

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN LAS PLANTAS SUPERIORES

Introducción a las metodologías empleadas en su estudio

Por: *Linda de Escobar (1)*
Mercedes Girón (2)

INTRODUCCION

El conocimiento de la biología reproductiva de una especie vegetal es indispensable para su explotación comercial y aunque las especies de mayor comercio en el mundo ya han sido objeto de muchas investigaciones con miras a aumentar su producción, existen aún, sobre todo a nivel de los trópicos, un sinnúmero de especies utilizadas localmente que tienen grandes perspectivas para una mayor explotación.

Como el manejo y explotación de estas plantas depende de un buen conocimiento y manipulación de los sistemas de reproducción y dado que las metodologías para el estudio de estos sistemas son, en su mayor parte, sencillas, se presentan a continuación algunas de las técnicas empleadas en el estudio de la biología reproductiva de las plantas superiores.

SISTEMAS DE REPRODUCCION

La inmensa mayoría de las plantas útiles al hombre son Angiospermas, o sea, plantas que producen flores. Por lo general se propagan por mecanismos sexuales, a través de la transferencia de los granos de polen (microesporas), al estigma de la flor (proceso conocido como polinización). El grano de polen germina y produce el tubo polínico, el cual crece a través del estilo y ovario de la flor, llevando el espermatozoide al óvulo, donde se une con una célula haploide, el huevo. Al efectuarse la unión del espermatozoide con el huevo, se recupera la condición diploide y el embrión, rodeado por sustancias alimenticias y una capa protectora, forma la semilla.

Además de este proceso usual, existen en las plantas muchas otras formas de reproducción como puede apreciarse en el Cuadro 1. Sin ignorar la importancia de la propagación vegetativa, sobre todo en algunas familias de plantas, las técnicas aquí descritas sirven para detectar y analizar sistemas de agamospermia, autogamia, autoincompatibilidad y xenogamia, a la vez que se explican algunos métodos para analizar sistemas de polinización.

Como puede apreciarse, los métodos descritos presuponen que las plantas bajo estudio producen flores que abren y que son visitadas por alguna clase de polinizador. Pero no siempre es así. Hay flores que nunca abren y sin embargo se efectúa una autopolinización dentro de la flor cerrada (cleistogamia), como sucede en el caso del maní. Además, puede suceder que la flor abra pero que no sea visitada por ningún polinizador y sin embargo produce frutos y semillas. En este caso habría que hacer observaciones muy cuidadosas de los movimientos de las anteras con respecto al estigma de la misma flor, ya que posiblemente se efectúa una autopolinización sin intervención de ningún agente de polinización.

También puede suceder que la flor abra, que sea visitada por un polinizador, que se efectúe o no la polinización, pero que no se efectúe la fecundación. A pesar de no producirse la fecundación, la flor produce fruto y semillas (agamospermia). Esta última clase de reproducción es asexual y uniparental, ya que el embrión se forma a partir de alguna célula diploide y no a través de la unión de dos células haploides.

1) Profesora, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín — Colombia.
2) Estudiante, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín — Colombia.

CUADRO 1
SISTEMAS DE REPRODUCCION VEGETAL

SISTEMAS DE REPRODUCCION	EJEMPLOS
<i>Reproducción asexual</i> (<i>Reproducción uniparental</i>)	<i>Sin meiosis y sin unión de células haploides</i>
<p>Propagación vegetativa</p> <p>Reproducción por medio de proliferación de células diploides, provenientes de diferentes tejidos de la planta: hojas, tallos, raíces, etc..</p> <p>Agamospermia</p> <p>Reproducción por medio de proliferación de una célula diploide dentro del ovario. Difiere de la propagación vegetativa en que se producen semillas.</p>	<p>Propagación por estacas (caña de azúcar), yemas (papa), tallos (arracacha, yuca), etc..</p> <p>Común en cítricos y en algunos pastos.</p>
<i>Reproducción Sexual</i> (<i>Reproducción uni - o biparental</i>)	<i>Con meiosis y unión de dos células haploides.</i>
<p>Autogamia</p> <p>Unión de células haploides provenientes de una misma flor o de dos flores de una misma planta (resultado de una auto-polinización). Reproducción uniparental.</p> <p>Xenogamia o Heterogamia o Alogamia</p> <p>Unión de células haploides provenientes de plantas diferentes. Resultado de una polinización cruzada). Reproducción biparental.</p>	<p>La gran mayoría de las plantas con flores</p> <p>Depende de la disponibilidad de agentes de polinización (insectos, aves, murciélagos, viento, etc.).</p>

La reproducción asexual tanto por medio de la propagación vegetativa, como por la agamospermia, produce individuos iguales genéticamente a su progenitor, con la diferencia de que en la agamospermia se permite una mayor dispersión de los nuevos individuos a través de la producción de semillas. La reproducción sexual, en cambio, permite nuevas combinaciones genéticas producidas durante el proceso de la meiosis.

En términos de eficiencia, la autogamia representa la forma de reproducción sexual más efectiva, ya que la distancia que tiene que atravesar el polen para llegar al estigma de la mis-

ma flor o de otra flor de la misma planta es mínima. No obstante, se conocen en la naturaleza plantas que son auto-incompatibles, es decir, plantas que no producen semillas después de una autopolinización. Sólo producen semillas después de una polinización cruzada. Este mecanismo que recibe el nombre de xenogamia (conocida también como alogamia o como heterogamia), a pesar de ser menos eficiente, permite una mayor variabilidad genética en los individuos de la población vegetal, variabilidad que debe ser muy importante evolutivamente, ya que existe un buen número de especies parcial o totalmente autoincompatibles.

También existe entre las Angiospermas especies dióicas, es decir, especies en las cuales las flores son unisexuales, o sea, todas masculinas o todas femeninas en una planta dada. Por definición, entonces, no puede presentarse la autogamia en una especie dióica y, por consiguiente, todas las semillas producidas serán producto de la xenogamia. La existencia de especies monóicas, polígamas, y andromonóicas da aún más peso a la hipótesis de que la variabilidad genética es de mucho valor en la supervivencia de las Angiospermas. Si a estos sistemas de reproducción sumamos el número de especies que presentan flores que son hermafroditas pero que son asíncronas en la maduración de los estambres y los pistilos, vemos que son muchas las especies que tienen una reproducción biparental y sólo a través de observaciones y experimentos cuidadosos podremos descifrar su sistema reproductivo.

SISTEMAS DE POLINIZACION

Para que en una especie se efectúe la reproducción biparental es preciso que tenga algún medio de transporte para el polen entre las plantas de la población. El viento es un medio de transporte muy común en ciertos grupos de plantas como las gramíneas y es más común en los desiertos y en zonas templadas que en los trópicos húmedos. A nivel de los trópicos, son más importantes los medios bióticos de polinización; contando con la presencia de insectos, colibríes, murciélagos u otros agentes que visitan las flores en búsqueda de polen, néctar u otra "recompensa" por su visita. Dichas recompensas pueden tener formas tan exóticas como las que reciben las abejas machos que visitan las flores de ciertas orquídeas que se asemejan asombrosamente a la abeja hembra. El macho visita la flor en búsqueda de una pareja y al tratar de copular con la flor se impregna de polen, el cual es llevado a la próxima flor cuando el macho busca otra pareja; efectuando así la polinización cruzada.

No obstante la existencia de recompensas como la descrita, la mayoría de los polinizadores visitan las plantas en búsqueda de alimento y por consiguiente, muchas flores producen cuerpos alimenticios o néctar para atraerlos. La polinización cruzada es más eficiente si el polinizador es "fiel" a un grupo de plantas de la misma especie, es decir, si visita en secuencia las flores de las plantas de una misma especie, en vez de visitar distintas especies en una misma área.

Para ser "fiel" el polinizador tiene que reconocer las flores y encontrar fácilmente la recompensa. Es por ello que encontramos en la naturaleza una correspondencia entre las formas de las flores y la morfología y el comportamiento de los polinizadores que las visitan. En el Cuadro 2 se encuentran algunas de las características de las flores que son adaptaciones para ser polinizadas por un agente específico.

Al reconocer las características de las flores se procede a estudiarlas, según las metodologías que se describen a continuación.

MATERIALES Y EQUIPOS

Lienza.
 Marcadores de tinta indeleble.
 Tubos capilares.
 Regla.
 Polvos fosforescentes.
 Lámpara de luz ultravioleta.
 Bolsas de nylon, de tamaño un poco mayor que el de la flor.
 Bolsas de plástico, de tamaño proporcional al de la flor.
 Cinta de colores.
 Refractómetros.
 Agua destilada.
 Pinceles.
 Cámara fotográfica (opcional).
 Útiles para apuntes.

METODOS

Se deben llevar a cabo durante varios días, cuidadosas observaciones y mediciones que le permitan sacar conclusiones acertadas. Al trasladarse al sitio donde se halla la especie objeto de estudio se debe permanecer allí todo el tiempo que requiera el estudio. Dicho tiempo depende del número de ejemplares y de las características de la especie que se va a observar para que los datos y conclusiones sean confiables.

OBSERVACIONES

1. *Ubicación geográfica:* describa, lo más detalladamente posible, el lugar donde se hallan las plantas; indicando altitud, temperatura promedio, pluviosidad, nombres de la vereda, municipio, departamento o provincia y país.
2. *Descripción de la especie:* explique la configuración general de la planta y sus flores, indicando:
 - a) Número de plantas que existen en la población.
 - b) Número promedio de flores por planta.
 - c) Disposición de las flores en las ramas o tallo (en inflorescencia, formando grupos de flores, solitarias, etc.).
 - d) Orientación de la flor (horizontal o vertical, abierta hacia arriba o hacia abajo).
 - e) Forma y tamaño de la flor (por ejemplo, tubular o plana).
 - f) Color (observe las tonalidades de la flor y si cambian con el tiempo).

CARACTERÍSTICAS DE LAS FLORES QUE LAS ADAPTAN PARA SER
POLINIZADAS POR AGENTES BIOTICOS

<i>Clase de polinizador</i>	<i>Antesis de la flor</i>	<i>Colores predominantes</i>	<i>Fragancia</i>	<i>Forma y diseño de la flor</i>	<i>Otras</i>
Escarabajos	Día y noche	Poco vistosos	Fuerte, desagradable	Actinomorfa, plana	No produce néctar. Si produce polen o cuerpos aliménticos
Moscas de carroña	Día y noche	Morado o verde	Fuerte, de carne en descomposición	Actinomorfa, plana	Con o sin néctar
Moscas (Syrphidae)	Día y noche	Variable	Variable	Generalmente actinomorfa	Con o sin néctar
Abejas	Día o día y noche	Variable, pero casi nunca rojo	Generalmente dulce	Actinomorfa o zigomorfa, con guías hacia el néctar	Néctar presente en buena cantidad
Pollillas nocturnas (Sphingidae)	Noche o crepúsculo	Pálidos	Fuerte, generalmente dulce	Actinomorfa, en forma de tubo angosto y profundo, generalmente horizontales o péndulas	Néctar presente, escondido
Pollillas pequeñas	Noche o al crepúsculo	Pálidos	Generalmente dulce	Como el anterior, pero con tubos menos profundos	Néctar presente, escondido
Mariposas	Día o día y noche	Variable, amarillo con rojo, común	Generalmente dulce	Actinomorfas, generalmente erectas, en forma de tubo o espalón	Néctar presente, en buena cantidad, escondido
Hormigas	Día o día y noche	Variable	Fragancia	Variable, pequeñas	Néctar presente, no escondido
Colibríes	Día	Comunmente, rojo, rosado, anaranjado	Sin fragancia	Zigomorfas o actinomorfas, en forma de tubo, generalmente horizontales o péndulas	Néctar presente y abundante
Murciélagos	Noche	Pálidos	Fuerte, desagradable	Actinomorfas o zigomorfas generalmente horizontales o péndulas	Néctar presente y abundante

(Tomado de: Baker y Hurd, 1968 & Faegri y Vander Pijl, 1974).

- g) Olor (detecte la fragancia de la flor, si la tiene, las horas en que se presenta y la duración de ésta. Observe si cambia con el tiempo).
- h) Ubique los nectarios de la flor, si los posee.
- i) Si la flor es hermafrodita, describa la posición de las anteras con respecto al estigma durante el tiempo en que la flor está abierta.

En lo posible, acompañe sus descripciones con fotografías o dibujos.

3. **Antesis:** se denomina así el momento en que abre el capullo. Se debe seguir el proceso de apertura teniendo en cuenta los siguientes aspectos:
 - a) Hora en que comienza la apertura.
 - b) Tiempo de duración del proceso desde el momento en que comienza hasta su finalización.
 - c) Movimientos que describen las diferentes partes de la flor (pétalos, sépalos, estilos y estambres).
4. **Duración:** determine el tiempo de vida de la flor teniendo en cuenta si muere después de un día o dura varios días. En este último caso advierta si se cierra por la noche y si se abre, de nuevo, al día siguiente.
5. **Visitantes:** observe qué tipos de animales visitan la flor (insectos, aves o mamíferos) y trate de determinar cuáles son polinizadores, pues es muy posible que algunos sean sólo "ladrones" del néctar (aprovechan el néctar pero no transportan polen) o simples visitantes casuales. Para una mejor observación tenga en cuenta:
 - a) ¿La parte del cuerpo del animal que hace contacto con las anteras y durante cuánto tiempo?
 - b) Si esta parte transporta polen y posteriormente hace contacto con los estigmas.
 - c) Si alguna parte de la flor es recolectada por el animal.
 - d) Si el visitante come parte de la flor o si es atrapado por ella.
 - e) La frecuencia con que el mismo tipo de animal visita la flor.
 - f) Horas del día en que son frecuentes las visitas del polinizador.
6. **Fecundación:** para determinar si la especie presenta agamospermia o si es autógama o autocompatible se debe contar con un buen número de bolsas de nylon para encapuchar las flores, trozos de cinta de diferentes colores para señalarlas y un marcador de tinta indeleble. El tamaño de la bolsa debe ser tal que no afecte la

apertura de la flor. La bolsa se cierra al tirar un cordón y de esta forma se evita que penetre el polinizador (u otros animales).

Procédase de la siguiente manera:

- a) Separe los capullos disponibles en cinco grupos, con un mínimo de diez ejemplares por grupo. Tenga en cuenta que de los cinco grupos se encapuchan cuatro y que en lo posible los ejemplares de un mismo grupo estén lo más dispersos posible e intercalados con los demás grupos.
- b) El grupo seleccionado para polinización natural no se encapucha. Se marca atando, al pedúnculo de cada flor, cintas del mismo color que llevan un número de orden (Fig.1).
- c) Para los grupos destinados a la observación de autogamia y polinización manual, escoja capullos cuyo tamaño indique que están próximos a abrir. Marque con cintas de diferente color cada grupo y proceda a encapuchar (Fig.2).



Figura 1. Cada flor se marca atando una cinta numerada a su pedicelo.



Figura 2. Las flores objeto de estudios de autogamia, polinización manual, agamospermia y xenogamia se encapuchan con bolsas de tela de nylon, antes de que abran las flores.

- d) Para los otros dos grupos (agamospermia y xenogamia) escoja capullos pequeños y antes de embolsar, elimine los estambres con unas pinzas de punta fina. Es importante que el capullo no sea demasiado joven y que las anteras no hayan soltado el polen todavía. Ate cintas de diferente color y embolsé.
- e) A medida que las flores escogidas para polinización manual vayan abriendo, proceda a retirar la bolsa; coloque en los estigmas polen de la misma flor y vuelva a encapuchar.
- f) En las flores seleccionadas para xenogamia, haga lo mismo, pero el polen debe proceder de una flor de otra planta.
- g) Las bolsas se deben quitar después de tres o cuatro días del cierre definitivo de la flor, para evitar su descomposición o deterioro. Sólo se deja la cinta para la posterior contabilidad de los resultados.
- h) Unos ocho a quince días, después de quitar la bolsa, observe cuáles produjeron fruto, anotando los resultados.

MEDICIONES

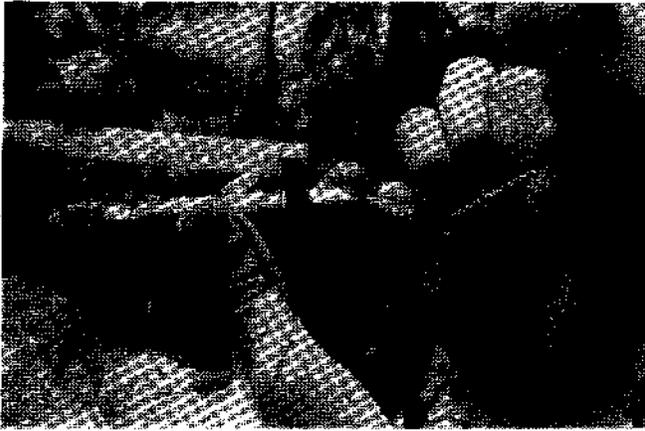
1. *Néctar*: seleccione entre cinco y diez capullos, diferentes a los escogidos para los grupos anteriores, el día anterior a su apertura. Embóselos y márkelos. Tan pronto abran totalmente, retire la bolsa y mida el néctar de la siguiente forma:

- a) Introduzca un tubo capilar por la parte anterior de la flor, de tal manera que penetre hasta el nectario (Fig.3). Si observa que el néctar no asciende por el tubo, invierta la flor.



Figura 3. Medición de la producción de néctar por medio de un tubo capilar.

- b) Cuando el tubo esté lleno, retírelo y vacíe su contenido en un refractómetro (Fig.4). Este instrumento posee una escala que le permitirá determinar el porcentaje de sucrosa en el néctar (Fig.5).
 - c) Termine de extraer todo el néctar que en ese momento posea la flor, midiendo la cantidad extraída. Tenga presente la cantidad de néctar que admite el tubo lleno. Si el tubo no queda lleno, mida con una regla la columna alcanzada y establezca la proporción.
 - d) Efectúe varias mediciones durante el día a intervalos de una hora, como mínimo y después de cada medición limpie cuidadosamente, con agua destilada el tubo capilar y el vidrio del refractómetro.
 - e) Anote ordenadamente en su libreta el número de la flor, la cantidad de néctar retirado, la hora en que se efectuó la medición y el porcentaje de sucrosa obtenido.
2. *Flujo de polen*: en algunos casos puede ser importante conocer el grado de dispersión del polen, llevado a cabo por los polinizadores. Para este estudio proceda de la siguiente manera:
- a) Marque las plantas en su totalidad o el mayor número posible, con cintas debidamente numeradas.
 - b) Tome distancias entre planta y planta, con la lienza y elabore un mapa en el cual se indique la posición de cada una de ellas, teniendo en cuenta las coordenadas geográficas.
 - c) Impregne, con polvos fosforescentes de diversos colores, las anteras de las flores; escogiendo un número de plantas aleatoriamente, de acuerdo al número de colores fosforescentes que se tengan. En



Figuras 4 y 5. Medición de la cantidad de sucrosa en el néctar por medio de un refractómetro manual.

cada planta se marcan cinco o más flores con un sólo color. Para aplicar el polvo utilice un pincel exclusivo para éste. Es recomendable efectuar este proceso en el momento de abrir la flor.

- d) Cuando los polinizadores dejen de llegar, recolecte las flores **no** marcadas inicialmente con los polvos y que hayan abierto ese día. Cada una de ellas debe guardarse en una bolsa de polietileno en la que se anota el número de la planta y la posición que ocupa la flor en ella.
- e) Ya en el laboratorio, se retiran individualmente las flores de las bolsas y se miran a la luz de una lámpara de luz ultravioleta para detectar el polvo. Si la flor presenta trazas de polvo fosforescente, describa la parte impregnada, el color del polvo y la cantidad de polvo hallada.

ANÁLISIS DE DATOS

Después de efectuar las observaciones y mediciones se procede a analizar los datos tomados en la siguiente forma:

1. Al examinar una flor cuidadosamente, es posible darse cuenta si es hermafrodita o unisexual, si produce néctar y si tiene sincronía en la maduración de sus partes sexuales. Compare las demás características de las flores con las anotadas en el Cuadro 2 (color, forma y fragancia) y determine cuáles pueden ser los agentes de polinización. Determine igualmente ¿cuáles son las recompensas que ofrece la planta al polinizador? Recuerde que un polinizador eficiente es aquel que visita varias flores de una misma especie. Las notas sobre la frecuencia de visitas e identidad de los visitantes ayudará a identificar el polinizador. Recuerde también que puede haber más de un solo agente de polinización. Es muy importante efectuar cuidadosas observaciones sobre la antesis de las flores, ya que si la flor abre de noche, es posible que la polinización se efectúe durante ésta y no en el día, no obstante el número de visitas que reciba de día.
2. Una vez se conozca el polinizador, se mide la efectividad de éste en la naturaleza con el experimento antes descrito en el cual se marcan las flores con cintas numeradas y a las dos semanas se cuenta el número de frutos producidos en ellas. Este grupo experimental sirve de control para los otros grupos de flores que se encapucharon. Por ejemplo, si el grupo de flores marcadas sin encapuchar produce frutos en un 70%, mientras las flores emasculadas y encapuchadas no producen ninguno, se tiene evidencia de que la especie no produce frutos por medio de la agamosperma. Por otra parte, si el grupo de polinización manual produce frutos, se sabe que esta clase de reproducción uniparental es factible en la naturaleza; pero si el número de frutos producidos es muy por debajo del número producido en el grupo de polinización cruzada, se tendrían evidencias de que existe algún grado de autoincompatibilidad.

Ahora bien, si el número de frutos producidos tanto en los grupos de polinización manual, como en polinización cruzada es muy por debajo del número producido en el grupo de flores sin encapuchar, se deben revisar las técnicas experimentales ya que posiblemente las flores fueron lastimadas al manipularlas.

Si se compara el número de frutos producidos entre las flores que sólo fueron encapuchadas con los producidos en el grupo de polinización manual, se verá no sólo si la autogamia es posible; sino también, la frecuencia con que se efectúa sin la intervención de ningún agente de polinización; o sea, se tendrá una medida de la frecuencia de autogamia. Un ejemplo de la forma en que se analizan esta clase de datos se encuentra en Actualidades Biológicas No.38 (Albert de Escobar, 1981).

Es obvio que no todas las flores producidas por una planta van a producir frutos, ya que la planta puede abortar flores por motivos ajenos a la fecundación de los huevos. Las

causas de dichos abortos son múltiples e incluyen ataque por pestes y enfermedades y daños causados por épocas de sequía, vientos, granizadas, animales, etc.. Así que el grupo de polinización natural le da una cifra del porcentaje de frutos producidos bajo las condiciones existentes en el medio en el cual se encuentran las plantas bajo estudio. Ahora bien, si el número de frutos producidos por polinización manual y/o polinización cruzada es muy por encima del porcentaje producido por polinización natural, indica que las plantas son capaces de producir un mayor número de frutos bajo las condiciones del medio, pero que no lo hacen por falta de un polinizador eficiente. Lo anterior es factible en el caso de cultivos que son objeto de fumigaciones cuyo fin es acabar con alguna plaga, pero que también matan los agentes de polinización. Este caso es particularmente grave cuando la especie de planta es autoincompatible, o sea requiere de una polinización cruzada para producir frutos. También sucede en poblaciones naturales donde ha habido una destrucción del medio natural del polinizador. Este caso parece más grave cuando el polinizador es un colibrí o un murciélago, ya que las poblaciones de éstos son generalmente más pequeñas que las de insectos y porque su ciclo reproductivo es más largo.

3. Si los experimentos de polinización natural muestran que ésta es poco efectiva, se puede proceder a efectuar y analizar los resultados de los experimentos sobre la dis-

persión de polen. Por medio de éstos, se puede determinar hasta dónde llega el polen de una planta dada, ya que el polinizador lleva el polvo fosforescente junto con el polen. Por ejemplo, si la planta número ocho fue la que recibió el polvo rojo, se sabe que el polen de dicha planta llegó a las otras flores bien sea de la misma planta o de distintas plantas, donde aparece el polvo rojo (Johansson, 1959; Musgrave, 1949; Thompson y Plowright, 1980). El mapa que se elabora de la posición y distancia entre las plantas de la población indica la distancia a que es llevado el polen de planta a planta. El tener cinco colores distintos de polvos fosforescentes permite repetir la experiencia en cinco plantas de diferentes partes de la población. Los resultados de este experimento pueden ser de mucha importancia, sobre todo en los casos de especies cuya producción de frutos es muy por debajo al número de flores producidas, o del porcentaje de frutos producido en el experimento de polinización cruzada.

Todas las observaciones y mediciones son más confiables cuando se repitan varias veces, bien sea en la misma población o en otras de la misma especie. Estas le darán una información más precisa sobre la biología reproductiva de la especie en estudio y esta información es esencial para una mejor explotación y manejo de muchas especies de interés para el hombre.

BIBLIOGRAFIA

1. Albert de Escobar, L.. Experimentos Preliminares en la Hibridación de Especies Comestibles de *Passiflora*. *Actualidades Biológicas*. 10(38):103-111. 1981.
2. Baker, H. G. y P. D. Hurd, Jr.. Intrafloral Ecology. En: *Annual Review of Entomology*. 13:385-414, 1968.
3. Faegri, K. y L. Vander Pijl. *The Principles of Pollination Ecology*, 2nd ed., Pergamon Press, Londres. 1974.
4. Johansson, T.S.K. Tracking Honeybees in Cotton Fields with Fluorescent Pigments. *Jour. Econ. Ent.* 52:572-577, 1959.
5. Musgrave, A.J. The Use of Fluorescent Material for Marking and Detecting Insects. *Can. Ent.* 81:173. 1949.
6. Thompson, J. D. y R. C. Plowright. Pollen Carryover, Nectar Rewards and Pollinator Behavior with Special Reference to *Dierivilla lonicera*. *Oecologia*. 46:68-74. 1980.