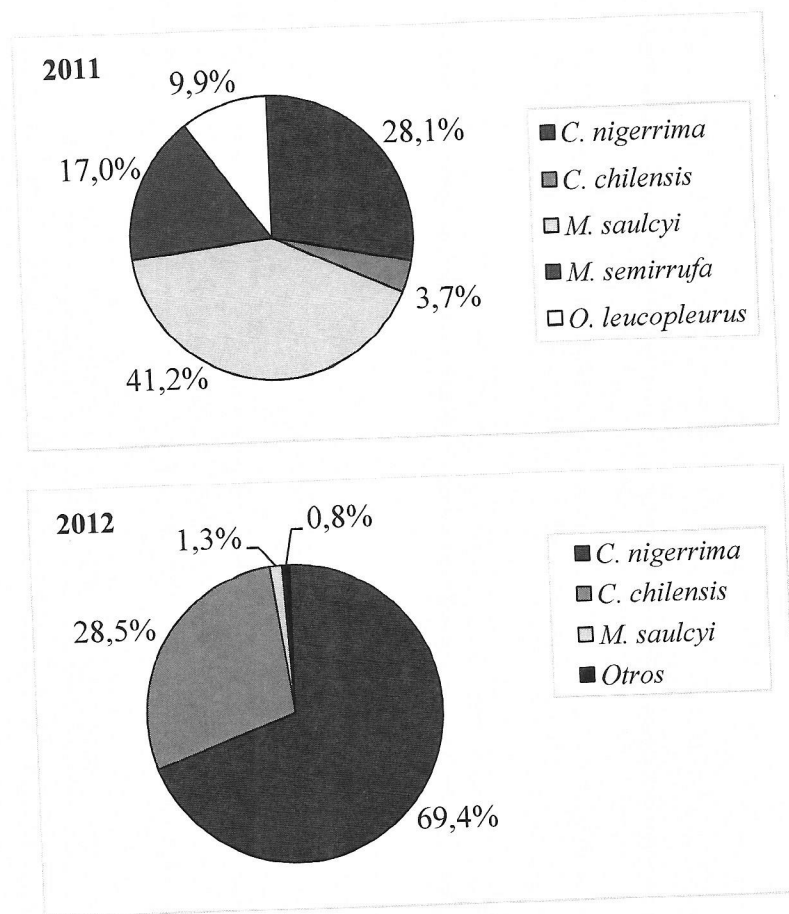


Fig. 4. Contribución de cada especie (en término de visitas) al servicio total de polinización de *M. luteus*. 2011: N° total de visitas = 356. 2012: N° total de visitas = 2455, *Otros* incluye a las especies *B. terrestris*, *B. dahlbomii* y *M. semirrufa*.

A nivel global del ensamble, los polinizadores visitaron en una frecuencia mayor que la esperada por azar a las flores con sólo una mancha. Por otro lado, la frecuencia de visitas a flores sin mancha o con más de una, fue menor que la esperada de acuerdo a su abundancia relativa. Esta situación pudo ser observada durante los dos años de estudio (2011:  $G_{adj} =$

36,01;  $P < 0,001$ ; 2012:  $G_{adj} = 214,53$ ;  $P < 0,001$ ; Figura5). Asimismo, al comparar entre los diferentes fenotipos florales, se pudo observar durante los dos años de estudio que flores con una única mancha fueron visitadas con mayor frecuencia que flores sin mancha con más de una (2011: F1/F0:  $G_{adj} = 18,49$ ;  $P < 0,001$ ; F1/F2:  $G_{adj} = 21,71$ ;  $P < 0,001$ ; 2012: F1/F0:  $G_{adj} = 43,51$ ;  $P < 0,001$ ; F1/F2:  $G_{adj} = 201,37$ ;  $P < 0,001$ ). En el año 2011 flores sin mancha fueron visitadas con la misma frecuencia que flores con más de una mancha ( $G_{adj} = 3,045$ ;  $P = 0,081$ ), mientras que en el año 2012 flores sin manchas recibieron una mayor cantidad de visitas que flores con más de una ( $G_{adj} = 21,60$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 5).

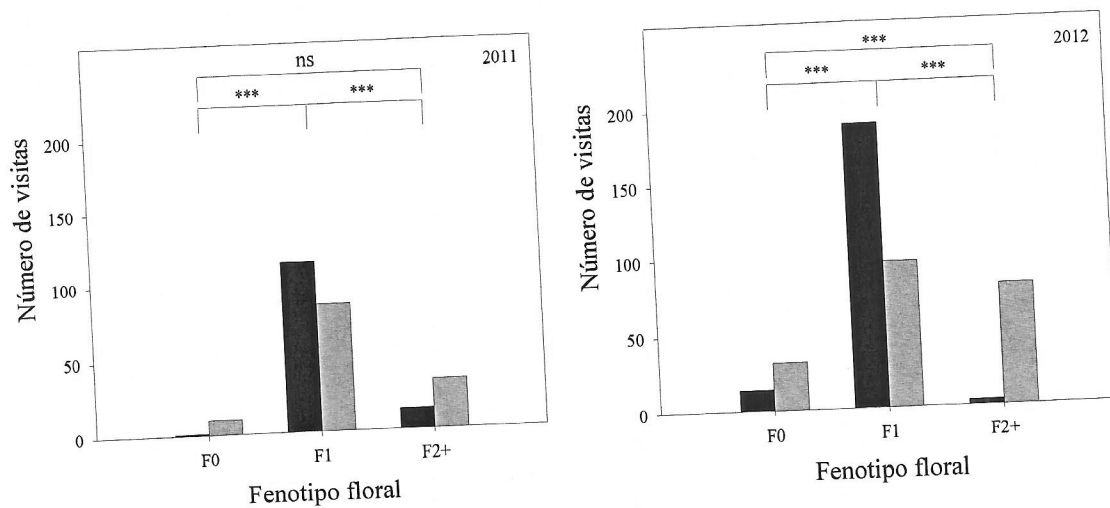


Fig.5. Número de visitas del ensamble global de polinizadores a flores sin mancha (F0), a flores con una mancha (F1) y a flores con dos a cinco manchas (F2+) durante los años 2011 y 2012. Barras grises indican el número observado de visitas a cada fenotipo floral de acuerdo a su abundancia relativa en la población. \*\*\*  $P < 0,001$ ; ns = no significativo.

En el año 2011 la riqueza de especies fue mayor en fenotipos con una única mancha comparado con flores que carecen de ella ( $t = 3,23$ ; g.l. = 10;  $P = 0,009$ ), mientras que no hubo diferencias en la riqueza con respecto al fenotipo que posee más de una mancha (F1/F2+:  $t = 1,14$ ; g.l. = 10;  $P = 0,280$ ; F0/F2+:  $t = 2,23$ ; g.l. = 10;  $P = 0,050$ ). Por el contrario, en el año

2012 la riqueza de especie fue mayor en fenotipos que poseen una mancha comparado con flores que poseen más de una ( $t = 3,12$ ; g.l. = 10;  $P = 0,010$ ), mientras que flores sin mancha no presentaron diferencias en cuanto a la riqueza de especies de su ensamble de polinizadores (F1/F0:  $t = 1,23$ ; g.l. = 10;  $P = 0,249$ ; F0/F2+:  $t = 1,96$ ; g.l. = 10;  $P = 0,078$ ). Sin embargo, no hubo diferencias en la diversidad de polinizadores al comparar entre los distintos fenotipos florales (2011: F1/F0:  $t = 2,32$ ; g.l. = 10;  $P = 0,042$ ; F1/F2+:  $t = 1,31$ ; g.l. = 10;  $P = 0,221$ ; F0/F2+:  $t = 1,68$ ; g.l. = 10;  $P = 0,124$ ; 2012: F1/F0:  $t = 1,66$ ; g.l. = 10;  $P = 0,128$ ; F1/F2+:  $t = 2,32$ ; g.l. = 10;  $P = 0,042$ ; F0/F2+:  $t = 0,75$ ; g.l. = 10;  $P = 0,471$ ) (Tabla 1).

Tabla 1. Riqueza y diversidad de polinizadores para las tres categorías florales en estudio.

Fenotipo floral	Riqueza polinizadores ( $S_{obs}$ promedio $\pm$ DE)		Diversidad polinizadores ( $H'$ promedio $\pm$ DE)	
	2011	2012	2011	2012
F0	$2,82 \pm 0,94^a$	$3,33 \pm 0,89^{ab}$	$0,54 \pm 0,38^a$	$0,67 \pm 0,31^a$
F1	$5,00 \pm 1,36^b$	$4,00 \pm 1,00^a$	$0,90 \pm 0,00^a$	$0,88 \pm 0,00^a$
F2+	$4,17 \pm 1,15^{ab}$	$2,37 \pm 0,80^b$	$0,82 \pm 0,15^a$	$0,52 \pm 0,38^a$

Nota. F0 = Flores sin mancha; F1 = Flores con una mancha; F2+ = Flores con dos a cinco manchas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fenotipos florales,  $P \leq 0,01$  (ajuste de Bonferroni,  $\alpha = 0,017$ ).

Al analizar las preferencias del polinizador más importante de cada año (2011: *M. saulcyi*; 2012: *C. nigerrima*, Figura 4), se pudo observar una tendencia similar al presentado por el ensamble completo de polinizadores. Ambas especies visitaron con una frecuencia mayor a la esperada por azar las flores con una única mancha y con menor frecuencia que la esperada a las flores sin manchas o con más de una (*M. saulcyi*:  $G_{adj} = 23,83$ ;  $P < 0,001$ ; *C. nigerrima*:  $G_{adj} = 131,48$ ;  $P < 0,001$ ; Figura 6). En el caso de *M. saulcyi*, se observó una menor frecuencia de visitas sobre los fenotipos extremos (i.e., con dos o más manchas y sin mancha) que sobre flores con una mancha (F1/F0:  $G_{adj} = 11,59$ ;  $P < 0,001$ ; F1/F2:  $G_{adj} = 41,74$ ;  $P < 0,001$ ). Sin

embargo, esta especie no discriminó entre flores sin manchas y con más de una ( $G_{adj} = 1,55$ ;  $P = 0,2131$ ). De igual manera, *C. nigerrima* visitó con mayor frecuencia fenotipos con una mancha comparado con flores sin manchas y con más de una (F1/F0:  $G_{adj} = 11,59$ ;  $P < 0,001$ ; F1/F2:  $G_{adj} = 41,74$ ;  $P < 0,001$ ). Sin embargo, al contrario de *M. saulcyi*, *C. nigerrima* discriminó entre flores sin manchas y con más de una, visitando a estas últimas con una frecuencia menor ( $G_{adj} = 24,69$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 6).

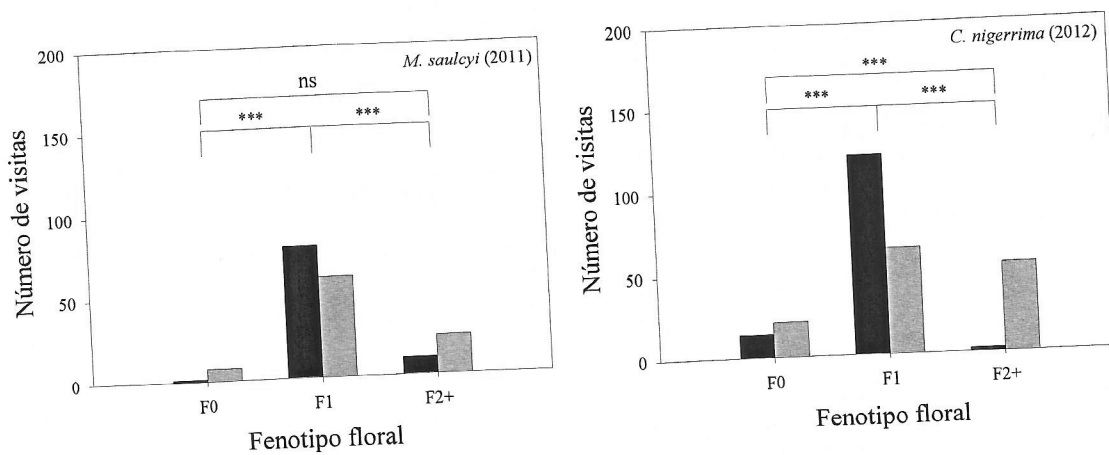


Fig.6. Número de visitas del polinizador más frecuente en cada año de estudio, *M. saulcyi* en el 2011 (derecha) y *C. nigerrima* en el 2012 (izquierda). Barras negras representan el número observado de visitas a flores sin manchas (F0), a flores con una sola mancha (F1) y a flores con dos a cinco manchas (F2+). Barras grises indican el número esperado de visitas a cada uno de los fenotipos florales mencionados anteriormente. \*\*\*  $P < 0,001$ ; ns = no significativo.

### 3.2. Cantidad y calidad del néctar

El volumen de néctar presente en flores con una sola mancha rojafue mayor que en flores sin manchas y con más de una (promedio  $\pm$  EE ( $\mu$ L): F0 =  $1,47 \pm 0,20$ ; F1 =  $2,82 \pm 0,69$ ; F2+ =  $1,60 \pm 0,14$ ;  $F_{2,142} = 4,17$ ;  $P = 0,017$ ; Figura 7). Una situación similar ocurrió con la concentración de azúcar. Flores que poseen sólo una mancha presentaron un néctar más concentrado que flores sin manchas y con más de una (promedio  $\pm$  EE ( $^{\circ}$ Brix): F0 =  $0,018 \pm$

0,005;  $F_1 = 0,089 \pm 0,031$ ;  $F_{2+} = 0,030 \pm 0,005$ ;  $F_{2,142} = 7,04$ ;  $P = 0,0012$ ; Figura 7). Por lo tanto, flores con una sola mancha roja producen una mejor recompensa en comparación a los fenotipos alternativos.

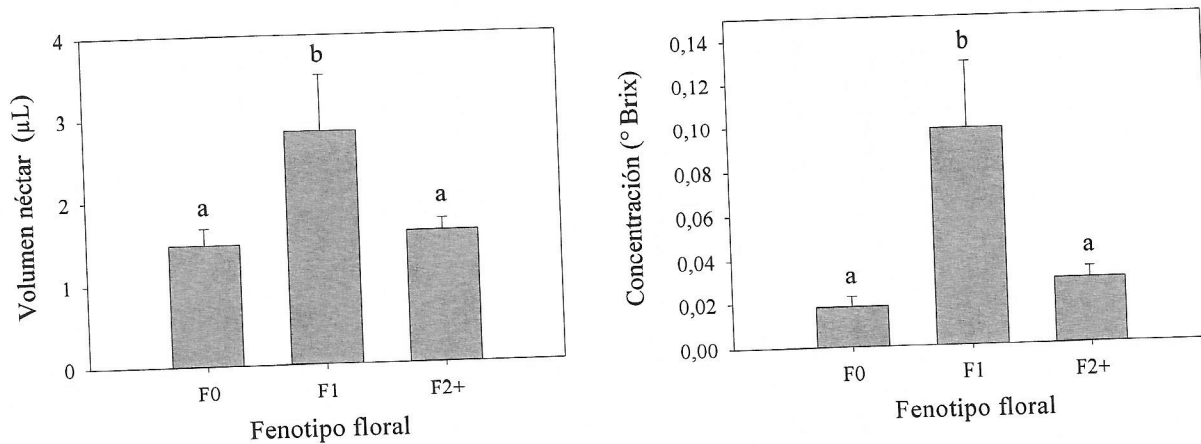


Fig.7. Volumen(izquierda) y concentración (derecha) de néctar por flor de *M. luteus* (promedio  $\pm$  EE), correspondiente a flores sin mancha (F0), flores con una mancha (F1) y flores con más de una mancha (F2+). Las barras muestran el promedio y un error estándar. Diferentes letras señalan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre fenotipos de acuerdo a una prueba *a posteriori* de Tukey.

### 3.3. Éxito reproductivo

Aunque se observó una tendencia a disminuir la producción de semillas promedio con el número de manchas (Figura 8), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos (promedio  $\pm$  EE:  $F_0 = 906,86 \pm 147,91$ ;  $F_1 = 529,10 \pm 111,07$ ;  $F_{2+} = 389,40 \pm 71,60$ ;  $F_{2,86} = 2,75$ ;  $P = 0,07$ ). Por lo tanto, flores sin mancha, con una o más manchas presentan un éxito reproductivo similar a nivel de semillas.

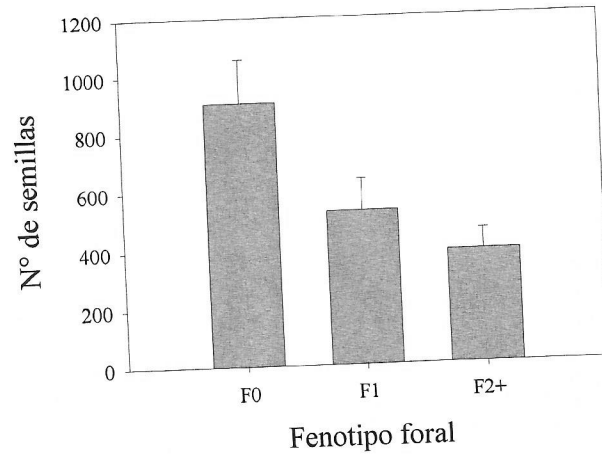


Fig.8. Número de semillas por flor de *M. luteus* (promedio  $\pm$  EE), correspondiente a flores sin mancha (F0), flores con una sola mancha (F1) y flores con más de una mancha (F2+).

## DISCUSIÓN

En este estudio se examinó la asociación señal-recompensa en un sistema de múltiples probables señales florales. Varios trabajos han demostrado la importancia de las guías de néctar y su valor adaptativo y evolutivo dentro de la comunicación planta-animal (Manning, 1956; Schemske y Bradshaw, 1999; Medel y col., 2003; Botto-Mahan y col., 2004; Hansen y col., 2012). Los resultados de este estudio muestran claramente que la preferencia de los polinizadores por las flores de *M. luteuses* contingente al número de manchas presentes en la corola. Flores que carecen de la mancha roja reciben menos visitas que lo esperado por azar. Asimismo, flores sin esta mancha reciben menos visitas que flores que poseen una única mancha (F1). De igual manera, flores con un exceso de manchas rojas (F2+) reciben también un número reducido de visitas, lo cual sugiere que una única mancha en el lóbulo inferior de las flores es el estado óptimo en la interacción polinizador-planta en este sistema y corresponde al rasgo que verdaderamente actúa como señal para los polinizadores. La disminución de las visitas se debe a la reducción de la riqueza de especies visitantes a fenotipos extremos (i.e., flores con dos o más manchas y que carecen de ella) comparado con flores que poseen una guía de néctar (Tabla 1). Lo anterior, sumado a que existe una fuerte disminución de las visitas de los polinizadores más importantes del ensamble, *M. saulcyi* (2011) y *C. nigerrima* (2012), a estos fenotipos extremos (Figura 6). Un aspecto interesante es que *M. saulcyi* no presenta una elección diferencial entre flores que carecen de manchas y las que poseen más de una, mientras que *C. nigerrima* prefiere flores sin manchas por sobre las que poseen más de una señal (Figura 6). Diferencias entre las preferencias generales de abejas y abejorros han sido señaladas con anterioridad, (Manning, 1956; Leppik, 1953; Free, 1970; Møller, 1995), lo cual sugiere que la elección floral varía de acuerdo a la especie de polinizador en estudio.



Estudios anteriores indican que los polinizadores prefieren flores que presentan alguna clase de señal visual en la corola por sobre flores que no la poseen (Scora, 1964; Free, 1979; Kandori y Ohsaki 1998; Varela, 2009; Hansen y col., 2012), lo cual es consistente con la menor frecuencia de visitas observada para fenotipos que carecen de la guía de néctar roja en la población de *M. luteus* estudiada. Lo anterior, podría implicar que la inexistencia del estímulo no permitiría a los polinizadores orientarse e identificar las flores. Por otra parte, se sabe que los polinizadores son selectivos cuando se trata de señales, pudiendo diferenciar entre patrones de líneas continuas y puntos (Free, 1970), patrones circulares, simétricos (Lehrer y col, 1995), dependiendo de la forma de la señal (Botto-Mahan y col., 2004), entre otras características. Por lo tanto en este caso, la presencia de más de una mancha roja podría ser considerada un distractor que interfiere en el proceso de identificación de las flores y en el aterrizaje sobre ellas. Una única mancha en el lóbulo inferior señalaría con mayor precisión el lugar de aterrizaje para los polinizadores que los guiaría directamente hacia los nectarios de la flor, optimizando así el tiempo de búsqueda y manipulación de éstas. El aumento de la eficiencia de forrajeo debido a la presencia de guías de néctar ha sido reportado para mariposas por Kandori y Ohsaki (1998), quienes demuestran que las guías de néctar provocan la extensión innata de la probóscide de la mariposa, lo cual contribuye a localizar la recompensa.

En este trabajo se detectó que flores con una sola mancha roja producen néctar en mayores cantidades y más concentrado que flores sin esta mancha y con más de una (Figura 7). Consecuentemente, se puede decir que en este sistema existe una relación consistente entre la recompensa y el fenotipo floral más visitado.

Es bien conocido que los polinizadores muestran habilidades cognitivas que les permiten adquirir conocimiento asociativo del vínculo entre estímulos visuales u olfativos y la

recompensa asociada (Menzel, 1990; Menzel y Müller, 1996; Kandori y Ohsaki, 1998; Prabhu y Cheng, 2008; ver revisión en Schaefer y Ruxton, 2011). Por lo tanto, además del proceso de orientación a pequeña escala que implicaría una única mancha roja en las flores, la preferencia de los polinizadores por estos fenotipos sugiere la existencia de un proceso de aprendizaje de forrajeo sobre las flores que proporcionan una mayor cantidad y calidad de recursos. Cabe señalar que los resultados de este estudio fueron obtenidos en un sistema natural con polinizadores probablemente experimentados. Futuros estudios con polinizadores nativos sin experiencia y en condiciones controladas podrían ayudar a dilucidar si efectivamente las respuestas a las guías de néctar que son observadas en condiciones naturales son innatas o forman parte de un proceso de aprendizaje previo.

Si bien el néctar es el tipo de recompensa más comúnmente estudiada, existen otros estímulos para los polinizadores que no fueron abordados en este estudio. Por ejemplo, es conocido que recompensas en forma de aceites, polen, refugio, calor, entre otras, podrían influir en la toma de decisiones de los polinizadores (Seymour y col, 2003; Dyer y col, 2006; Sapir y col, 2006; Schaefer y Ruxton, 2011). Asimismo, se ha documentado que distintas partes de la flor (pétalos, estambres, sépalos, polen) poseen diferentes esencias (Bergström y col., 1995) y que las guías de néctar a menudo se encuentran asociadas a esencias diferentes a la del resto de los pétalos (Lex, 1957). Por ello, además de un mayor volumen y una mejor calidad de néctar, los fenotipos florales con una única mancha podrían estar también correlacionados con otras recompensas atractantes no cuantificados en este estudio.

A pesar de que varios estudios señalan que el éxito reproductivo de las plantas se ve afectado por la elección floral de los polinizadores (Krupnick y col., 1999; Strauss y col., 1996; Strauss, 1997; Pohl y col, 2006; Sánchez-Lafuente, 2007), esto no se observó en el presente trabajo, al menos en el componente femenino del éxito reproductivo. Flores con sólo una

mancha, que recibieron la mayoría de las visitas por parte de los polinizadores, no produjeron una cantidad mayor de semillas en comparación con el resto de los fenotipos (Figura 8). La inexistencia de diferencias en la producción de semillas entre las tres categorías florales, puede ser producto de que *M. luteus* es una especie que presenta un alto nivel de autogamia, lo cual ha sido documentado en otras poblaciones ubicadas en la localidad de el Yeso (Pohl y col., 2006) y en el Parque Nacional El Morado (Carvallo y Medel, 2010). Sin embargo, un punto importante y que no fue examinado en este trabajo, se refiere a la calidad de las semillas (tamaño y peso) y su tasa de germinación. Es posible que flores con una única mancha roja tengan una mayor tasa de entrecruzamiento y menor depresión por endogamia que los fenotipos alternativos. Esta situación ha sido reportada en estudios con *Mimulus guttatus*, donde se ha visto que la germinación de semillas producidas por autofecundación es menos probable que la de semillas producidas por exogamia (Willis, 1993). Esta posible germinación diferencial de las semillas dependiendo del origen, junto con la mayor preferencia de los polinizadores por flores con una mancha, podría explicar la distribución de frecuencia de los fenotipos que se observa en la población, en donde el fenotipo con una única mancha roja se encuentra sobrerrepresentado (Figura 3).

## CONCLUSIONES

Los polinizadores de *M. luteus* en el sitio de estudio muestran claras preferencias por las flores con una única mancha roja en el lóbulo inferior. Tales preferencias se correlacionaron con la cantidad y calidad de la recompensa ofrecida por los diferentes fenotipos florales. Por lo tanto, una única mancha en el lóbulo inferior señalaría a los polinizadores el lugar en donde éstos pueden aterrizar y así dirigirse hacia los nectarios de la flor. Adicionalmente, esta señal también sería indicadora de una mayor recompensa (néctar más concentrado y más abundante). Es posible que este fenómeno se asocie a un proceso de asociación señal-recompensa donde los polinizadores aprendan a forrajear sobre las flores que otorguen un mayor beneficio. A pesar de que la composición del ensamble y la identidad de los polinizadores más importantes cambian entre años, las preferencias por el fenotipo floral con una única mancha roja se mantienen.

La preferencia de los polinizadores por flores con una mancha no se tradujo en un mayor éxito reproductivo femenino de este fenotipo respecto a los alternativos. Es probable que el alto nivel de autogamia presentado por *M. luteus* diluya las consecuencias reproductivas de la asociación señal-recompensa-preferencia en este sistema. Es posible, sin embargo, que esta asociación se exprese en algún componente del fitness no cuantificado en este estudio (componente masculino). De igual manera, es posible que exista una germinación diferencial de las semillas provenientes de los fenotipos preferidos respecto a los alternativos, lo cual podría dar cuenta de la mayor abundancia de flores con una sola mancha roja en la población.

## REFERENCIAS

- Bateman, A.J. 1951. The taxonomic discrimination of bees. *Heredity* 5: 271-278.
- Bergström, G., Dobson, H., Groth, I. 1995. Spatial fragrance patterns within the flowers of *Ranunculus acris* (Ranunculaceae). *Plant. Syst.Evol.* 195: 221-242.
- Botto-Mahan, C., Pohl, N., Medel, R. 2004. Nectar guide fluctuating asymmetry does not relate to female fitness in *Mimulus luteus*. *Plant. Ecol.* 174: 347-352.
- Botto-Mahan, C., Ramírez, P.A., Ossa, C.G., Ojeda-Camacho, M., Medel, R., González, A.V. 2011. Floral herbivory affects female reproductive success and pollinator visitation in the perennial herb *Alstroemeria ligtu* (Alstroemeriaceae). *Int. J. Plant Sci.* 172: 1130-1136.
- Cares-Suárez, R., Poch, T., Acevedo, R.F., Acosta-Bravo, I., Pimentel, C., Espinoza, C., Cares, R.A., Muñoz, P., González, A.V., Botto-Mahan, C. 2011. Do pollinators respond in a dose-dependent manner to flower herbivory?: an experimental assessment in *Loasa tricolor* (Loasaceae). *Gayana Bot.* 68: 176-181.
- Carvalho, G., Medel, R. 2010. Effects of herkogamy and inbreeding on the mating system of *Mimulus luteus* in the absence of pollinators. *Evol. Ecol.* 24:509-522.
- Chittka, L., Raine, N.E. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Curr.Opin.Plant. Biol.* 9: 428-435.
- Colwell, R.K. 2009. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples, version 7.5.2.  
URL: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS/EstimateSPages/EstimateS.php>. Visitado: 26 Julio, 2012.
- Dyer, A.G., Whitney, H.M., Arnold, S.E.J., Glover, B.J., Chittka, L. 2006. Bees associate warmth with floral colour. *Nature* 442: 525.
- Faegri, K., Van der Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, New York.
- Free, J.B. 1970. Effect of flower shapes and nectar guides on the behaviour of foraging honeybees. *Behaviour* 37: 269-285.
- Gotelli, N.J., Colwell, R.K. 2001. Quantifying biodiversity, procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4: 379-391.
- Hansen, D.M., Van der Niet, T., Johnson S.D. 2012. Floral signposts: testing the significance of visual 'nectar guides' for pollinator behaviour and plant fitness. *Proc. R. Soc.B* 279: 634-639.

- Hoffmann, A.E., Arroyo, M.K., Liberona, F., Muñoz, M., Watson, J. 1998. Plantas altoandinas en la flora silvestre de Chile. Santiago de Chile.
- Ishii, H.S. 2006. Floral display size influences subsequent plant choice by bumble bees. *Funct. Ecol.* 20: 233-238.
- Johnson, S.D., Dafni, A. 1998. Response of bee-flies to the shape and pattern of model flowers: implications for floral evolution in a Mediterranean herb. *Funct. Ecol.* 12: 289-297.
- Jones, K.N., Reithel, J.S. 2001. Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 88: 447-454.
- Kandori, I., Ohsaki, N. 1998. Effect of experience on foraging behavior towards artificial nectar guide in the cabbage butterfly, *Pieris rapae crucivora* (Lepidoptera: Pieridae). *Appl. Ent. Zool.* 33: 35-42.
- Krupnick, G.A., Weis, A.E., Campbell, D.R. 1999. The consequences of floral herbivory for pollinator service to *Isomeris arborea*. *Ecology* 80: 125-134.
- Lehrer, M., Horridge, G.A., Zhang, S.W., Gadagkar, R. 1995. Shape vision in bees: innate preference for flower-like patterns. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 347: 123-137.
- Leppik, E.E. 1953. The ability of insects to distinguish number. *Am. Nat.* 87: 229-236.
- Lex, T. 1954. Duft maleanblüten. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 36: 212-234. En Free, J.B. 1970. Effect of flower shapes and nectar guides on the behaviour of foraging honeybees. *Behaviour* 37: 269-285.
- Manning, A. 1956. The effect of honey-guides. *Behaviour* 9: 114-139.
- Medel, R., Botto-Mahan, C., Arroyo, M. K. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology* 84: 1721-1732.
- Menzel, R. 1990. Learning, memory and "cognition" in honeybees. En R.P. Kesner y D.S. Olten (eds). *Neurobiology of Comparative Cognition*. pp 237-292. Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Menzel, R., Müller, U. 1996. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 379-404.
- Møller, A.P. 1995. Bumblebee preference for symmetrical flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2288-2292.
- Morgan, M.T., Conner, J.K. 2001. Using genetic markers to directly estimate male selection gradients. *Evolution* 55: 272-281.
- Penny, J.H.J. 1983. Nectar guide colour contrast: a possible relationship with pollination strategy. *New Phytol.* 95: 707-721.

- Pohl, N., Carvallo, G., Botto-Mahan, C., Medel, R. 2006. Nonadditive effects of flower damage and hummingbird pollination on the fecundity of *Mimulus luteus*. *Oecologia* 149: 648-655.
- Prabhu, C., Cheng, K. 2008. One day is all it takes: circadian modulation of the retrieval of colour memories in honeybees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63: 11-22.
- Sánchez-Lafuente, A.M. 2007. Corolla herbivory, pollination success and fruit predation in complex flowers: an experimental study with *Linaria lilacina* (Scrophulariaceae). *Ann. Bot. London* 99: 355-364.
- Sapir, Y., Shmida, A., Ne'eman, G. 2006. Morning floral heat as a reward to the pollinators of the *Oncocyclus irises*. *Oecologia* 147: 53-59.
- Schaefer, H.M., Ruxton, G.D. 2011. *Plant-animal communication*. Oxford Press, Oxford.
- Schemske, D. W., Bradshaw, H. D. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11910-11915.
- Seymour, R.S., Gibernau, M., Ito, K. 2003. Thermogenesis and respiration of inflorescences of the dead horse arum, *Helicodiceros muscivorus*, a pseudo thermoregulatory aroid associated with fly pollination. *Funct. Ecol.* 17: 886-894.
- Scora, R.W. 1964. Dependency of pollination on patterns in *Monarda* (Labiatae). *Nature* 204: 1011-1012.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman & Company, New York.
- Spaethe, J., Tautz, J., Chittka, L. 2001. Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3898-3903.
- Sprengel, C.K. 1793. *Das entdeckte Geheimnis der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen*. En Manning, A. 1956. The effect of honey-guides. *Behaviour* 9: 114-139.
- Strauss, S.Y., Conner, J.K., Rush, S.L. 1996. Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant fitness. *Am. Nat.* 147: 1098-1107.
- Strauss, S.Y. 1997. Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. *Ecology* 78: 1640-1645.
- Varela, C. 2009. Efecto de las guías de néctar sobre la eficiencia de polinización en *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *Darwiniana* 47: 271-277.
- von Bohlen, C. 1995. El género *Mimulus* L. (Scrophulariaceae) en Chile. *Gayana Bot.* 52: 7-28.

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

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.

Willis, J.H. 1992. Partial self-fertilization and inbreeding depression in two populations of *Mimulus guttatus*. *Heredity* 71: 145-154.