

**EFFECTO DEL HOSPEDERO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DEL HEMIPARASITO *Tristerix verticillatus* (LORANTHACEAE)
Y SOBRE SUS INTERACCIONES CON INSECTOS**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Química

Facultad de Ciencias

Por

Nancy Johana Cabezas Zúñiga

Octubre 2007

Director de Tesis

Dr. Hermann Niemeyer Marich

Co-Director de Tesis

Dr. Alejandro Urzúa Moll

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de doctorado presentada por el candidato

NANCY J. CABEZAS ZUÑIGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de septiembre del 2007.

Director de Tesis:

Dr. Hermann Niemeyer



Co-Director de Tesis:

Dr. Alejandro Urzúa



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Claudio Olea



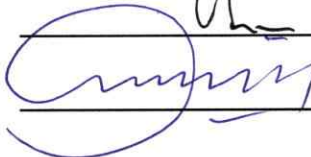
Dr. Carla Delporte

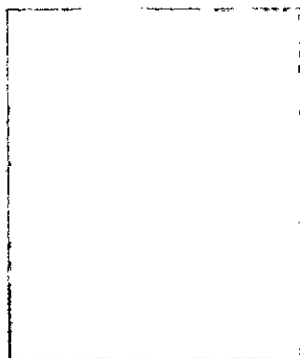


Dr. Bruce Cassels



Dr. Silvia Sepúlveda





Nancy y Fabrice gracias a la Universidad de Chile en 1987 a la carrera de Química Analítica, gracias a la Universidad de Chile en 1988 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 1989 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 1990 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 1991 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 1992 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 1993 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 1994 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 1995 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 1996 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 1997 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 1998 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 1999 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2000 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2001 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2002 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2003 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2004 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2005 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2006 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2007 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2008 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2009 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2010 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2011 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2012 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2013 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2014 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2015 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2016 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2017 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2018 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2019 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2020 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2021 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2022 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2023 a la carrera de Química Analítica. Gracias a la Universidad de Chile en 2024 a la carrera de Química Analítica y a la Universidad de Chile en 2025 a la carrera de Química Analítica.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis compañeros de laboratorio, porque gracias a ellos me siento en un lugar, tan preciado como difícil de encontrar, donde cada uno se esfuerza por dar lo mejor de sí mismo.

Agradecimientos

Agradecimientos a CONICYT y al fondo de becas de la Universidad de Chile por el valioso financiamiento otorgado, a CONAF por el permiso concedido para el desarrollo del trabajo de campo en el "Santuario de la Naturaleza Yerba Loca", y en especial a Eric Faúndez y Alejandra Troncoso por su generoso apoyo para el desarrollo de esta tesis.

Indice de materias

1.	Introducción General.....	1
1.1	Antecedentes del hemiparásito <i>Tristerix verticillatus</i>	2
1.1	Antecedentes sobre hospederos de <i>T. verticillatus</i>	5
1.2	Presentación del problema.....	8
1.3	Hipótesis Generales.....	9
1.4	Objetivos Generales.....	9
2.	I Unidad: Efecto de la composición de compuestos volátiles sobre la tasa de visitas a flores del hemiparásito.....	12
2.1	Introducción	12
2.2	Hipótesis	15
2.3	Objetivos específicos	15
2.4	Metodología	16
2.5	Resultados.....	29
2.5	Discusión	53
3.	II Unidad: Efecto de la composición de metabolitos secundarios sobre la herbivoría de <i>Mathania leucothea</i> en <i>Tristerix verticillatus</i>	64
3.1	Introducción	64
3.2	Hipótesis	67
3.3	Objetivos específicos	68
3.4	Parte Experimental.....	69
3.5	Resultados.....	77
3.6	Discusión	106
4.	Discusión General.....	113
4.1	Efecto del hospedero en la composición química de <i>T. verticillatus</i>	113
4.2	Efecto de la composición química de hospedero y hemiparásito en las interacciones ecológicas de <i>T. verticillatus</i>	114
4.3	Posible diferenciación genética del hemiparásito relacionada con diferencias en composición química de distintos hospederos	116
5.	Conclusiones	118
6.	Bibliografía.....	119

Lista de tablas

Tabla 1.	Tasa de visitas por insectos de distintas especies a flores de <i>T. verticillatus</i>	30
Tabla 2.	Variables visuales determinadas en el hemiparásito en distintos hospederos.....	34
Tabla 3.	Abundancia relativa de compuestos volátiles en hospederos y hemiparásitos.....	37
Tabla 4.	Abundancia relativa de compuestos volátiles en hospederos y hemiparásitos, clasificados según ruta biosintética.....	40
Tabla 5.	Discriminación entre hospederos de <i>T. verticillatus</i> en función de la composición de sus volátiles.....	42
Tabla 6.	Discriminación entre <i>T. verticillatus</i> de distintos hospederos en función de la composición de sus volátiles.....	44
Tabla 7.	Discriminación entre hospederos y hemiparásitos analizados en conjunto en función de la composición de sus volátiles.....	44
Tabla 8.	Cargas factoriales significativas en componentes principales de abundancias relativas.....	46
Tabla 9.	Cargas factoriales significativas en componentes principales de abundancias por unidad visual.....	48
Tabla 10.	Resumen de los procedimientos "forward stepwise" de los análisis de regresión múltiple entre tasa de visitas y componentes principales de hospederos y hemiparásitos.....	51
Tabla 11.	Relaciones inferidas entre compuestos volátiles y visitas por insectos a flores de <i>T. verticillatus</i>	52
Tabla 12.	Discriminación entre hemiparásitos de distintos hospederos en función de las áreas de metabolitos secundarios internos reveladas en TLC con <i>p</i> -anisaldehído.....	81
Tabla 13.	Discriminación entre hemiparásitos de distintos hospederos en función de las áreas de metabolitos secundarios internos reveladas en TLC con NP-PEG.....	82
Tabla 14.	Resumen del procedimiento "forward stepwise" de la regresión lineal múltiple del efecto de metabolitos secundarios sobre el porcentaje de herbivoría de <i>T. verticillatus</i>	84
Tabla 15.	Análisis por GC-MS de la fracción m8 separada del extracto clorofórmico de T-Sm.....	89
Tabla 16.	Análisis HPLC-UV de la fracción m2 de T-Sm.....	90
Tabla 17.	Análisis HPLC-MS de la fracción m2 de T-Sm.....	93
Tabla 18.	Señales ¹ H NMR de alcaloides encontrados en Bm y T-Bm.....	98

Lista de figuras

Figura 1.	<i>Mathania leucothea</i> en <i>T. verticillatus</i>	4
Figura 2.	Metabolitos secundarios aislados desde <i>Fabiana imbricata</i>	6
Figura 3.	Estructura de la berberina	7
Figura 4.	Sitio de estudio en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca.....	16
Figura 5.	Mapa con la localización de los hospederos parasitados en estudio	18
Figura 6.	Esquema de procesamiento de muestras para análisis de compuestos volátiles	22
Figura 7.	Visitas totales de insectos observadas por hora a flores de <i>T. verticillatus</i> en cada hospedero.....	29
Figura 8.	Fotos de insectos visitando flores de <i>T. verticillatus</i>	31
Figura 9.	Tasa de visitas diarias por insectos y picaflores a flores de <i>T. verticillatus</i> en cada hospedero.....	33
Figura 10.	Análisis discriminante de la composición de volátiles en hospederos de <i>T. verticillatus</i>	42
Figura 11.	Análisis discriminante de la composición de volátiles en <i>T. verticillatus</i> de hospederos.....	44
Figura 12.	Análisis discriminante de la composición de volátiles de hospederos y hemiparásitos.	44
Figura 13.	Estructuras de monoterpenos presentes principalmente en <i>F. imbricata</i>	56
Figura 14.	Polen colectado en abejas visitando <i>T. verticillatus</i>	60
Figura 15.	Esquema filogenético de angiospermas donde se destacan los órdenes a lo que pertenecen <i>S. montanus</i> , <i>F. imbricata</i> y <i>B. montana</i>	63
Figura 16.	Cuantificación de la herbivoría por larvas de <i>M. leucothea</i> en hojas de.....	70
	<i>T. verticillatus</i>	70
Figura 17.	Intensidad de herbivoría de <i>T. verticillatus</i> sobre distintos hospederos.....	77
Figura 18.	Placas de TLC de extractos de hojas en hospederos y hemiparásitos	78
Figura 19.	Análisis discriminante de las áreas en placas de TLC de metabolitos secundarios internos de extractos en cloroformo.....	81
Figura 20.	Análisis discriminante de las áreas en placas de TLC de metabolitos secundarios internos de extractos en metanol.....	82
Figura 21.	Relación entre porcentaje de herbivoría y área m8 en cloroformo de <i>T. verticillatus</i> en distintos hospederos	85
Figura 22.	Relación entre porcentaje de herbivoría y el área m2 en metanol de <i>T. verticillatus</i> en distintos hospederos	85
Figura 23.	Relación lineal no significativa entre hospedero y hemiparásito del área m8 en cloroformo	86
Figura 24.	Relación entre hospedero y hemiparásito del área m2 en metanol.....	87
Figura 25.	Placas de TLC de extractos totales y fracciones m8 y m2 de T-Sm.....	88
Figura 26.	Estructura de la rutina	89
Figura 27.	Cromatograma HPLC para detección UV de los compuestos de la fracción m2 de T-Sm	90
Figura 28.	Estructura de flavonoles y su relación con bandas de absorción en el UV.....	91
Figura 29.	Cromatograma HPLC-MS de la fracción m2 en metanol de T-Sm.....	92
Figura 30.	Tipo de estructura propuesta para compuesto 1 de fracción m2.....	94
Figura 31.	Fragmentación de rutina por HPLC-MS modo ESI+	95

Figura 32. Placa cromatográfica de compuestos Dragendorff-positivos (cloroformo/metanol 9:1).....	96
Figura 33. Placa cromatográfica de compuestos Dragendorff-positivos (cloroformo/metanol 8:2).....	97
Figura 34. Placa cromatográfica de compuestos Dragendorff-positivos (cloroformo/metanol 7:3).....	97
Figura 35. Información ^1H (a) y ^{13}C NMR (b) de pronuciferina presente en <i>B. montana</i>	99
Figura 36. Información ^1H NMR de O-metilirinina en <i>B. montana</i>	100
Figura 37. Información ^1H (a) y ^{13}C NMR (b) de 1,2-dimetoxi-9-hidroxiaporfina en <i>B. montana</i>	101
Figura 38. Información ^1H (a) y ^{13}C NMR (b) de N-metil-coclaurina en <i>B. montana</i>	102
Figura 39. Información ^1H NMR de pronuciferina en <i>T. verticillatus</i> sobre <i>B. montana</i>	103
Figura 40. Información ^1H NMR de glaucina en <i>T. verticillatus</i> sobre <i>B. montana</i>	103
Figura 41. Estructuras de alcaloides de <i>Berberis montana</i> y su relación cromatográfica con alcaloides identificados en <i>T. verticillatus</i> sobre <i>B. montana</i>	105
Figura 42. Estructuras de la mangiferina y la rutina.....	111

Lista de Símbolos, abreviaturas o nomenclatura

Sm	<i>Schinus montanus</i>
Fi	<i>Fabiana imbricata</i>
Bm	<i>Berberis montana</i>
T-Sm	<i>Tristerix verticillatus</i> sobre <i>Schinus montanus</i>
T-Fi	<i>Tristerix verticillatus</i> sobre <i>Fabiana imbricata</i>
T-Bm	<i>Tristerix verticillatus</i> sobre <i>Berberis montana</i>
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
NMR	Resonancia magnética nuclear
RI	Índice de Kováts
TLC	Cromatografía en capa fina
NP-PEG	Productos Naturales- polietilenglicol
ANOVA	Análisis de varianza

RESUMEN

Los hemiparásitos son parásitos fotosintéticos que obtienen desde sus hospederos principalmente agua, minerales y nutrientes orgánicos. Los hemiparásitos además pueden recibir, mediante translocación, metabolitos secundarios desde sus hospederos. Es así como pueden presentar distintas composiciones químicas y por ende potencialmente distintas interacciones ecológicas dependiendo del hospedero sobre el cual se encuentren.

El interés del presente trabajo es determinar los efectos de los hospederos *Schinus molle* (Sm), *Fabiana imbricata* (Fi) y *Berberis montana* (Bm) sobre la composición de volátiles emitidos y metabolitos secundarios internos del hemiparásito *Tristerix verticillatus* que crece sobre cada uno de ellos (T-Sm, T-Fi y T-Bm) y el efecto de la composición química de hospedero y hemiparásito sobre las interacciones del hemiparásito con insectos visitantes florales e insectos herbívoros.

Se determinó la composición de volátiles emitidos y metabolitos secundarios internos (tales como flavonoides y alcaloides) de hospederos y hemiparásitos. Se analizó la composición de volátiles de cada hospedero (ramas con hojas) y hemiparásito (ramas con flores y hojas), colectados dinámicamente del espacio de cabeza ("dynamic headspace"), mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las hojas fueron posteriormente molidas y extraídas secuencialmente con cloroformo y metanol y los extractos fueron analizados por cromatografía en capa fina (TLC) con el uso de agentes reveladores para la detección de terpenos en el extracto clorofórmico y flavonoides en el extracto metanólico. Se determinó además la translocación de alcaloides del hospedero al hemiparásito, mediante la identificación en los hospederos y en el hemiparásito de compuestos revelados con reactivo de Dragendorff con valores similares de R_f en TLC.

Debido a las diferencias significativas en la herbivoría y las tasas de visitas florales en el hemiparásito sobre distintos hospederos, se realizó un análisis de regresión múltiple entre las variables ecológicas (tasa de visitas florales por insectos y herbivoría en hojas) como variables dependientes y las variables químicas (composición de volátiles y de metabolitos secundarios internos), relacionadas con la discriminación entre hospederos y entre hemiparásitos, como variables

independientes. El efecto disuasivo o atrayente de compuestos sobre los insectos herbívoros y visitantes de las flores del hemiparásito fue determinado mediante correlaciones significativas negativas o positivas, respectivamente, entre las variables ecológicas y las variables químicas.

El hemiparásito T-Sm, cuyas flores fueron las más visitadas por insectos y cuyas hojas fueron las menos afectadas por herbivoría, se encuentra en el hospedero más rico en terpenos cuyas abundancias fueron positivamente relacionadas con visitas por insectos y presenta la mayor proporción de flavonoles y compuestos volátiles negativamente relacionados con herbivoría. En contraste, T-Bm, cuyas flores fueron las menos visitadas por insectos y cuyas hojas fueron las más afectadas por herbivoría, se encuentra en el hospedero más rico en compuestos con la menor atractividad hacia insectos visitantes, principalmente derivados de la ruta biosintética del acetato. La translocación del alcaloide pronuciferina y la posible biotransformación de O-metillirinina en glaucina fue determinada en el hemiparásito más afectado por herbivoría (T-Bm), siendo estos alcaloides posiblemente fagoestimulantes del herbívoro especialista *Mathania leucothea*.

En conclusión, la composición química de metabolitos secundarios internos y compuestos volátiles de *T. verticillatus* depende del hospedero sobre el cual se encuentre, lo que afecta sus interacciones ecológicas con herbívoros e insectos visitantes florales.

ABSTRACT

Hemiparasites are photosynthetic parasites that obtain from their hosts mainly water, minerals and organic nutrients. Since translocation of secondary metabolites may occur from the host to the hemiparasite, an hemiparasite can show different chemical compositions and hence different ecological interactions depending on the host with which it is associated.

The aim of this work was to determine chemical influences of the hosts, *Schinus molle* (Sm), *Fabiana imbricata* (Fi) and *Berberis montana* (Bm), on the composition of emitted volatile compounds and internal secondary metabolites of the hemiparasite, *Tristerix verticillatus*, growing on each of them (T-Sm, T-Fi y T-Bm), and the effect of the chemical composition of each host and hemiparasite on the interactions of the hemiparasite with insect floral visitors and insect herbivores.

The composition of volatiles and internal secondary metabolites (flavonoids and alkaloids) were determined from hosts and hemiparasites. Volatiles from each host (branches with leaves) and hemiparasite (branches with flowers and leaves), were collected by dynamic headspace techniques and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Leaves were dried, ground and sequentially extracted with chloroform and methanol. The extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC) with spray reagents suitable for the detection of terpenes in the chloroform extracts and flavonoids in the methanol extracts. Furthermore, translocation of alkaloids from the host to the hemiparasite was determined by identification of compounds revealed with Dragendorff's reagent in TLC.

Differences in herbivory and flower visiting rates were found among hemiparasites on different host species. Linear Multiple Regression analyses with forward stepwise procedures were performed, between ecological variables (flower visitation rates of insects and herbivory on leaves) as dependent variables and chemical variables (volatile composition and internal secondary metabolite composition) as independent variables. The attractive or deterrent effects of compounds in the hemiparasite on the activity of herbivores and insect flower visitors of the hemiparasite were determined through positive and negative significant

correlations, respectively, between ecological variables and chemical variables.

The hemiparasite T-Sm, whose flowers were the most visited by insects and whose leaves were least affected by herbivory, was on the host richest in terpenes whose abundances were positively related with rates of insect visits, and showed the highest proportion of flavonols and volatile compounds negatively related with herbivory. In contrast, T-Bm, whose flowers were the least visited by insects and whose leaves were most affected by herbivory, was on the host richest in compounds with least attractiveness to insect visitors, mainly fatty acid derivatives. Translocation of pronuciferine and the possible biotransformation of O-methylirinine to glaucine was determined in the hemiparasite most affected by herbivory (T-Bm), these alkaloids possibly being phagostimulants of the specialist lepidopterous herbivore *Mathania leucothea*.

In conclusion, chemical composition of secondary metabolites and volatile compounds of *T. verticillatus* depends on the host on which it grows, affecting its ecological interactions with herbivores and insect floral visitors.

1. Introducción General

El parasitismo en plantas es una interacción entre un organismo (parásito) y otro sobre el cual reside (hospedero), en la cual el primero se beneficia del segundo obteniendo de éste principalmente agua y nutrientes (Press y Stewart, 1991). Se ha informado en algunos casos la translocación de metabolitos secundarios del hospedero al hemiparásito (Stermitz y col., 1986; Stermitz y Harris, 1986; Arslanian y col., 1990; Schneider y Stermitz, 1990; Stermitz y col., 1993; Martín-Cordero y col., 1993, 1997; Adler y Wink, 2001; Ramchandra y col., 2005), de forma tal que el hospedero puede afectar la composición química del hemiparásito y en consecuencia afectar sus interacciones ecológicas con organismos tales como visitantes florales y herbívoros.

Los hemiparásitos son capaces de realizar fotosíntesis. Sin embargo, la tasa de asimilación de dióxido de carbono de un hemiparásito es baja en comparación con la de su hospedero (Strong y col., 2000), siendo menor su tasa de biosíntesis. En consecuencia, el hemiparásito para su subsistencia depende en gran parte del aporte de metabolitos desde su hospedero. Aún así, se ha informado de la presencia de metabolitos secundarios característicos, tales como flavonoides, que pueden ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos de hemiparásitos (Tilney y Lubke, 1974; Soto y col., 1996). De este modo, un hemiparásito puede presentar una gran riqueza química, ya que es capaz de biosintetizar sus propios compuestos y translocar compuestos desde su hospedero pudiendo además biotransformar estos últimos (Adler y Wink, 2001).

La familia Loranthaceae representa el grupo más numeroso y diverso de hemiparásitos (Norton y De Lange, 1999), presentándose en una gran gama de hospederos de distintos órdenes (Kuijt, 1969). Estos se unen a sus hospederos a través de haustorios, con los que acceden al sistema vascular del hospedero, permitiendo así el transporte de metabolitos del hospedero al hemiparásito. La adquisición de metabolitos por el hemiparásito puede variar de acuerdo al hospedero sobre el que se encuentre, y así afectar a la interacción del hemiparásito con otros organismos, tales como insectos asociados a éste (Marvier, 1996, 1998; Adler, 2000a).

1.1 Antecedentes del hemiparásito *Tristerix verticillatus*

El “quintral del molle”, *Tristerix verticillatus* (Loranthaceae), es un hemiparásito endémico de Sudamérica que se presenta desde el sureste de Bolivia y noroeste de Argentina hasta el sur de Chile (Kuijt, 1988). En la zona central de Chile infesta principalmente a arbustos del género *Schinus* (Anacardiaceae), aunque también se presenta en otros árboles y arbustos de los géneros *Persea* (Lauraceae), *Colliguaja* (Euphorbiaceae), *Escallonia* (Escalloniaceae), *Fabiana* (Solanaceae) y *Berberis* (Berberidaceae) (Kuijt, 1988).

Su fruto, mucilaginoso, es consumido por aves (Kuijt, 1988), las que pueden depositar su semilla en las ramas de sus hospederos. El grado de penetración de los haustorios del hemiparásito puede variar de un hospedero a otro. Por ejemplo, *Tristerix corymbosus* sobre *Kageneckia oblonga* (Rosaceae) presenta haustorios que llegan hasta el xilema del hospedero, siendo esta especie muy susceptible a la infestación por este hemiparásito. En cambio, en *Quillaja saponaria*, también una Rosácea, estas conexiones son superficiales, no llegando ni al xilema ni al floema del hospedero, debido a un mecanismo de resistencia físico consistente en la producción de una capa de corcho (Hoffmann y col., 1986). Este distinto grado de susceptibilidad en los hospederos, puede afectar la influencia química que éstos ejercen sobre el hemiparásito.

La época de floración de *T. verticillatus* en la cordillera de Chile central comienza en Enero y alcanza su máximo en Febrero y Marzo (Kuijt, 1988). Las flores del hemiparásito *Tristerix verticillatus* son rojas y tubulares, características del síndrome de polinización por picaflores, que ha sido informado a nivel de género (Kuijt, 1988). Sin embargo, es también conocido que las flores que son visitadas por picaflores también lo pueden ser por insectos tales como abejas y mariposas (Pleasants & Waser, 1985; Riveros, 1991). Este es el caso del hemiparásito *Pedicularis spp.* (Scrophulariaceae), cuyas flores, similares a las de *T. verticillatus*, son visitadas por picaflores y abejas (Macior, 1986).

Tristerix corymbosus es el único hospedero reportado de la mariposa *Mathania leucothea* (Pieridae), la cual deposita sus huevos, de color anaranjado, en ápices y hojas tiernas (Courtney, 1985). En *T. verticillatus* ha sido también observada la presencia de huevos de *M. leucothea* (Figura 1a), observándose además que la larva desarrolla en los primeros estadios un camuflaje para confundirse con los ápices florales de *T. verticillatus* (Figura 1b), lo que sugiere una estrecha relación entre mariposa y hospedero. *Mathania leucothea* no presenta otros hospederos conocidos, por lo cual se trataría de un lepidóptero especialista a nivel de género. La larva de *M. leucothea* es defoliadora, es decir, ingiere los metabolitos secundarios contenidos en las hojas que consume.



Figura 1. *Mathania leucothea* en *T. verticillatus*. a: huevos; b: larva camuflada en ápices florales.

1.1 Antecedentes sobre hospederos de *T. verticillatus*

Schinus moltanus (Anacardiaceae)

Es un arbusto de hojas perennes, glabras y ovaladas, dispuestas de forma alterna, con inflorescencias de 10 a 20 flores en forma de racimos de origen axial. Sus flores son blancas con amarillo, de estambres blancos y anteras amarillas. Se distribuye en Chile central desde Aconcagua hasta Colchagua (Barkley, 1957). En la sexta región florece entre septiembre y marzo (Ulriksen, 2003). En la Región Metropolitana la época de floración es más temprana, extendiéndose hasta febrero (observación personal). Presenta herbivoría en forma de cecidias, características de su género, producidas por insectos del sub-orden Psylloidea (Saiz y Núñez, 1997). La presencia de taninos en *S. moltanus* ha sido relacionada con la herbivoría por psílidos (Saiz y Núñez, 1997).

Fabiana imbricata (Solanaceae)

Es un arbusto de hojas resinosas y perennes, de flores pequeñas blanco-azuladas y solitarias de hasta 1 cm de largo. Se distribuye preferentemente en sectores de Chile central (Navas, 1979). En la Región Metropolitana florece entre noviembre y diciembre (Navas, 1979). En *F. imbricata* ha sido descrita la presencia de una variada gama de metabolitos secundarios tales como sesquiterpenos del tipo amorfano y muurolano (Brown, 1994), alcaloides (fabianina, 2,5-dimetil-5,6,7,8-tetrahidroquinolina), flavonoides (quercetina, kaempferol, rutina) y cumarinas tales como escopoletina, fraxetina y fabiatriina (Muñoz, 1992), algunos de éstos representados en la Figura 2.

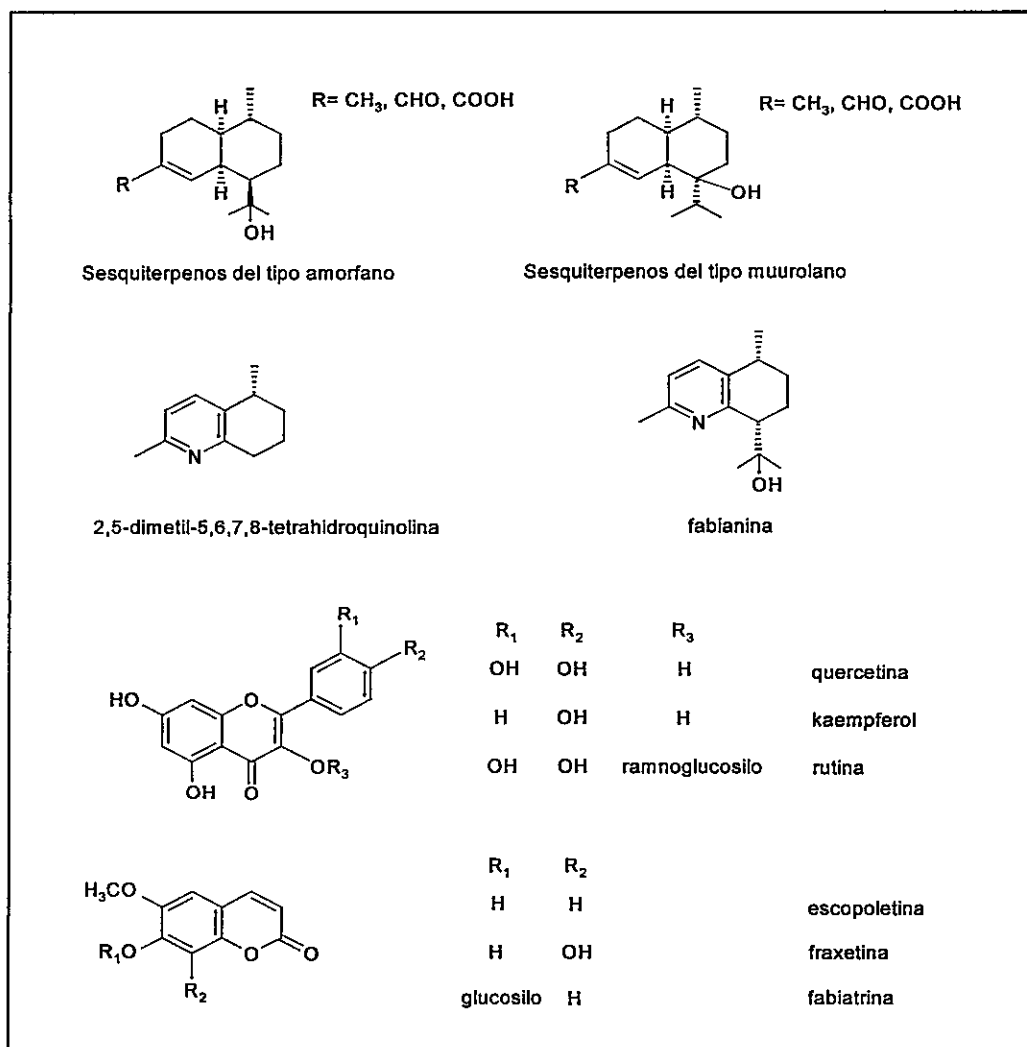


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados desde *Fabiana imbricata*

Berberis montana (Berberidaceae)

Es un arbusto de hojas pequeñas y caducas, con espinas características de su género. Sus flores son amarillas, solitarias y de 3,5 a 6 mm de longitud. Es una especie nativa de Chile y Argentina. En Chile se distribuye desde la Región Metropolitana hasta la Décima Región. En la Región Metropolitana florece entre octubre y diciembre (Navas, 1976).

Los alcaloides que se han encontrado en especies del género *Berberis* son todos derivados del aminoácido tirosina. La berberina es un alcaloide común a todas las especies del género (Fajardo, 1992). En *B. montana*, se ha descrito solamente la presencia de este alcaloide (Fajardo y col., 1986), representado en la Figura 3.

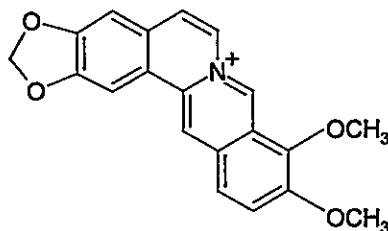


Figura 3. Estructura de la berberina

Sin embargo, no es descartable la presencia en esta especie de otros tipos de alcaloides, comunes en el género *Berberis*, tales como aporfinas, proaporfinas o bencilisoquinolinas (Fajardo, 1992).

1.2 Presentación del problema

La composición química de un hospedero puede afectar la herbivoría e indirectamente la polinización de un hemiparásito (Adler, 2000a; 2002). La influencia de la química del hospedero sobre las interacciones ecológicas del hemiparásito ha sido estudiada considerando un tipo de metabolito en particular (alcaloides) y se ha limitado en general a relaciones de herbivoría (Stermitz y col., 1989; Marko, 1996), relacionándose con polinización sólo para evaluar el efecto de una menor intensidad de florivoría en hemiparásitos que presentan una mayor translocación de alcaloides (Adler, 2000a; 2002). Sin embargo, también se ha informado de néctares tóxicos con un gran contenido de alcaloides (Adler, 2000b; Adler e Irwin, 2005), por lo que una translocación de alcaloides no necesariamente significaría un aumento en la polinización de un hemiparásito.

Cuando los insectos se aproximan a una planta están sometidos a una compleja información química, por lo cual es necesario evaluar el efecto de más de un compuesto sobre las interacciones hemiparásito-insecto.

Tristerix verticillatus (Loranthaceae) es un hemiparásito que se encuentra en distintas localidades del matorral esclerófilo de Chile central. La posibilidad de encontrarlo en un sector en particular sobre distintos hospederos permite realizar un estudio químico y ecológico que atenúe las variables ambientales por distancia geográfica. En el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca, *T. verticillatus* se encuentra sobre los hospederos *Schinus molle* (Anacardiaceae), *Fabiana imbricata* (Solanaceae) y *Berberis montana* (Berberidaceae), en una zona no mayor a 80 hectáreas.

1.3 Hipótesis Generales

1. Dado que un hemiparásito puede translocar metabolitos desde su hospedero, la composición química de un hemiparásito es afectada por la composición química de sus hospederos.
2. Si *T. verticillatus* presenta diferentes composiciones químicas, determinadas por la asociación con distintos hospederos, éstas afectarán la interacción del hemiparásito con otros organismos, tales como herbívoros y visitantes florales.

1.4 Objetivos Generales

1. Evaluar y comparar las composiciones químicas de *T. verticillatus* cuando crece sobre distintas especies de hospedero y compararlas con las de esos hospederos.
2. Relacionar la composición química de *T. verticillatus* y la de sus hospederos respectivos con la actividad de insectos tales como herbívoros y visitantes florales del hemiparásito.

El presente trabajo estudia el efecto de los hospederos *S. montanus* (Sm), *F. imbricata* (Fi) y *B. montana* (Bm) sobre la composición química e interacciones ecológicas con insectos del hemiparásito *T. verticillatus* (T-Sm, T-Fi y T-Bm). Dados los antecedentes presentados de la distinta composición química de hospederos de *T. verticillatus*, es esperable la distinta influencia de ellos sobre la composición química e interacciones con insectos de *T. verticillatus*.

El desarrollo de esta tesis comprende dos unidades de estudio:

1. Efecto de la composición de compuestos volátiles sobre la tasa de visitas a flores del hemiparásito.
2. Efecto de la composición de metabolitos secundarios internos sobre la herbivoría de *M. leucothea* en el hemiparásito.

En la primera unidad, se estudiará la influencia de los compuestos volátiles del hospedero y del respectivo hemiparásito sobre la tasa de visitas a flores del hemiparásito. Se determinarán las tasas de visita por insectos y picaflores a flores de *T. verticillatus* sobre cada hospedero y luego se analizará la composición de volátiles de cada hospedero y de su respectivo hemiparásito. Por último, se relacionará estadísticamente, mediante un análisis de regresión múltiple, la tasa de visitas por insectos y la composición de compuestos volátiles del hospedero y del respectivo hemiparásito. Se espera encontrar una mayor tasa de visitas por insectos a flores de hemiparásitos que presenten junto a sus hospederos una mayor proporción de compuestos volátiles atractivos y una menor proporción de compuestos disuasivos.

En la segunda unidad, se estudiará el efecto de los hospederos sobre la composición de metabolitos secundarios internos del hemiparásito y el efecto de la composición de metabolitos secundarios internos del hemiparásito sobre la intensidad de herbivoría del hemiparásito en los distintos hospederos, por larvas de *M. leucothea*, las cuales generan patrones característicos de herbivoría. Se determinará el porcentaje de herbivoría del hemiparásito en cada hospedero y luego se analizará la composición de metabolitos secundarios del hospedero y del respectivo hemiparásito. Por último, se determinará el efecto de la composición de metabolitos secundarios internos del hemiparásito sobre la intensidad de herbivoría del hemiparásito, mediante un análisis de regresión múltiple entre el porcentaje de herbivoría y la composición de metabolitos secundarios internos del hemiparásito en cada hospedero. Se espera encontrar un patrón de metabolitos secundarios relacionados con la mayor intensidad de herbivoría del especialista *M. leucothea*.

2. I Unidad: Efecto de la composición de compuestos volátiles sobre la tasa de visitas a flores del hemiparásito

2.1 Introducción

Las flores, estructuras reproductivas de las angiospermas, atraen polinizadores mediante señales visuales, táctiles y olfativas (Harborne, 1988). La similitud entre caracteres florales de distintas especies debida a la adaptación convergente a la morfología, fisiología y conducta de un determinado polinizador genera un denominado "síndrome de polinización" (Faegri y van der Pijl, 1979). Es así como por ejemplo flores tubulares con fragancias dulces y dominantes atraen principalmente lepidópteros de hábitos nocturnos ("síndrome de polinización nocturna") o flores azules y abiertas con abundante néctar atraen principalmente a abejas (Proctor y col., 1996). Los caracteres olfativos se conjugan con caracteres visuales en la atraktividad floral hacia insectos visitantes (Dobson, 1994). Además la especificidad en la atraktividad de compuestos volátiles constituye un importante factor para la discriminación entre flores de distintos genotipos (Pham-Delegue y col., 1989; Gasket y col., 2005), favoreciendo el transporte de polen intraespecífico y aumentando la eficiencia en la polinización. Sin embargo, la información sobre la relación específica entre compuestos volátiles florales e insectos visitantes es escasa (Williams y Dodson, 1972; Henning y Teuber, 1992; Blight y col., 1997; Honda y col., 1998; Schiestl y Roubik, 2003), aunque se ha relacionado de forma general la fragancia de flores con insectos que las visitan (Galen y Kevan, 1983; Galen, 1985; Dobson, 1987; Dobson y col., 1987; Pham-Delegue y col., 1989; Gerlach y Schill, 1991; Sazima y col., 1993; Jakobsen y col., 1994; Borg-Karlson y

col., 1994; Knudsen y Mori, 1996; Grison y col., 1999; Levin y col., 2001; Grison-Pigé y col., 2002; Jürgens, 2004; Gasket y col., 2005).

Las flores del hemiparásito *Tristerix verticillatus* (Loranthaceae) son rojas y tubulares, características del síndrome de polinización por picaflores, que ha sido informado a nivel de género (Kuijt, 1988). Sin embargo, es también conocido que las flores que son visitadas por picaflores también lo pueden ser por insectos tales como abejas y mariposas (Pleasants & Waser, 1985; Riveros, 1991). Por ejemplo, las flores del hemiparásito *Pedicularis spp.* (Scrophulariaceae), morfológicamente similares a las de *T. verticillatus*, son visitadas por picaflores y por abejas (Macior, 1986). Más aún, abejas y mariposas pueden ser atraídos a las flores tanto por aspectos visuales como olfativos (Odell y col., 1999; Ômura y Honda, 2005; Andersson, 2003), a diferencia de los picaflores que son atraídos principalmente por aspectos visuales ya que poseen un débil o nulo sentido de olfato (Proctor y col., 1996).

Los hemiparásitos son capaces de realizar fotosíntesis e intercambio gaseoso (Boardman, 1977; Goldstein y col., 1989), pudiendo también biosintetizar y emitir compuestos volátiles. Sin embargo, la tasa de fotosíntesis de un hemiparásito es baja en comparación con la de una planta autótrofa (Boardman, 1977; Strong y col., 2000). En consecuencia, la tasa de biosíntesis de compuestos volátiles por el hemiparásito puede ser menor en relación con la de su hospedero y los volátiles del hospedero influir notablemente en la atractividad del hemiparásito hacia insectos visitantes florales.

La presente unidad tiene por interés estudiar el efecto de los hospederos *S. montanus*, *F. imbricata* y *B. montana* sobre la composición de volátiles del hemiparásito *T. verticillatus* y la influencia de la composición de los volátiles del hospedero y del respectivo hemiparásito sobre la tasa de visita por insectos a las flores de *T. verticillatus*. Dado que los períodos de floración de los hospederos descritos no son coincidentes con los del hemiparásito, es posible determinar la influencia de los compuestos volátiles de los hemiparásitos sobre las visitas por insectos a sus flores sin interferencia por actividad en flores de los hospederos. Sin embargo, los volátiles procedentes de tejidos vegetativos de hospederos pueden afectar la atraktividad del hemiparásito hacia insectos que visiten sus flores.

Además debido a ser conocido el síndrome de polinización por picaflores en *T. verticillatus* (Kuijt, 1988), también se determinará la visita por picaflores en los mismos períodos de observación de visitas por insectos, con el fin de establecer la importancia relativa de los insectos como ensamble visitante a flores de *T. verticillatus*.

2.2 Hipótesis específicas

1. La composición de productos volátiles de *T. verticillatus* varía en función del hospedero que parasita.
2. La composición de productos volátiles de hospedero y/o hemiparásito afectan la tasa de visitas a flores del hemiparásito.
3. Dada la baja percepción olfativa de picaflores, éstos visitarán indistintamente flores de hemiparásitos sobre distintos hospederos.

2.3 Objetivos específicos

1. Determinar la tasa de visitas florales por insectos y por picaflores sobre flores de *T. verticillatus* cuando crece sobre los hospederos *S. montanus*, *B. montana* y *F. imbricata*.
2. Determinar variables visuales que puedan afectar la tasa de visitas a flores de *T. verticillatus*.
3. Analizar la composición de compuestos volátiles del hemiparásito *T. verticillatus* creciendo sobre *S. montanus*, *F. imbricata* y *B. montana* y de cada hospedero.
4. Estimar la relación entre la tasa de visitas florales por insectos sobre *T. verticillatus* y la composición de volátiles del hemiparásito y sus hospederos.

2.4 Metodología

2.4.1 Lugar de estudio

El trabajo de campo y las colectas de material vegetal para análisis se realizaron en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca (Figura 4), en los alrededores de Villa Paulina (Ruta G-21, Km. 25, Lo Barnechea, Santiago), particularmente en el sector "Mirador del Águila" ($33^{\circ} 18' 35,9''\text{S}$; $70^{\circ} 19' 19,9''\text{W}$; 1966 msnm), donde el hemiparásito *T. verticillatus* se encuentra sobre los hospederos *S. montanus* (T-Sm), *F. imbricata* (T-Fi) y *B. montana* (T-Bm).

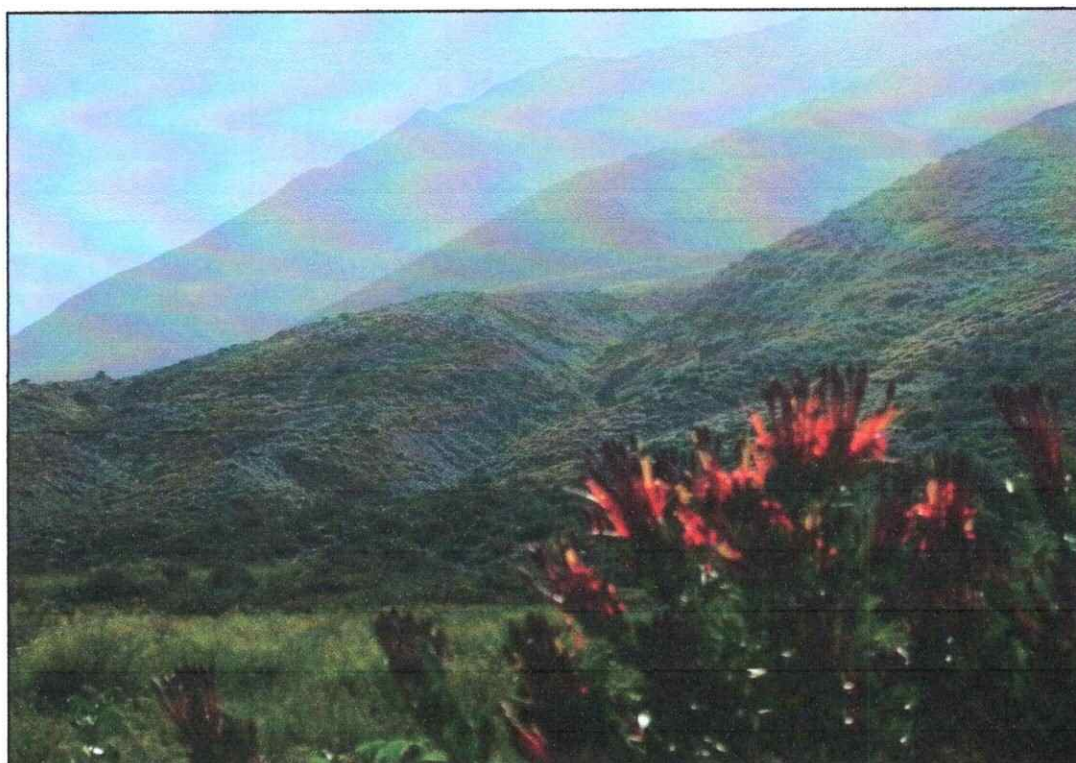


Figura 4. Sitio de estudio en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca, sector Mirador del Águila.

2.4.2 Determinación de la tasa de visitas florales en *T. verticillatus*

Se determinó las tasas de visitas florales de insectos y picaflores sobre las flores de *T. verticillatus* creciendo sobre cada especie de hospedero (T-Sm, T-Fi, T-Bm), durante la época de mayor floración del hemiparásito. Para esto se definió un grupo de 10 inflorescencias de *T. verticillatus*, procedentes de cada uno de 10 individuos de cada especie de hospedero, ubicados en distintos sectores del sitio de estudio (ver mapa en Figura 5). El período de evaluación en cada grupo de flores fue de 10 minutos, con un lapso de 10 minutos entre observaciones desde 9:00 a 13:00 hrs. y luego desde 14:00 a 17:00 hrs., de modo tal que se realizaron tres períodos de evaluación por hora, uno por cada tratamiento (T-Sm, T-Fi, T-Bm), durante 10 días asoleados de Marzo del 2005. La secuencia de observación fue tal que cada individuo fue observado en un día y una hora distintas. Se contabilizaron sólo aquellos visitantes con un potencial efecto polinizador (contacto con estructuras reproductivas de la flor).

Se informó el número de visitas observadas por hora, equivalente a $6/7$ de la suma de siete períodos de evaluación por individuo a distintas horas del día en siete días distintos, para homogeneizar las diferencias de clima debidas a cada día en particular. Se comparó el número de visitas observadas por hora entre hemiparásitos de distintos hospederos (T-Sm, T-Fi, T-Bm), mediante análisis de varianza (ANOVA), y una prueba post-hoc para determinar los hemiparásitos más visitados.



Figura 5. Mapa con la localización de los hospederos parasitados en estudio

2.4.3 Determinación de variables visuales de *T. verticillatus*

Los caracteres visuales y olfativos de las flores son importantes factores de atraktividad hacia insectos visitantes (Dobson, 1994), pudiendo incluso relacionarse sinérgicamente (Raguso y Willis, 2002). Sin embargo, los caracteres visuales son generalmente más estables y menos específicos que las fragancias, cuya producción puede fluctuar en condiciones ambientales (Robacker, 1983). Se determinaron sólo variables visuales en el hemiparásito distinguibles a una mayor escala, sin considerar variables particulares de cada flor, tales como el color o el largo de la corola, ya que a distancias cortas de la flor son los compuestos volátiles los que presentan un rol predominante en la atraktividad hacia insectos (Williams, 1983). En consecuencia, se determinaron las siguientes variables morfológicas de *T. verticillatus* en distintos hospederos por su posible efecto en la tasa de visitas al hemiparásito en distintos hospederos:

- Número de hemiparásitos por hospedero: se determinó el número de individuos hemiparásito en cada individuo hospedero (n=10).
- Volumen de los hemiparásitos/ volumen del hospedero: se determinó la razón entre la suma de los volúmenes de los individuos hemiparásito por individuo hospedero y volumen de cada individuo hospedero (n=10). Debido a la forma irregular de cada individuo hemiparásito y respectivo hospedero los volúmenes de hemiparásito y respectivo hospedero fueron calculados en forma aproximada considerando el largo, el ancho y el alto de un paralelepípedo imaginario que contuviera a cada individuo.
- Número de flores abiertas del hemiparásito por hospedero: se determinó el número de flores abiertas en promedio de cada individuo hemiparásito en cada individuo hospedero.

- Número de flores totales del hemiparásito por hospedero: se determinó el número de flores totales (incluidos los ápices florales) de cada individuo hemiparásito en cada individuo hospedero.
- Número de flores abiertas / totales del hemiparásito por hospedero: se determinó la razón entre el número de flores abiertas y de flores totales de cada individuo hemiparásito en cada individuo hospedero, a fin de determinar posibles diferencias en los tiempos de floración entre hemiparásitos de distintos hospederos.

Las variables morfológicas de los hemiparásitos fueron comparadas entre hospederos mediante ANOVA y una prueba post-hoc de Tukey, con los datos previamente normalizados mediante algoritmos matemáticos (log).

2.4.4 Colecta y análisis de compuestos volátiles

El material vegetal destinado al análisis de compuestos volátiles se colectó en los mismos individuos que fueron sometidos a observación, en una etapa posterior con el objeto de evitar interferencias del muestreo para análisis químico sobre las observaciones de insectos visitantes. Se obtuvieron muestras vegetales que contenían 10 inflorescencias de los hemiparásitos en aproximadamente 5 L de ramas y de los hospederos muestras vegetales de igual volumen de cada uno de los 30 individuos seleccionados (10 de cada hospedero-Sm, Fi, Bm- y 10 de cada hemiparásito-T-Sm, T-Fi, T-Bm). Luego, en el laboratorio, se dispuso cada muestra en recipientes de vidrio de 10 L y mediante inyección de aire comprimido se adsorbieron sus compuestos volátiles sobre Porapak Q 50/80 mesh (aprox. 200 mg) contenido en columnas de vidrio de L= 6 cm y Di= 3 mm a la salida de cada sistema (Figura 6). Las zonas de corte de las ramas fueron cubiertas con teflón para minimizar la captura de compuestos volátiles internos de las ramas, liberados por el daño mecánico. El tiempo de colecta de los compuestos volátiles de cada sistema fue de 24 h con un flujo de aire de 250 ml/min. Luego de cada colecta, las columnas con Porapak fueron eluidas con 3 ml de diclorometano p.a., y los extractos fueron concentrados en microviales hasta 100 µl con nitrógeno seco y ultrapuro, para su posterior análisis por GC-MS (Figura 6). Se inyectó 1 µl de cada muestra en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Series II acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard modelo 5972. El gas portador fue helio con un flujo de 1,25 ml/ min. La temperatura del inyector fue de 250°C. Se empleó una columna SPB-5 (30m x 0,25 mm x 0.25 µm) para la separación de los compuestos en fase gaseosa. La temperatura del horno fue inicialmente de 35°C

por 5 min y luego fue aumentando a razón de 5°C/ min hasta 260°C, manteniéndose en esta temperatura durante 5 min. El tiempo de análisis fue de 55 min para cada muestra.

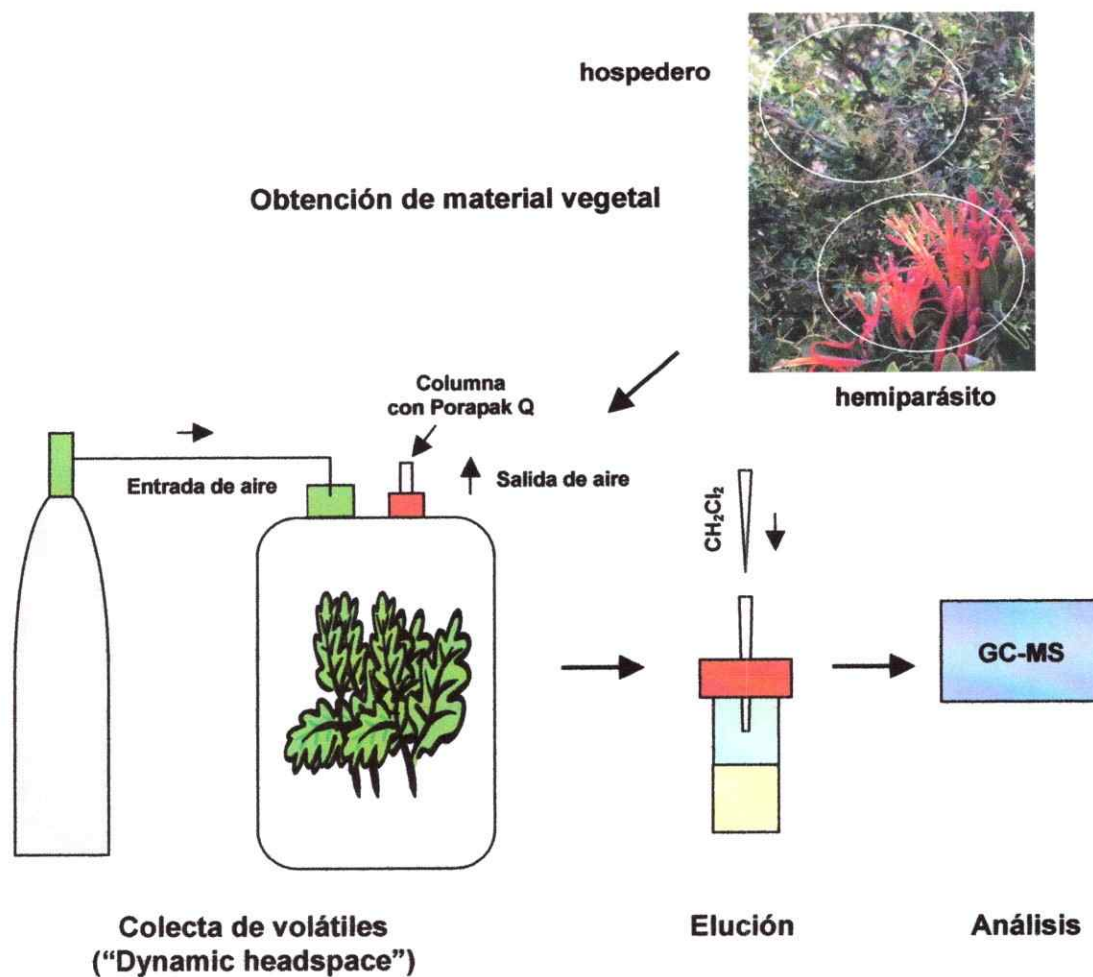


Figura 6. Esquema de procesamiento de muestras para análisis de compuestos volátiles

Se identificaron los compuestos volátiles por comparación de los espectros de masas con aquellos de la base de datos NIST 98 (National Institute of Standards and Technology), complementada con la comparación entre los índices de Kováts calculados y los obtenidos en la literatura para el mismo tipo de columna, y por co-

inyección de estándares comerciales.

El índice de Kováts (von Kováts, 1958) para cada compuesto se calculó según la siguiente expresión:

$$RI_x = \frac{100 (n + (\log (t_{i_x} - t_m) - \log (t_{i_n} - t_m)))}{(\log (t_{i_{n+1}} - t_m) - \log (t_{i_n} - t_m))}$$

donde:

n = número de átomos de carbono del alcano precedente al compuesto en el cromatograma

t_m = tiempo muerto (tiempo que tarda el aire en pasar por la columna hasta el detector)

t_{i_x} = tiempo de retención del compuesto en minutos

t_{i_n} = tiempo de retención del alcano precedente al compuesto

$t_{i_{n+1}}$ = tiempo de retención del alcano posterior al compuesto

2.4.5 Expresión de variables químicas para análisis estadísticos

Luego de la identificación de los compuestos, fueron definidas las siguientes variables químicas para los análisis estadísticos:

- 1) Abundancia relativa (%): corresponde a la razón entre las cuentas electrónicas (TIC) del compuesto identificado y la suma de las cuentas electrónicas de todos los compuestos del cromatograma multiplicada por 100:

$$A (\%) = \frac{100 \times \text{TIC compuesto identificado}}{\sum \text{TIC compuestos del cromatograma}}$$

La abundancia relativa fue utilizada para comparar la proporción de compuestos volátiles entre hospederos, entre hemiparásitos de distintos hospederos y entre hospederos con sus respectivos hemiparásitos. Esta comparación fue realizada mediante ANOVA y una prueba post-hoc para cada compuesto identificado, mediante el uso del programa Sigmastat (versión 2.0). Además, esta unidad fue utilizada en los análisis discriminantes de la composición de volátiles entre hospederos y entre hemiparásitos, en forma independiente y en conjunto.

- 2) Abundancia por unidad visual (A_{uv}): en hemiparásitos corresponde directamente a las cuentas electrónicas del compuesto identificado (TIC_{Hp}^i), ya que el volumen de la muestra de hemiparásito contenía 10 inflorescencias (muestra equivalente a la utilizada en la evaluación de visitas florales):

$$A_{uv\text{Hp}} = \text{TIC}_{\text{Hp}}^i$$

En hospederos corresponden a las cuentas electrónicas provenientes de un volumen de hospedero que sea proporcional al volumen de un hemiparásito que contenga 10 inflorescencias. Para esto se multiplican las cuentas electrónicas de la muestra de hospedero (TIC_H^i) por el siguiente factor:

$$A_{uvH} = TIC_H^i \times \frac{d_H}{d_{Hp}} \times \frac{m_{Hp}^i}{m_H^i} \times \frac{V_{Ht}}{\sum V_{Hp}}$$

calculado según las siguientes equivalencias

$$\frac{TIC_{Hp}^i}{V_{Hp}^i} \times \sum V_{Hp} = \frac{TIC_H^i}{V_H^i} \times V_{Ht} \quad A_{uv} = TIC_{Hp}^i = TIC_H^i \times \frac{V_{Hp}^i}{V_H^i} \times \frac{V_{Ht}}{\sum V_{Hp}}$$

Donde para cada individuo i:

$$V_{Hp}^i = \frac{m_{Hp}^i}{d_{Hp}} \quad V_H^i = \frac{m_H^i}{d_H} \quad \frac{V_{Ht}}{\sum V_{Hp}} = F$$

siendo F la proporción entre el volumen total de cada hospedero y la suma de los volúmenes de sus hemiparásitos, m^i la masa y d la densidad de cada muestra .

Esta variable fue precisada con el fin de aproximarse al bouquet global que percibiría un insecto al aproximarse a un individuo de hospedero parasitado, para ser utilizada en el análisis de regresión múltiple con la tasa de visitas florales por insectos al hemiparásito.

2.4.6 Análisis discriminante de la abundancia de compuestos volátiles

Se realizó un análisis discriminante de la abundancia relativa de compuestos volátiles de hospederos y hemiparásitos (n=10), que permitió determinar si los hospederos (Sm, Fi y Bm) y los hemiparásitos (T-Sm, T-Fi, T-Bm) pertenecen a grupos distintos en función de la composición de sus volátiles. Se realizó además un análisis discriminante en conjunto para determinar diferencias en la composición de volátiles entre hospederos y hemiparásitos. El análisis discriminante se realizó con el programa STATISTICA (versión 6.0).

Dado que el número de compuestos analizados sobrepasaba la capacidad de análisis estadístico dado por el número de réplicas (n=10) se realizó un análisis factorial para resumir el número de variables químicas a componentes principales para proceder con los análisis discriminantes.

Los componentes principales son combinaciones lineales de las variables con mayor poder de discriminación entre grupos. El análisis factorial entrega cargas factoriales (*factor loadings*) y puntuaciones factoriales (*factor scores*) para cada componente principal. Las cargas factoriales son las contribuciones de los compuestos volátiles a cada componente principal. Las puntuaciones factoriales permiten ordenar las réplicas espacialmente para realizar el análisis discriminante.

2.4.7 Regresiones lineales múltiples entre tasa de visitas y compuestos volátiles

Para determinar si las tasas de visitas por insectos de distintas familias están relacionadas con la composición de volátiles, se efectuaron regresiones lineales múltiples entre las tasas de visitas florales por insectos en el hemiparásito y las componentes principales de la abundancia por unidad visual de compuestos volátiles de hospederos y hemiparásitos, para cada sistema hospedero-hemiparásito. Se realizó el análisis para los tres sistemas simultáneamente (Sm/ T-Sm, Fi/ T-Fi, Bm/ T-Bm) para cada familia de insecto, relacionando la tasa de visita floral en cada hemiparásito con las cinco componentes principales de cada hospedero (H1, H2, H3, H4, H5) y respectivo hemiparásito (P1, P2, P3, P4, P5) según la siguiente expresión:

$$y = \left(\beta_0 + \sum_{i=1}^5 \beta_{Hi} X_{Hi} + \sum_{i=1}^5 \beta_{Pi} X_{Pi} \right) + \varepsilon \quad \text{ec. 1}$$

donde y es la tasa de visita de insectos agrupados por familia, x es la puntuación factorial de cada componente principal de hospedero (H) y respectivo hemiparásito (P), β es la pendiente de cada componente principal, β_0 es el intercepto y ε es el error asociado a cada regresión lineal múltiple. Se aplicó además el procedimiento "forward stepwise" para seleccionar el mínimo de componentes principales que maximizan el ajuste de cada regresión.

Las regresiones lineales múltiples dieron como resultado ecuaciones predictoras en las que la tasa de visitas de cada familia de insecto fue explicada en función de las componentes principales de hospederos y hemiparásitos. La relación entre la tasa de visitas por insectos de cada familia y compuestos volátiles fue inferida a través del signo resultante al multiplicar la carga factorial significativa de cada compuesto en el componente principal y la pendiente (β) del componente principal en la ecuación predictora. Se generaron relaciones significativas positivas (+) y negativas (-), que indicarían, respectivamente, atraktividad o repelencia del compuesto volátil hacia los insectos visitantes de cada familia.

2.5 Resultados

2.5.1 Tasa de visitas determinadas en flores de *T. verticillatus*

El número de visitas totales por insectos evaluadas por hora en flores de *T. verticillatus* varió entre hospederos ($F_{2,27} = 227$, $P < 0,001$), siendo T-Sm el hemiparásito cuyas flores fueron las más visitadas por insectos, seguido de T-Fi y T-Bm, según las comparaciones post-hoc realizadas con la prueba de Tukey ($a > b > c$, $P < 0,05$).

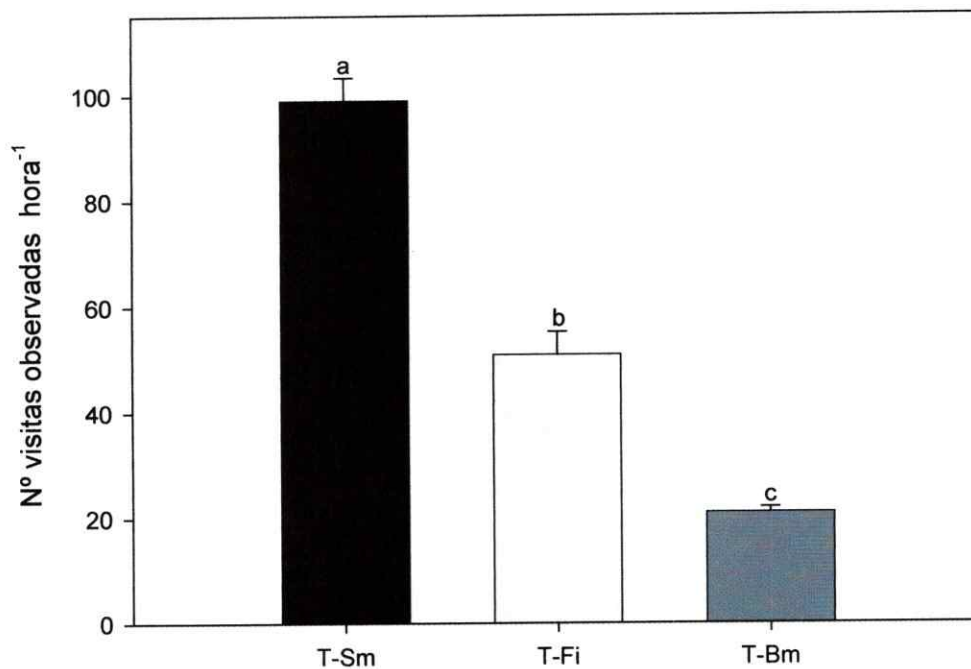


Figura 7. Visitas totales de insectos observadas por hora a flores de *T. verticillatus* en cada hospedero (promedio y error estándar). Las letras distintas sobre cada columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey con $P < 0,05$).

La tabla 1 presenta la tasa de visita de las especies de insectos observados como visitantes florales de *T. verticillatus*, algunos de los cuales se muestran en la Figura 8.

Tabla 1. Tasa de visitas por insectos de distintas especies a flores de *T. verticillatus*. Las letras distintas indican diferencias significativas entre hospederos (prueba de Tukey con $P < 0,05$).

Insecto visitante			N° visitas observadas por hora ($\bar{x} \pm E.E.$)		
Orden	Familia	Especie	T-Sm	T-FI	T-Bm
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus dahlbomi</i>	40 ± 2,2 (a)	6,1 ± 1,1 (b)	3,2 ± 0,6 (b)
		<i>Bombus terrestris</i>	21 ± 1,9 (a)	13 ± 1,6 (b)	4,0 ± 0,7 (c)
		<i>Apis mellifera</i> *	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,3
		<i>Centris nigerrima</i> *	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
	Megachilidae	<i>Megachile</i> sp.	11 ± 1,5 (a)	4,4 ± 0,6 (b)	1,7 ± 0,4 (b)
	Vespidae	<i>Hypodinerus</i> sp.	6,0 ± 0,9 (a)	1,3 ± 0,4 (b)	1,0 ± 0,3 (b)
<i>Vespula germanica</i> *		0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	n.r.	
Diptera	Tachinidae	Especie desconocida	3,4 ± 0,5 (b)	12 ± 1,5 (a)	1,9 ± 0,4 (b)
	Syrphidae	Especie desconocida *	8,1 ± 1,2 (a)	9,0 ± 1,7 (a)	4,7 ± 0,7 (a)
	Acroceridae	<i>Lasia rufa</i>	1,3 ± 0,5 (a)	0,1 ± 0,1 (b)	0,3 ± 0,2 (ab)
Lepidoptera	Pieridae	<i>Tatochila</i> spp.	2,8 ± 0,5 (a)	1,8 ± 0,4 (ab)	0,8 ± 0,2 (b)
		<i>Colias vauthierii</i> *	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1
		<i>Mathania leucothea</i>	2,5 ± 0,4 (a)	0,2 ± 0,1 (b)	0,3 ± 0,2 (b)
	Nymphalidae	<i>Vanessa carye</i> *	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,3
		<i>Iramea cytheris</i> *	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3
		<i>Cosmosatyrus</i> sp. *	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2
<i>Danaus plexipus</i> *	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	n.r.		
Total insectos			99 ± 4,4 (a)	51 ± 4,2 (b)	21 ± 1,0 (c)

n.r. no registrado. * n.s. diferencias no significativas ($P > 0,05$)



Figura 8. Fotos de insectos visitando flores de *T. verticillatus*.
a: *Bombus dahlbomi*; **b:** *B. terrestris*; **c:** *Centris nigerrima*; **d:** *Megachile* sp.;
e: Tachinidae (especie desconocida); **f:** *Lasia rufa*; **g:** Syrphidae (especie desconocida); **h:** *Tatochila autodice*; **i:** *Mathania leucothea*.

El hemiparásito T-Sm fue el más visitado por abejas de las familias Apidae (*Bombus terrestris* y *Bombus dahlbomi*) y Megachilidae (*Megachile* sp.), por avispas Vespidae (*Hypodinerus* sp.), por moscas Acroceridae (*Lasia rufa*) y por mariposas Pieridae (*Tatochila* spp. y *M. leucothea*). T-Fi fue el hemiparásito más visitado por moscas de la familia Tachinidae (Tabla 1, Figura 9). Los insectos *A. mellifera*, *C. nigerrima*, *V. germanica*, *C. vauthierii* y Nymphalidae visitaron indistintamente los hemiparásitos de distintos hospederos (Tabla 1, $P > 0,05$), probablemente debido a la baja tasa de visitas registrada.

Además, se observó visitas el picaflor *Sephanoides sephanoides* (Trochilidae) a flores de *T. verticillatus*, registrándose una menor tasa de visitas que por insectos en los mismos períodos de observación (Figura 9), y no encontrándose diferencias en la tasa de visitas por estas aves entre hemiparásitos de distintos hospederos ($F_{2,27} = 1,3$; $P = 0,28$).

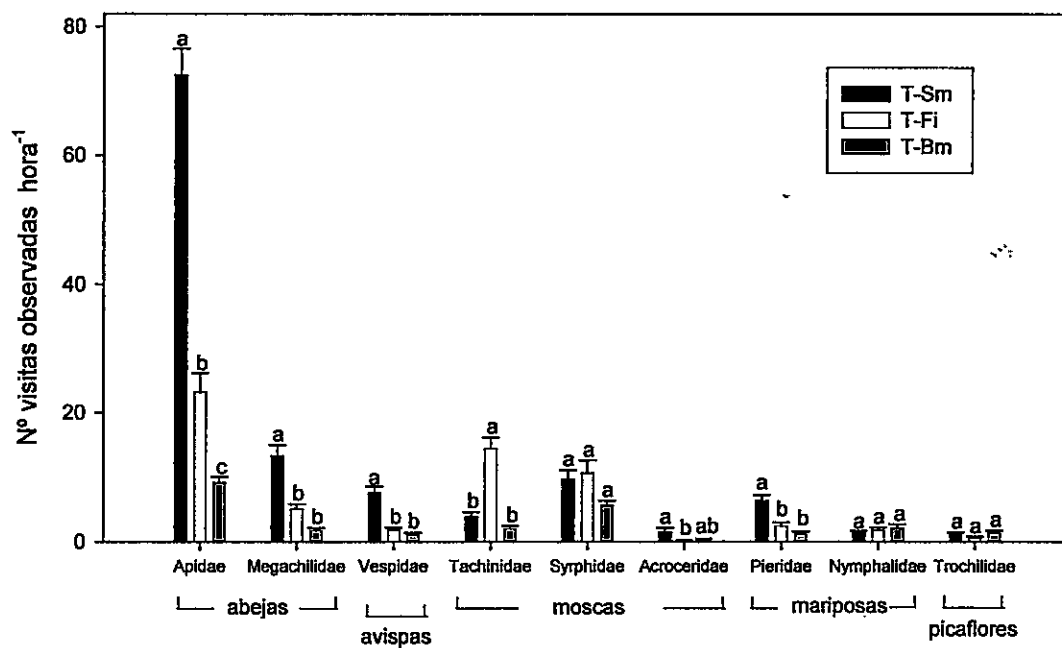


Figura 9. Tasa de visitas por insectos y picafleres a flores de *T. verticillatus* en cada hospedero (promedio y error estándar). Dentro de cada familia, las letras distintas sobre cada columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey con $P < 0,05$).

2.5.2 Variables visuales determinadas en *T. verticillatus*

No se encontraron diferencias morfológicas entre *T. verticillatus* sobre distintos hospederos (Tabla 2). Por lo tanto, según los ANOVA realizados para cada variable ($P > 0,05$), la apariencia visual del hemiparásito no afectaría la tasa de visitas a sus flores entre hospederos (T-Sm, T-Fi y T-Bm).

Tabla 2. Variables visuales determinadas en el hemiparásito en distintos hospederos.

Variable	T-Sm	T-Fi	T-Bm	F	P
Nº hemiparásitos por hospedero	3,3 ± 0,6	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,5	1,79	0,19
Volumen hemiparásitos / volumen hospedero	(4,3 ± 0,9) E-2	(1,5 ± 0,3) E-2	(3,3 ± 1,3) E-2	2,32	0,12
Nº flores abiertas del hemiparásito por hospedero	16 ± 2,7	16 ± 5,3	14 ± 5,7	1,24	0,31
Nº flores totales del hemiparásito por hospedero	35 ± 5,5	38 ± 10	26 ± 9,0	1,73	0,20
Nº flores abiertas / totales del hemiparásito por hospedero	(4,6 ± 0,5) E-1	(4,3 ± 0,6) E-1	(5,3 ± 1,1) E-1	0,42	0,66

2.5.3 Composición de volátiles de hospederos y de *T. verticillatus* en distintos hospederos

Fabiana imbricata fue el hospedero que presentó la mayor diversidad de compuestos volátiles, en contraste con *B. montana* (Tabla 3). De un total de 50 compuestos identificados en hospederos, 41 fueron identificados en *F. imbricata* (Fi), 23 en *S. montanus* (Sm) y sólo 9 en *B. montana* (Bm).

En los hemiparásitos se identificó un total de 17 compuestos, encontrándose leves diferencias en los volátiles identificados. El sabineno se identificó sólo en *T. verticillatus* sobre *S. montanus* (T-Sm), el canfeno sólo en *T. verticillatus* sobre *B. montana* (T-Bm), el γ -terpineno sólo en *T. verticillatus* sobre *F. imbricata* (T-Fi), en tanto que el acetato de (Z)-3-hexenilo no fue detectado en el hemiparásito sobre *F. imbricata* (T-Fi). Los demás volátiles fueron identificados en *T. verticillatus* proveniente de los tres hospederos (Tabla 3).

Con el fin de establecer diferencias en la composición de volátiles del hemiparásito y relacionarlas con la asociación a distintos hospederos, y también en la composición de volátiles de cada hospedero, se compararon hospederos y hemiparásitos en cuanto a la abundancia relativa de los compuestos volátiles identificados en ellos.

La Tabla 3 muestra las diferencias (valores más altos marcados en negrita) en la abundancia relativa de cada compuesto cuando se comparan hospederos y hemiparásitos independientemente. *Schinus montanus* (Sm) presenta una gran proporción de monoterpenos principalmente derivados del *p*-mentano, tales como limoneno (22%), sabineno (20%) y α -felandreno (12%).

Fabiana imbricata (Fi) presenta también una alta proporción del derivado de *p*-mentano *p*-cimeno (41%), además del monoterpeno tricíclico triciclono (18%) y una pequeña aunque variada proporción de derivados del ácido chiquímico. *Berberis montana* (Bm) presenta una gran proporción del acetato de (Z)-3-hexenilo (56%) y otros derivados de la ruta biosintética del acetato, tales como el (Z)-3-hexen-1-ol (3,4%) y el isovalerato de (Z)-3-hexenilo (1,2%), además de una gran proporción del monoterpeno acíclico α -ocimeno (26%).

Se observa que el hemiparásito presenta compuestos volátiles no detectados en los hospederos (isovalerato de metilo, decano y undecano) lo que sugiere una capacidad biosintética propia del hemiparásito, independiente del hospedero sobre el cual se encuentre.

Tabla 3. Abundancia relativa de compuestos volátiles (promedios y errores estándar, n=10) en hospederos y hemiparásitos comparados independientemente mediante prueba de Tukey con $P < 0,05$; n.d.: compuesto no detectado. Valores más altos marcados en negrita.

Compuestos	CAS	RI	Abundancia relativa (%)							
			Sm	Fl	Bm	T-Sm	T-Fl	T-Bm		
Derivados del acetato										
2-Metil-butanoato de metilo	866-57-5	782	(7,6 ± 3,5) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Isovalerato de metilo	556-24-1	783	n.d.	n.d.	n.d.	16 ± 2,9	11 ± 1,7	15 ± 3,4	n.d.	
(Z)-3-Hexen-1-ol	928-96-1	864	n.d.	n.d.	3,4 ± 0,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
2-Heptanona	110-43-0	893	n.d.	(1,1 ± 0,2) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Nonano	111-84-2	900	n.d.	(2,4 ± 1,2) E-1	n.d.	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,5	n.d.	
Decano	124-18-5	1000	n.d.	n.d.	n.d.	4,7 ± 0,4	3,6 ± 0,3	5,4 ± 0,8	n.d.	
Acetato de (Z)-3-hexenilo	3681-71-8	1007	n.d.	(1,9 ± 0,9) E-1	56 ± 8,0	1,2 ± 0,2	n.d.	2,0 ± 0,5	n.d.	
Acetato de hexilo	142-92-7	1014	n.d.	n.d.	(1,1 ± 0,5) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Undecano	1120-21-4	1100	n.d.	n.d.	n.d.	2,4 ± 0,3	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,4	n.d.	
1-Dodecano	112-41-4	1189	n.d.	(3,2 ± 0,7) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Isovalerato de (Z)-3-hexenilo	35154-45-1	1234	(1,5 ± 0,7) E-2	(3,5 ± 1,0) E-2	1,2 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Tridecano	629-50-5	1300	n.d.	(4,0 ± 1,0) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1-Tetradecano	1120-36-1	1393	n.d.	(9,6 ± 2,4) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Tetradecano	629-59-4	1400	n.d.	(5,0 ± 2,6) E-3	n.d.	(1,7 ± 0,8) E-1	(1,9 ± 0,8) E-1	(2,6 ± 0,8) E-1	n.d.	
Pentadecano	629-82-9	1500	n.d.	(8,3 ± 7,2) E-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

Compuestos	CAS	RI	Abundancia relativa (%)							
			Sm	FI	Bm	T-Sm	T-FI	T-Bm		
Isoprenoides										
Monoterpenos										
Bornileno	464-17-5	899	n.d.	(5,6 ± 2,0) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Triciclono	508-32-7	930	n.d.	18 ± 3,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
α -Tujeno	2867-05-2	931	9,4 ± 2,3	4,6 ± 1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
α -Pinenno	80-56-8	938	5,9 ± 2,3	3,3 ± 0,5	n.d.	31 ± 1,8	16 ± 3,8	27 ± 4,1		
Canfeno	79-92-5	957	n.d.	6,8 ± 1,5	1,6 ± 1,0	n.d.	n.d.	1,2 ± 0,2		
Sabineno	3387-41-5	977	20 ± 8,3	2,7 ± 0,4	n.d.	(9,5 ± 1,9) E-1	n.d.	n.d.		
β -Pinenno	127-91-3	979	(1,5 ± 0,4) E-1	(7,0 ± 3,1) E-2	n.d.	4,0 ± 1,6	1,2 ± 0,3	2,7 ± 0,6		
β -Mirceeno	123-35-3	993	11 ± 5,2	(3,3 ± 0,6) E-1	n.d.	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,4	3,9 ± 0,4		
α -Felandreno	99-83-2	1006	12 ± 4,3	(9,3 ± 2,3) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
3-Careno	13466-78-9	1012	(3,8 ± 1,5) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
α -Terpineno	99-86-5	1019	(4,3 ± 1,9) E-1	(4,9 ± 0,6) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>p</i> -Cimeno	99-87-6	1028	3,2 ± 0,8	41 ± 4,3	4,2 ± 1,2	2,2 ± 0,4	6,8 ± 1,4	2,4 ± 0,9		
Limoneno	138-86-3	1032	22 ± 3,4	(5,6 ± 1,2) E-1	2,5 ± 1,1	23 ± 1,5	36 ± 1,8	21 ± 1,8		
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	3779-61-1	1043	(6,4 ± 2,1) E-1	n.d.	(6,4 ± 1,9) E-1	n.d.	n.d.	n.d.		
α -Ocimeno	502-99-8	1053	8,8 ± 4,3	(9,4 ± 2,1) E-1	26 ± 5,9	3,8 ± 1,0	6,0 ± 1,5	7,0 ± 3,2		
γ -Terpineno	99-85-4	1066	1,9 ± 0,9	3,7 ± 0,5	n.d.	n.d.	2,1 ± 0,2	n.d.		
Linalol	78-70-6	1081	n.d.	(2,7 ± 0,5) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Terpinoleno	586-62-9	1091	(1,6 ± 0,8) E-1	1,0 ± 0,2	n.d.	(7,3 ± 1,1) E-1	1,7 ± 0,4	1,0 ± 0,2		
(<i>Z</i>)- β -Terpineol	7299-40-3	1108	n.d.	2,1 ± 0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
α -Tujona	646-80-5	1118	n.d.	(4,9 ± 0,7) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
(<i>E</i>)- <i>p</i> -Menta-2-en-1-ol	29803-81-4	1128	n.d.	(1,7 ± 0,3) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
alo-Ocimeno	673-84-7	1136	(1,4 ± 0,4) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Alcanfor	76-22-2	1147	n.d.	(5,1 ± 1,8) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

Compuestos	CAS	RI	Sm	FI	Abundancia relativa (%)				
					Bm	T-Sm	T-FI	T-Bm	
Isoprenoides									
p-Mentona	89-80-5	1156	n.d.	(4,7 ± 1,7) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Isomentona	491-07-6	1168	n.d.	(2,3 ± 0,6) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Borneol	507-70-0	1171	n.d.	(4,5 ± 1,9) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4-Terpineol	562-74-3	1184	(9,0 ± 4,8) E-2	3,0 ± 0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
α-Terpineol	98-55-5	1194	n.d.	(8,0 ± 2,4) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Sequitrpenos									
α-Copaeno	3856-25-5	1385	(1,3 ± 0,3) E-2	n.d.	n.d.	(5,7 ± 0,9) E-1	(1,4 ± 0,9) E-1	(1,4 ± 0,7) E-1	
α-Cedreno	469-61-4	1417	n.d.	(5,4 ± 3,4) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
β-Caroflano	87-44-5	1430	(2,1 ± 0,9) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
β-Cedreno	546-28-1	1434	n.d.	(1,1 ± 0,6) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Germacreno-D	23986-74-5	1495	1,3 ± 0,3	(9,1 ± 5,2) E-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
(E)-α-Farneseno	502-61-4	1510	1,4 ± 0,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Derivados del ácido chiquimico									
Benzaldehído	100-52-7	966	n.d.	(5,6 ± 1,0) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Acetofenona	98-86-2	1075	n.d.	(1,7 ± 0,9) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Benzoato de melilo	93-58-3	1102	(2,7 ± 1,9) E-1	(9,0 ± 2,8) E-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Salicilato de melilo	119-36-8	1196	n.d.	(2,3 ± 0,9) E-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

Al clasificar los compuestos según la ruta biosintética por la cual son producidos se observan más claramente las diferencias en composición de compuestos volátiles (Tabla 4). *Schinus montanus* y *F. imbricata* presentan isoprenoides en forma mayoritaria (98% y 90%), mientras que *B. montana* presenta principalmente derivados de la ruta biosintética del acetato (61%) y una menor proporción de isoprenoides (35%). *Fabiana imbricata* presenta además una mayor proporción de derivados del ácido chiquímico (Tabla 4). Los hemiparásitos de distintos hospederos no presentan diferencias significativas en composición de compuestos de distintas rutas biosintéticas.

Tabla 4. Abundancia relativa de compuestos volátiles (promedios y errores estándar, n=10) en hospederos y hemiparásitos, clasificados según ruta biosintética, comparados independientemente mediante prueba de Tukey con $P < 0,05$; n.d.: compuesto no detectado. Valores más altos marcados en negrita.

Compuestos	Abundancia relativa (%)					
	Sm	Fi	Bm	T-Sm	T-Fi	T-Bm
Derivados del acetato	(9,0 ± 4,0) E-2	1,1 ± 0,2	61 ± 8,1	26 ± 3,0	18 ± 1,8	28 ± 4,5
Isoprenoides	98 ± 0,9	90 ± 1,2	35 ± 7,3	69 ± 2,7	73 ± 3,2	66 ± 3,9
Derivados del ácido chiquímico	(2,7 ± 1,9) E-1	1,1 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

2.5.4 Análisis discriminante de la abundancia de componentes volátiles de hospederos y hemiparásitos

Se encontró que las componentes principales de las abundancias relativas de compuestos volátiles permiten discriminar significativamente la composición de volátiles entre hospederos ($U= 0,006$; $F= 57$; $P <0,0001$), entre hemiparásitos parasitando distintos hospederos ($U= 0,052$; $F= 16$; $P <0,0001$) y entre hospederos y hemiparásitos analizados en conjunto ($U= 0,001$; $F= 38$; $P <0,0001$). La representación gráfica de cada análisis discriminante se observa en las Figuras 10 a 12.

Las distancias de Mahalanobis de cada análisis discriminante son significativas entre hospederos (Tabla 5) y entre hemiparásitos (Tabla 6). Sin embargo, la composición de volátiles no varía entre hemiparásitos de distintos hospederos según el análisis en conjunto (Figura 12, Tabla 7), siendo distinta a la de sus respectivos hospederos (Tabla 7).

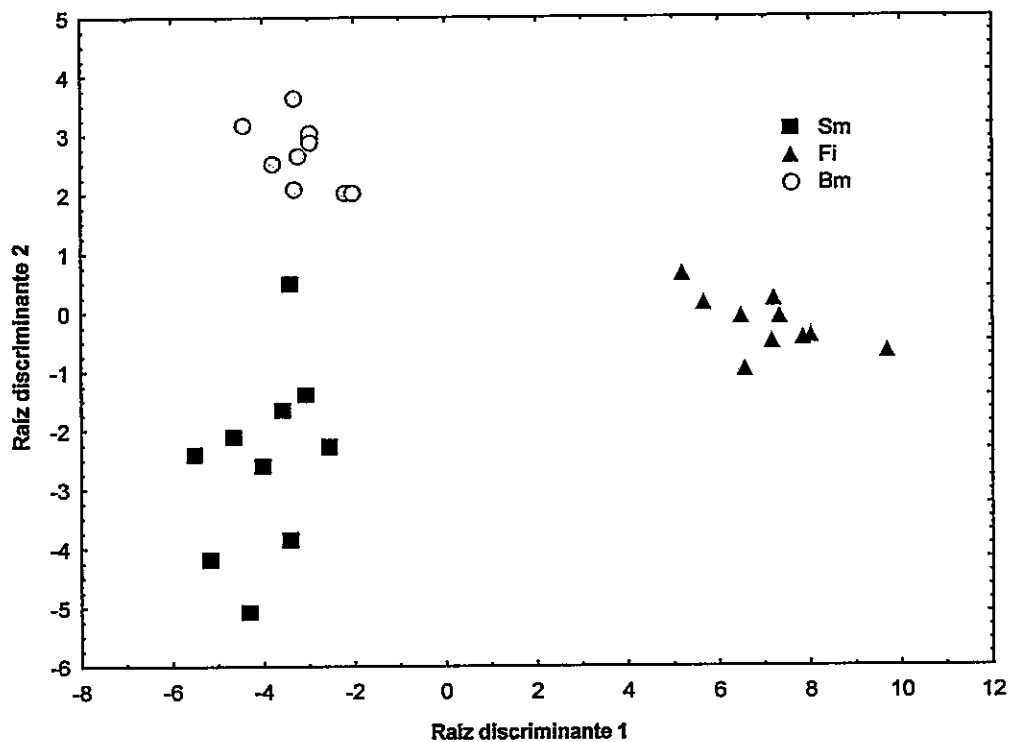


Figura 10. Análisis discriminante de la composición de volátiles en hospederos de *T. verticillatus*.

Tabla 5. Discriminación entre hospederos de *T. verticillatus* (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de *P* (bajo la diagonal), en función de la composición de sus volátiles (Figura 10).

<i>P</i> \ <i>D</i>	Sm	Fi	Bm
Sm		142	31
Fi	< 0,001		126
Bm	< 0,001	< 0,001	

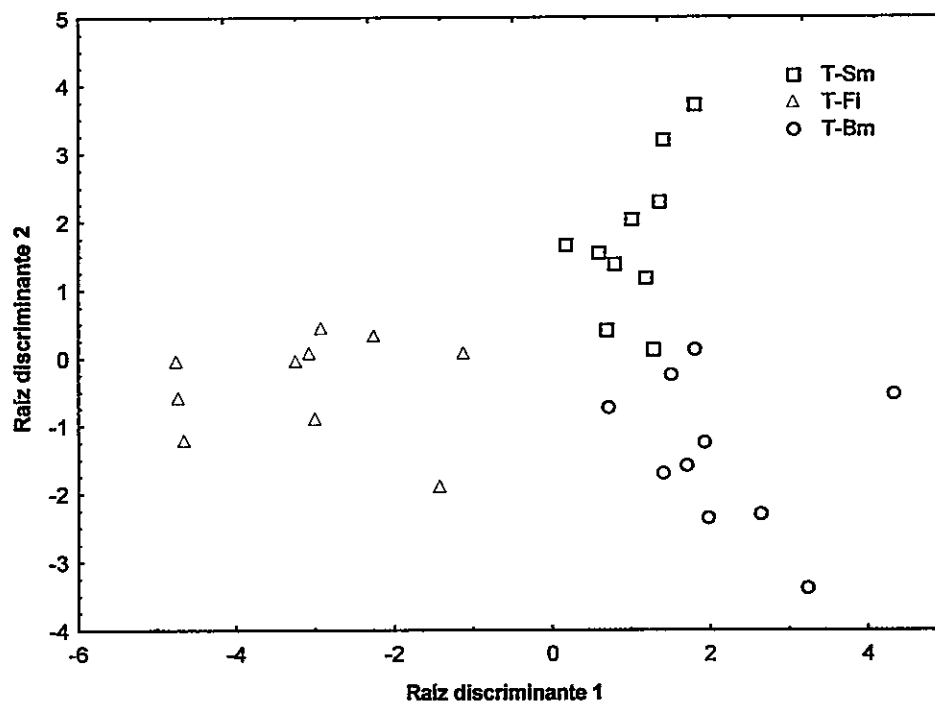


Figura 11. Análisis discriminante de la composición de volátiles en *T. verticillatus* de distintos hospederos.

Tabla 6. Discriminación entre *T. verticillatus* de distintos hospederos (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de *P* (bajo la diagonal), en función de la composición de sus volátiles (Figura 11).

<i>P</i> \ <i>D</i>	T-Sm	T-Fi	T-Bm
T-Sm		18	9,5
T-Fi	< 0,001		24
T-Bm	< 0,001	< 0,001	

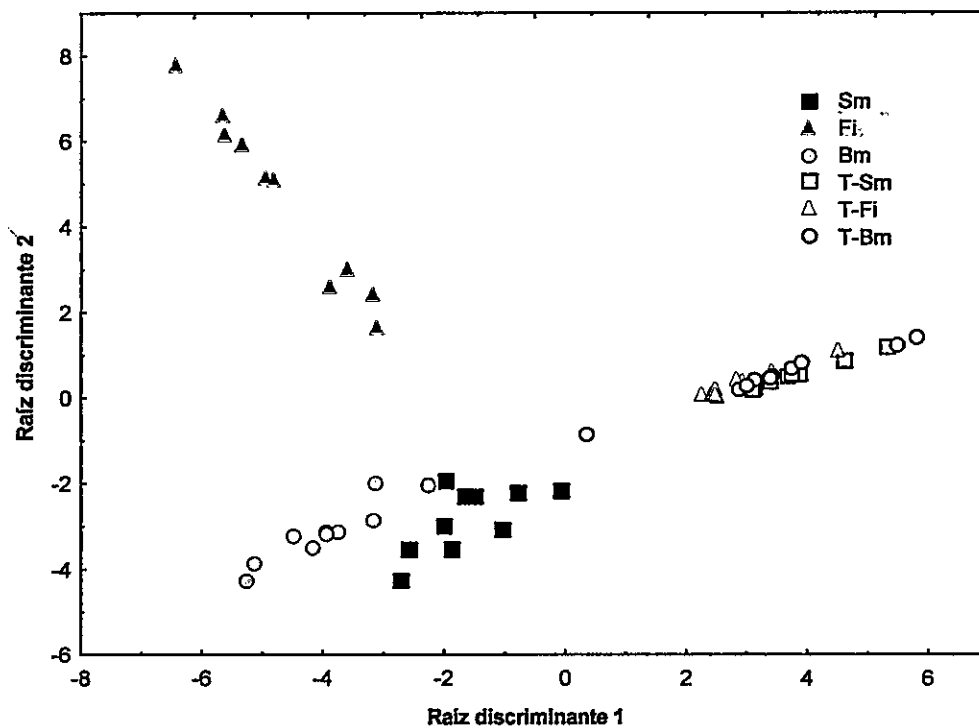


Figura 12. Análisis discriminante de la composición de volátiles de hospederos y hemiparásitos.

Tabla 7. Discriminación entre hospederos y hemiparásitos analizados en conjunto (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de p (bajo la diagonal), en función de la composición de sus volátiles (Figura 12).

<i>P</i> \ <i>D</i>	Sm	Fi	Bm	T-Sm	T-Fi	T-Bm
Sm		89	72	70	56	68
Fi	<0,001		84	99	84	94
Bm	<0,001	<0,001		92	75	85
T-Sm	<0,001	<0,001	<0,001		1,3	0,14
T-Fi	<0,001	<0,001	<0,001	0,40		0,71
T-Bm	<0,001	<0,001	<0,001	0,99	0,71	

El análisis discriminante de la composición de productos volátiles entre hospederos y entre hemiparásitos, realizados independientemente con el procedimiento "forward stepwise", consideró hasta el quinto componente principal considerando una varianza explicada total cercana al 80%.

El análisis factorial resumió previamente la información de las abundancias relativas de 50 compuestos volátiles presentes en los tres hospederos (Sm, Fi y Bm) en las cinco componentes principales h1, h2, h3, h4 y h5 para realizar el análisis discriminante entre hospederos. Con el mismo procedimiento, se resumió la información de las abundancias relativas de 17 compuestos presentes en los tres hemiparásitos (T-Sm, T-Fi, T-Bm) en los componentes principales p1, p2, p3, p4 y p5 para realizar el análisis discriminante entre hemiparásitos. Las cargas factoriales significativas y la varianza explicada de cada componente principal se informan en Tabla 8. Los componentes principales h1, h3 y h5 presentan cargas significativas de volátiles presentes principalmente en Fi (Tabla 3), mientras que h2 y h4 presentan cargas significativas de volátiles presentes principalmente en Sm. En hemiparásitos, las cargas significativas de los componentes p2 y p3 (Tabla 8) corresponden a isoprenoides cuya mayor proporción se encuentra en T-Sm y T-Fi, respectivamente (Tabla 3).

	Componentes principales									
	h1	h2	h3	h4	h5	p1	p2	p3	p4	p5
Isoprenoides										
Sesquiterpenos										
α -Copaeno							-0,81			
α -Cedreno	0,94									
β -Cariofileno		-0,82								
β -Cedreno	0,93									
Derivados del ácido chiquímico										
Benzaldehído			0,71							
Salicilato de metilo			0,72							
% Varianza	36	15	8,8	6,7	4,9	28	18	12	9,6	8,7
% Varianza acumulada	36	51	60	67	72	28	46	58	68	76

2.5.5 Regresiones lineales múltiples entre tasa de visitas y compuestos volátiles

Para determinar la relación entre la abundancia de compuestos volátiles de hospederos y hemiparásitos y las tasas de visitas por insectos a flores de *T. verticillatus* en distintos hospederos se efectuaron análisis de regresión múltiple utilizando como variables independientes las componentes principales de la abundancia por unidad visual de compuestos volátiles, cuyas cargas factoriales significativas se informan en la Tabla 9.

	Componentes principales									
	H1	H2	H3	H4	H5	P1	P2	P3	P4	P5
Isoprenoides										
Sesquiterpenos										
α-Copaeno		0,97						-0,89		
α-Cedreno	0,99									
β-Cedreno	0,98									
α-Farneseno		0,79								
Derivados del ácido chiquímico										
Benzaldehído			0,85							
Benzoato de metilo		0,87								
% Varianza	46	16	11	7,1	4,9	36	21	13	10	6,2
% Varianza acumulada	46	62	73	80	85	36	57	70	80	86

Se generaron las siguientes ecuaciones predictoras como resultado de la regresión lineal múltiple:

$$\text{Visitas Apidae} = (30 + 0,24 H5 + 0,30 H2 - 0,21 P2 - 0,27 P1 - 0,21 H3 - 0,31 P4) + 19 \quad (\text{ec. 2})$$

$$\text{Visitas Megachilidae} = (5,7 - 0,54 P4 - 0,35 P1 - 0,19 P2 - 0,22 H3 - 0,18 H1 - 0,15 P3) + 4,1 \quad (\text{ec. 3})$$

$$\text{Visitas Vespidae} = (3,0 + 0,34 H5 - 0,27 P2 + 0,23 H2 - 0,24 P1 - 0,18 H3) + 2,6 \quad (\text{ec. 4})$$

$$\text{Visitas Tachinidae} = (5,8 + 0,71 P2 + 0,45 H3 + 0,15 H5 - 0,14 P5) + 2,6 \quad (\text{ec. 5})$$

$$\text{Visitas Syrphidae} = (7,4 + 0,28 H4 - 0,22 P1 + 0,22 H2) + 4,1 \quad (\text{ec. 6})$$

$$\text{Visitas Acroceridae} = (0,54 + 0,83 H2 - 0,21 P2 + 0,30 P3 - 0,19 H3) + 0,84 \quad (\text{ec. 7})$$

$$\text{Visitas Pieridae} = (2,8 + 0,32 H5 - 0,31 P1 - 0,19 P3 - 0,19 H3 - 0,17 H4) + 2,3 \quad (\text{ec. 8})$$

$$\text{Visitas Nymphalidae} = (1,5 + 0,53 P2 - 0,31 H1 - 0,36 H4) + 1,1 \quad (\text{ec. 9})$$

donde H1 a H5 y P1 a P5 son las componentes principales de las abundancias de volátiles por unidad visual de hospederos y hemiparásitos, respectivamente. Los coeficientes marcados en **negrita** son significativos ($p < 0,05$) para cada ecuación. El resumen del procedimiento "forward stepwise" para cada regresión múltiple se muestra en Tabla 10.

Las relaciones entre abundancia de compuestos volátiles y tasa de visitas por insectos, inferidas de los análisis de regresión múltiple se informan en la Tabla 11.

Tabla 10. Resumen de los procedimientos "forward stepwise" de los análisis de regresión múltiple entre tasa de visitas y componentes principales de hospederos y hemiparásitos. Valores marcados en negrita son significativos ($P < 0,05$).

Familia Insecto	Paso	Variable Ingresada	β	F	P	R	R ²
Apidae	1	H5	0,24	11	0,003	0,52	0,27
	2	H2	0,30	5,8	0,023	0,63	0,40
	3	P2	-0,21	2,0	0,174	0,67	0,44
	4	P1	-0,27	2,1	0,161	0,70	0,49
	5	H3	-0,21	1,2	0,279	0,72	0,51
	6	P4	-0,31	1,8	0,191	0,74	0,55
Megachilidae	1	P4	-0,54	8,2	0,008	0,48	0,23
	2	P1	-0,35	3,9	0,060	0,57	0,32
	3	P2	-0,19	2,7	0,116	0,62	0,39
	4	H3	-0,22	2,1	0,160	0,66	0,43
	5	H1	-0,18	1,8	0,195	0,69	0,47
	6	P3	-0,15	1,0	0,319	0,70	0,49
Vespidae	1	H5	0,34	5,3	0,029	0,40	0,16
	2	P2	-0,27	3,2	0,086	0,50	0,25
	3	H2	0,23	2,3	0,144	0,55	0,31
	4	P1	-0,24	1,9	0,186	0,60	0,36
	5	H3	-0,18	1,3	0,269	0,62	0,39
Tachinidae	1	P2	0,71	34	<0,001	0,74	0,55
	2	H3	0,45	25	<0,001	0,87	0,77
	3	H5	0,15	2,3	0,142	0,89	0,78
	4	P5	-0,14	2,6	0,123	0,90	0,80
Syrphidae	1	H4	0,28	2,5	0,122	0,29	0,08
	2	P1	-0,22	1,7	0,199	0,37	0,14
	3	H2	0,22	1,5	0,227	0,43	0,19
Acroceridae	1	H2	0,83	17	<0,001	0,61	0,37
	2	P2	-0,21	2,6	0,121	0,65	0,43
	3	P3	0,30	1,4	0,244	0,68	0,46
	4	H3	-0,19	1,7	0,209	0,70	0,49
Pieridae	1	H5	0,32	3,3	0,080	0,32	0,11
	2	P1	-0,31	2,5	0,124	0,43	0,18
	3	P3	-0,19	1,6	0,223	0,48	0,23
	4	H3	-0,19	1,2	0,278	0,51	0,26
	5	H4	-0,17	1,0	0,326	0,54	0,29
Nymphalidae	1	P2	0,53	1,4	0,244	0,22	0,05
	2	H1	-0,31	1,8	0,187	0,33	0,11
	3	H4	-0,36	2,0	0,170	0,41	0,17

Tabla 11. Relaciones inferidas entre compuestos volátiles y visitas por insectos a flores de *T. verticillatus*

Familias insecto	Componente principal	β	compuesto	Carga factorial	relación compuesto-visita insecto
Apidae	H5	0,24	(Z)-3-hexen-1-ol	-0,72	-
			Acetato de hexilo	-0,73	-
			3-Careno	0,74	+
	H2	0,30	2-Metil-butanoato de metilo	0,84	+
			Sabineno	0,77	+
			β -Mirceno	0,72	+
			Limoneno	0,86	+
			(E)- β -Ocimeno	0,91	+
			α -Ocimeno	0,78	+
			alo-Ocimeno	0,96	+
			α -Copaeno	0,97	+
			α -Farneseno	0,79	+
			Benzoato de metilo	0,87	+
Megachilidae	P4	-0,54	Tetradecano	0,87	-
Vespidae	H5	0,34	(Z)-3-hexen-1-ol	-0,72	-
			Acetato de hexilo	-0,73	-
			3-Careno	0,74	+
Tachinidae	P2	0,71	Undecano	0,77	+
			p-Cimeno	0,87	+
			Limoneno	0,84	+
			γ -Terpineno	0,90	+
	H3	0,45	Bornileno	0,82	+
			α -Triciclono	0,76	+
			Canfeno	0,78	+
			Alcanfor	0,70	+
			Isomentona	0,86	+
			Borneol	0,96	+
Acroceridae	H2	0,83	Benzaldehído	0,85	+
			2-Metil-butanoato de metilo	0,84	+
			Sabineno	0,77	+
			β -Mirceno	0,72	+
			Limoneno	0,86	+
			(E)- β -Ocimeno	0,91	+
			α -Ocimeno	0,78	+
			alo-Ocimeno	0,96	+
			α -Copaeno	0,97	+
			α -Farneseno	0,79	+
Benzoato de metilo	0,87	+			

2.6 Discusión

2.6.1 Efecto de la composición de volátiles del hospedero sobre la tasa de visitas por insectos al hemiparásito

Los hemiparásitos presentan en general una baja producción de volátiles en relación a una planta autótrofa probablemente debido a su más baja tasa de fotosíntesis (Boardman, 1977; Strong y col., 2000). Es así como por ejemplo *Tristerix longibracteatus*, con flores similares a las *Tristerix verticillatus*, presenta compuestos identificados en abundancias cercanas al límite de detección de los métodos analíticos empleados (Knudsen y col., 2004). *Tristerix verticillatus* también presentó una baja abundancia (TIC) de compuestos volátiles con respecto a sus hospederos y sus flores no presentan una fragancia perceptible. Debido a la baja producción de compuestos volátiles de los hemiparásitos relativa a sus hospederos y a que los aspectos visuales del hemiparásito no parecen afectar mayormente la tasa de visitas en hemiparásitos de distintos hospederos, la variación en la tasa de visitas florales al hemiparásito entre hospederos parece relacionarse principalmente con la abundancia de volátiles de sus hospederos (Tabla 11).

Los hemiparásitos sobre *S. montanus* (T-Sm) fueron los más visitados por insectos de distintas familias (Figura 9), principalmente por abejas Apidae (*B. dahlbomi* y *B. terrestris*). Las tasas de visitas de éstas se relacionaron positivamente en forma significativa con la abundancia de terpenos (Tabla 11) presentes principalmente en sus hospederos, y también con la abundancia del 2-metil-butanoato de metilo y del benzoato de metilo presentes sólo en hospederos. Esto sugiere la atractividad de estos compuestos hacia estos visitantes (Apidae), la

cual ha sido informada al menos para flores que presentan estos compuestos. El sabineno y el copaeno son importantes constituyentes de fragancias de flores atractivas hacia abejas (Gerlach y Schill, 1991; Jakobsen, 1994), los que además se encuentran en T-Sm pudiendo intensificar su efecto atractivo. El limoneno es atrayente del abejorro *Bombus terrestris* (Fonta y Masson, 1984). El α -farneseno y el 3-careno son los volátiles más activos en la atracción de abejas hacia flores de *Brassica napus* (Blight, 1997). La atractividad de α -farneseno hacia *Bombus* spp. probablemente esté relacionada con su actividad biológica como feromona de marcación en especies del género (Svensson, 1977). El benzoato de metilo otorga un olor dulce característico a flores de *Antirrhinum* sp., visitadas abundantemente por abejas *Bombus* spp. (Odell y col., 1999). El α -ocimeno ha sido descrito como un débil atrayente hacia abejas, aunque a concentraciones altas puede resultar menos atractivo que a concentraciones bajas (Williams y Dodson, 1972). Esta última propiedad puede relacionarse con la más alta proporción del α -ocimeno en el hospedero Bm, cuyo hemiparásito es el menos visitado por Apidae. Las fragancias atractivas hacia abejorros podrían ser asociadas por éstos con aspectos visuales (Lavery, 1980) y con la presencia de néctar (Raguso, 2004) para intensificar la eficiencia en su forrajeo.

El efecto disuasivo del acetato de hexilo sobre visitantes Apidae (Tabla 11) puede relacionarse con su actividad como feromona de alarma en abejas (Henning y Teuber, 1992). Este compuesto, junto (Z)-3-hexen-1-ol, están presentes únicamente en Bm, hospedero del hemiparásito menos visitado por abejas, y por insectos en general. La tasa de visitas por avispas Vespidae también se relaciona negativamente con la abundancia de estos compuestos (Tabla 11). Se ha sugerido

que la falta de atractividad de derivados del acetato, tales como acetato de hexilo y el (Z)-3-hexen-1-ol, hacia insectos visitantes en general es la falta de reconocimiento por parte de estos como volátiles de flores (Honda, 1998), por ser mas bien característicos de hojas ("green leaf volatiles").

La tasa de visitas por las abejas Megachilidae (*Megachile* spp.) se relacionó negativamente con tetradecano presente en los hemiparásitos (Tabla 11), el cual se presenta indistintamente en hemiparásitos sobre los tres hospederos. La percepción por abejas de hidrocarburos alifáticos relativamente volátiles, tales como el tetradecano ha sido reconocida (Keeping, 1982). Por otra parte el tetradecano se ha determinado como constituyente de la feromona de alarma de la abeja *Trigona gribodoi* (Keeping, 1982), no descartándose por lo tanto su posible efecto disuasivo en otras especies de abejas. Por último, se ha determinado la repelencia de hidrocarburos alifáticos depositados en flores por otras abejas (Stout y col., 1998).

Los hemiparásitos T-FI fueron los mayormente visitados por moscas Tachinidae (Figura 9), cuyas tasas de visita se relacionaron positivamente en forma predominante con la abundancia de monoterpenos derivados del canfano y del *p*-mentano, y también con benzaldehído (derivado del ácido chiquímico), presentes en proporción significativamente mayor en éstos o en *F. imbricata* (Tabla 3). La atractividad de algunos de estos compuestos a insectos Tachinidae ha sido previamente informada. El borneol ha sido reportado como atrayente de *Cyzenis albicans* (Tachinidae) por Roland y col. (1985). El benzaldehído ha sido empleado en trampas para insectos de interés agronómico siendo efectivo en la atracción de insectos de la familia Tachinidae (James, 2005). La atractividad del bornileno, α -

triciclono, canfeno y alcanfor hacia insectos Tachinidae (Tabla 11) podría estar relacionada con su semejanza estructural con el borneol (Figura 13).

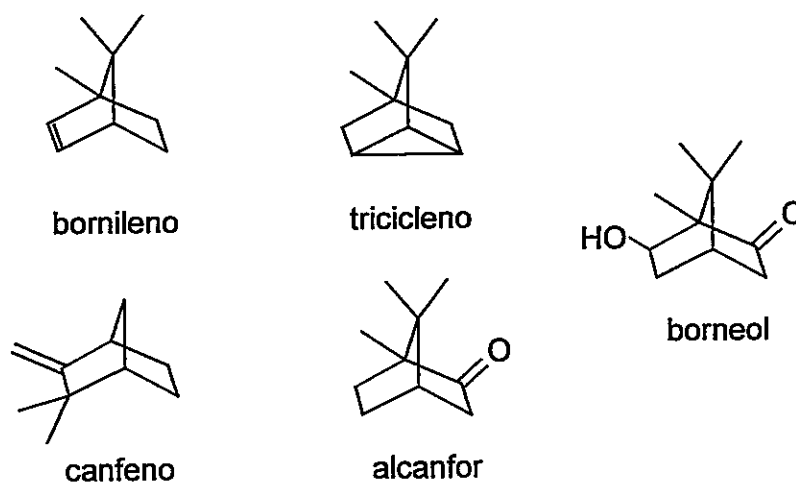


Figura 13. Estructuras de monoterpenos presentes principalmente en *F. imbricata*

No se ha reportado la actividad de la isomentona, limoneno, *p*-cimeno o γ -terpineno hacia moscas Tachinidae.

La mosca *Lasia rufa* fue la única especie registrada de la familia Acroceridae, la cual posee una larga proboscis bien adaptada a la longitud de las flores de *T. verticillatus* para el acceso a su néctar (Figura 8). Su tasa de visitas principalmente en T-Sm se relacionó positivamente con compuestos volátiles de su hospedero Sm, también atractivos hacia abejas Apidae (Tabla 11). Es posible que el olor dulce otorgado por compuestos atractivos hacia abejas sea detectado también por esta mosca como un indicador de la presencia de néctar como recurso floral disponible. En este sentido, se ha descrito que moscas melitófilas (tales como

Lasia rufa) pueden visitar flores que presentan fragancias que también son atractivas hacia abejas (Proctor y col., 1996).

Los compuestos atractivos de la Tabla 11 principalmente corresponden a isoprenoides presentes significativamente en una mayor proporción en *S. montanus* (H2) y en *F. imbricata* (H3), destacándose la importancia de este tipo de compuesto en la atraktividad de insectos visitantes florales, como ha sido sugerido por otros autores (Borg-Karlson y col., 1994; Theis y Lerdau, 2003) los que además pueden emitirse desde las hojas (Caissard y col., 2004). La influencia de los volátiles de los hospederos podría ser facilitada además por la débil fragancia en flores del hemiparásito, característica de flores rojas y tubulares (Proctor y col., 1986). Sin embargo, se observa también la importancia de otros compuestos atractivos tales como derivados del ácido chiquímico (benzaldehído y benzoato de metilo) a pesar de encontrarse en pequeñas proporciones. De este modo, la atracción de insectos de cada familia podría deberse al efecto conjunto de compuestos volátiles (bouquet), como lo describe Reis y col. (2004). En otras palabras, el efecto se debería más que a un compuesto o una clase de compuesto, al producto de la interacción entre compuestos de distintas clases.

2.5.2 Tasa de visitas no relacionadas directamente con la abundancia de compuestos volátiles

Tristerix verticillatus presenta visitantes que no son afectados mayormente por la abundancia de compuestos volátiles (Trochilidae, Syrphidae, Nymphalidae). Los picaflores se presentan principalmente en flores tubulares de color rojo, carácter floral que probablemente asocien con la presencia de abundante néctar, no presentando capacidad perceptiva hacia la variación de compuestos volátiles (Proctor y col., 1996). Las moscas Syrphidae constituyen un grupo de insectos visitantes atraídos principalmente por flores tubulares con un gran contenido de néctar (Proctor y col., 1996). Se ha informado previamente de la prioridad del color sobre el olor de las flores en las visitas por mariposas del género *Vanessa* (Nymphalidae) (Ômura y Honda, 2005), principal género de Nymphalidae registrado en *T. verticillatus*. Estos ensambles visitan indistintamente flores de *T. verticillatus* independiente del hospedero sobre el cual se encuentren (Figura 9). Es probable que esto se deba a que el aspecto visual del hemiparásito tampoco parece variar entre hospederos, según las variables analizadas (Tabla 2).

Las mariposas Pieridae visitan preferentemente T-Sm (Figura 9). Sin embargo, su tasa de visitas no se relaciona significativamente con la abundancia de compuestos volátiles (Tabla 10). Esto sugiere el efecto de otras variables no consideradas en el estudio tales como la abundancia de néctar o la presencia de compuestos semi-volátiles. En este sentido, se ha informado de la actividad de hidrocarburos alifáticos, tales como el heptacosano y el nonacosano, como feromonas de mariposas Pieridae (Sappington y Taylor, 1990).

2.5.3 Posibles efectos de la composición de productos volátiles del hospedero sobre la polinización de su hemiparásito

Las visitas registradas en marzo (época de mayor floración), corresponden principalmente a insectos (98%). Al menos en el caso de dos especies de insectos, que están entre los visitantes principales (Tabla 1), se demostró que ellos efectivamente eran capaces de transportar polen. En la Figura 14 se observa polen de *T. verticillatus*, descrito previamente por Ulriksen (2003), en abdomen y tarsos de las abejas *Bombus dalbohmi* y *Megachile* sp. visitando flores del hemiparásito. En este sentido, este trabajo constituye un primer acercamiento a la determinación del rol químico del hospedero sobre las eventuales relaciones de polinización por insectos de su hemiparásito, aunque aún falta por determinar la efectividad de los insectos como polinizadores de *T. verticillatus*.

Según los resultados obtenidos, la composición de productos volátiles de *S. montanus* se relaciona con la mayor tasa de visitas principalmente por *Bombus* spp. (Apidae) en T-Sm, lo que posiblemente permita una mayor transferencia de polen entre *T. verticillatus* de este hospedero y en consecuencia una mayor probabilidad de fructificación.

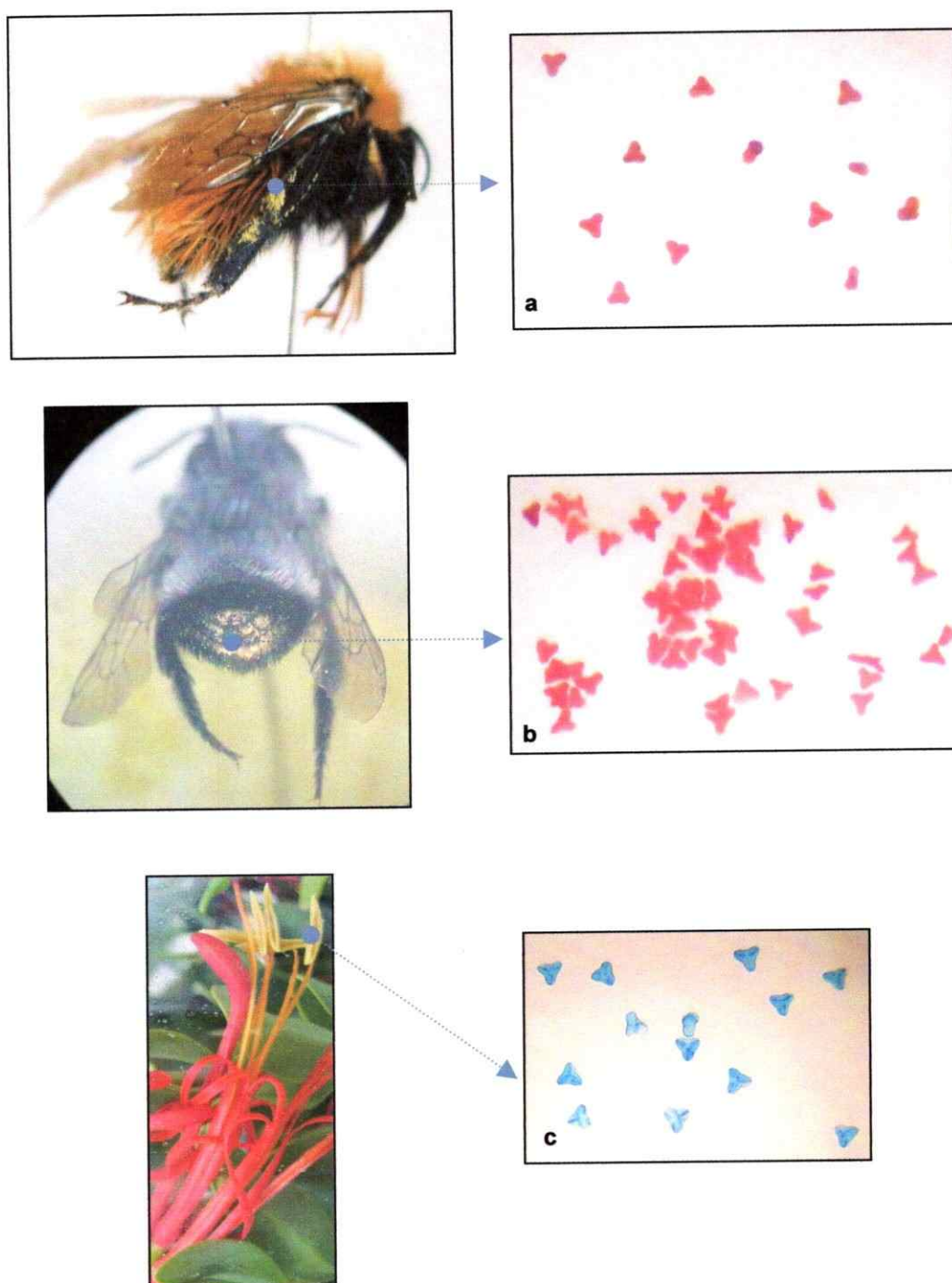


Figura 14. Granos de polen colectados en abejas visitando *T. verticillatus*: a. *Bombus dahlbomi*, b. *Megachile* sp. (tinción con fucsina); y en c. flores de *T. verticillatus* (tinción con azul de lactofenol). Aumento microscópico 540x.

2.5.4 Posible diferenciación genética del hemiparásito mediada por la composición de productos volátiles de sus hospederos.

Se determinó el efecto del hospedero sobre la composición de productos volátiles del hemiparásito y la influencia de los compuestos volátiles del hospedero sobre las visitas por insectos a flores de *T. verticillatus*. Si distintas composiciones de productos volátiles de hospederos pudieran influir determinadamente sobre la tasa de visitas florales por insectos al hemiparásito, facilitando la orientación de insectos atraídos por estos compuestos y evitando la visita de insectos que sean repelidos por éstos, se restringiría la actividad de insectos sobre el hemiparásito, dependiendo del hospedero sobre el cual se encuentre, limitándose la dispersión de polen a hemiparásitos que crecen sobre otros hospederos. De esta forma, es posible que se produzca eventualmente un aislamiento reproductivo que permitiría la especiación de un hemiparásito a través de la especialización en un hospedero particular (Overton, 1997; Norton y Carpenter, 1998). Sería entonces interesante estudiar cuál es el rol de los insectos en la transferencia de polen que pueda propiciar una diferenciación genética del hemiparásito dependiendo del hospedero sobre el cual se encuentre, en comparación al de los picaflores. Según los resultados obtenidos, los visitantes del hemiparásito parecen estar fuertemente influenciados por los volátiles del hospedero, cambiando la composición del conjunto de visitantes según la composición de volátiles del hospedero sobre el cual se encuentre. Sin embargo, picaflores y algunos insectos (Syrphidae y Nymphalidae) visitan al parecer sin discriminar entre hemiparásitos facilitando el transporte de polen entre *T. verticillatus* de distintos hospederos, aunque su tasa de visita es baja en comparación con la de los principales visitantes según resultados obtenidos en la época de mayor floración de *T. verticillatus*.

2.5.5 Relación entre la quimiotaxonomía de los hospederos y la tasa de visitas por insectos a las flores del hemiparásito

Berberis montana (Ranunculales: Berberidaceae) es filogenéticamente más primitiva que las otras dos especies de hospedero, *Schinus molle* (Sapindales: Anacardiaceae) y *Fabiana imbricata* (Solanales: Solanaceae), según lo informado por el Angiosperm Phylogeny Group (APG II, 2003; ver Figura 15), lo que podría estar relacionado con una producción mayor de volátiles de estructura relativamente simple como el acetato de hexenilo y el ocimeno, poco atractivos a insectos visitantes florales. En cambio, *S. molle* y *F. imbricata*, más recientes y cercanas filogenéticamente, se caracterizan por una alta producción de isoprenoides, que se relacionan con una mayor visita por insectos en el hemiparásito, principalmente abejas. *F. imbricata*, la especie de hospedero más avanzada filogenéticamente presenta además monoterpenos más complejos biosintéticamente (ej: borneol) y derivados del ácido chiquímico (ej: benzaldehído), especialmente atractivos hacia insectos Tachinidae.

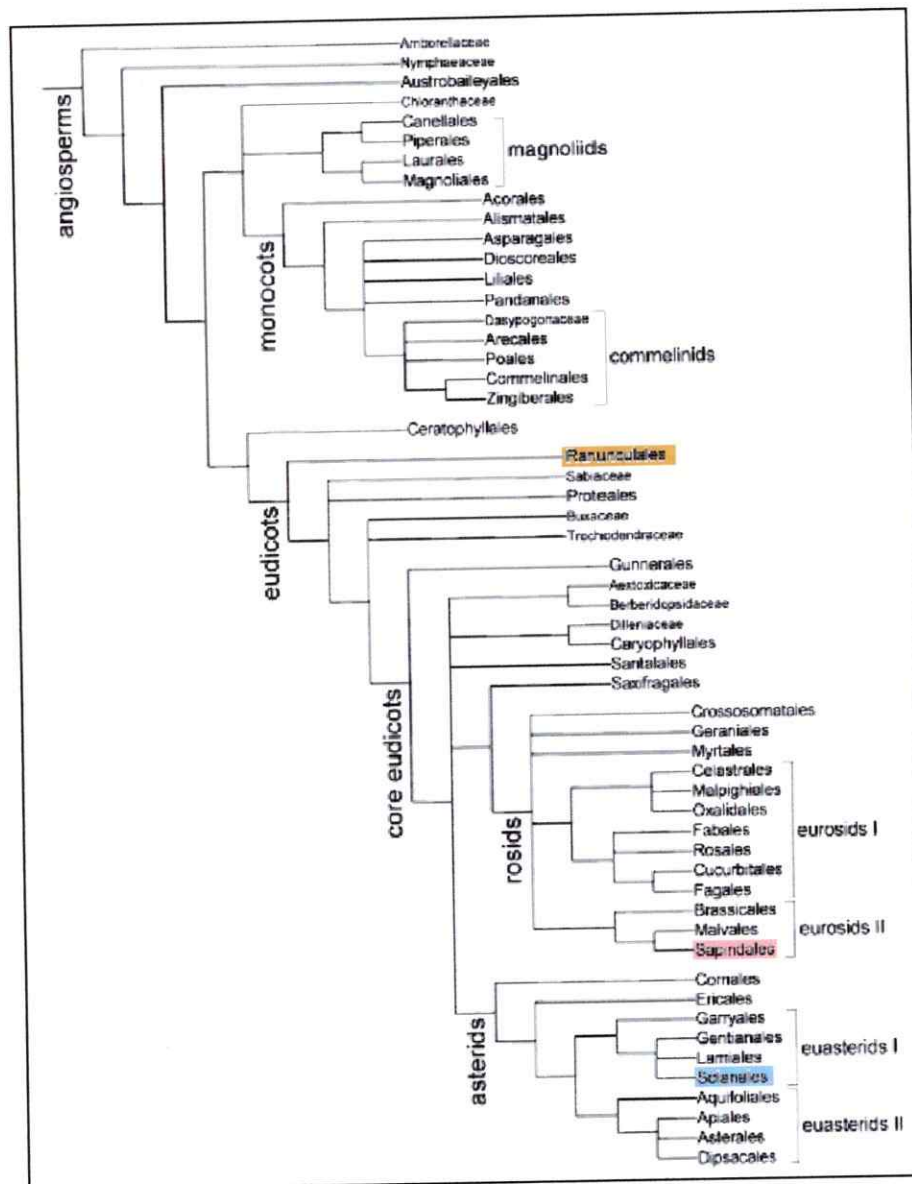


Figura 15. Esquema filogenético de angiospermas (APG II, 2003) donde se destacan en color los órdenes a lo que pertenecen *S. montanus*, *F. imbricata* y *B. montana*.

3. **II Unidad: Efecto de la composición de metabolitos secundarios sobre la herbivoría de *Mathania leucothea* en *Tristerix verticillatus***

3.1 Introducción

Los metabolitos secundarios son compuestos que, a diferencia de los metabolitos primarios, no se relacionan directamente con funciones vitales de las plantas. Sin embargo, presentan roles fisiológicos y ecológicos importantes para el desarrollo de una planta en un entorno natural determinado (Taiz y Zeiger, 1991). Estos compuestos han sido citados en diversas interacciones insecto-planta, como atrayentes de insectos polinizadores (Harborne, 1988) o como compuestos de defensa contra insectos herbívoros (Taiz y Zeiger, 1991; Feeny, 1992). Sin embargo, metabolitos secundarios que comúnmente son inhibidores de insectos herbívoros, llegan incluso a ser fagoestimulantes para algunos como resultado de un proceso de adaptación (Wittstock y col., 2004).

La asociación de los insectos con distintos hospederos puede ser explicada sobre la base de su conducta frente a los metabolitos secundarios de los hospederos. Los insectos generalistas poseen la capacidad de adaptarse a una gran variedad de compuestos tóxicos procedentes de una amplia gama de hospederos. Los insectos especialistas, en cambio, se adaptan a un menor número de compuestos tóxicos en un restringido rango de hospederos (Bernays y Chapman, 1994). De esta forma, su adaptación a altas dosis de compuestos particulares evita la competencia con otros herbívoros y además les otorga resistencia contra enemigos naturales (Schaffner y col., 1994; Sime, 2002; Nishida,

2002).

Las larvas de mariposas constituyen un importante grupo de herbívoros. Los estudios de la aceptación de sus hospederos han sido principalmente llevados a cabo en especies tales como *Papilio* spp. (Papilionidae) y *Pieris* spp. (Pieridae), asociadas respectivamente con hospederos de las familias Rutaceae y Brassicaceae (Feltwell, 1982; Nishida, 2005), probablemente debido a su mayor interés agronómico.

La selección de hospederos por mariposas es determinada por variados estímulos químicos que las afectan en sus distintas etapas de desarrollo (Schoonhoven y col., 1998). Los adultos son afectados a distancia por estímulos olfativos (compuestos volátiles) y visuales (flavonoides), y ya sobre el hospedero por estimulantes o inhibidores de oviposición, tales como flavonoides, glucosinolatos o alcaloides (Nishida, 2005). Las larvas de lepidópteros son defoliadoras, por lo que ingieren durante su alimentación los metabolitos secundarios contenidos en la hoja y también pueden ser afectadas por estos compuestos, aunque presentan un menor rango olfativo y gustativo que los adultos (Feeny, 1992).

Mathania leucothea (Pieridae) presenta a los hemiparásitos *T. verticillatus* (Cabezas, observación personal) y *T. corymbosus* (Courtney, 1985) como únicos hospederos informados, de cuyas hojas se alimentan sus larvas. Sería, en consecuencia, un herbívoro especialista de *Tristerix* spp. a diferencia de lo encontrado comúnmente para otras mariposas Pieridae, tales como *Pieris* spp. o *Tatochila* spp., las cuales se asocian a hospederos de la familia de las crucíferas

(Ehrlich y Raven, 1964; Courtney, 1982). Por lo tanto, es posible que esta especie como especialista haya desarrollado mecanismos de adaptación que involucren ya sea pérdida de la capacidad para asociar compuestos característicos de crucíferas a calidad del recurso y/o la adquisición de una capacidad para alimentarse sobre otras familias de plantas asociando compuestos comúnmente disuasivos de piéridos asociados a crucíferas y presentando una menor atracción hacia compuestos comúnmente encontrados en esta familia. Dada la forma de alimentación de las larvas de *M. leucothea*, si la composición química del hospedero afecta la del hemiparásito, a su vez ésta afectaría la intensidad de herbivoría de *M. leucothea* sobre *Tristerix* spp. En consecuencia, se determinarán los efectos de la composición de metabolitos secundarios de los hospederos *S. montanus*, *F. imbricata* y *B. montana* sobre la composición de metabolitos secundarios del hemiparásito *T. verticillatus* y el efecto de estas composiciones químicas sobre la intensidad de herbivoría del hemiparásito en cada hospedero, por larvas de *M. leucothea*.

3.2 Hipótesis específicas

1. La composición de metabolitos secundarios internos de *T. verticillatus* es afectada por el hospedero donde se encuentre.
2. La variación en la composición de metabolitos secundarios internos del hemiparásito entre hospederos afecta la intensidad de herbivoría de *M. leucothea*.
3. Dado que *M. leucothea* se especializa en *Tristerix* spp., no encontrándose otros herbívoros al menos en *T. verticillatus*, metabolitos secundarios disuasivos para otros herbívoros podrán ser fagoestimulantes para *M. leucothea*.

3.3 Objetivos específicos

1. Determinar la intensidad de herbivoría en hojas de *T. verticillatus*, proveniente de cada hospedero en estudio, en períodos posteriores a la herbivoría por larvas de *M. leucothea*.
2. Analizar la composición de metabolitos secundarios internos de las hojas de *T. verticillatus* creciendo sobre *S. montanus*, *F. imbricata*, y *B. montana*.
3. Comparar la composición de metabolitos secundarios internos del hemiparásito entre hospederos, y comparar la composición química entre cada hospedero y su respectivo hemiparásito.
4. Analizar las relaciones entre la composición de metabolitos secundarios de *T. verticillatus* y el porcentaje de herbivoría del hemiparásito en cada hospedero.
5. Identificar los metabolitos secundarios internos de las hojas de *T. verticillatus* relacionados con la intensidad de herbivoría de *M. leucothea* en el hemiparásito.

3.4 Parte Experimental

3.4.1 Determinación del porcentaje de herbivoría en hojas de *T.verticillatus*

Se observó la actividad de insectos herbívoros en hojas de *T. verticillatus*, encontrándose sólo larvas de *M. leucothea* comiendo de sus hojas. Esta especie es univoltina y su etapa de herbivoría coincide con la época de mayor desarrollo vegetativo de *T. verticillatus*. Durante 3 días y 3 noches de observación, en febrero del 2004, se recorrió el sector "Mirador del Aguila" observándose durante 10 minutos la actividad de estas larvas sobre *T. verticillatus* en cada uno de 10 individuos hospederos (T-Sm, T-Fi, T-Bm), la cual fue observada realizándose principalmente de noche. La herbivoría en hojas fue realizada principalmente por larvas del segundo al quinto estadio, y en ápices florales, ocasionalmente, por larvas del primer estadio originadas de la ovipostura en ese lugar. La herbivoría por *M. leucothea* es realizada principalmente desde los bordes de las hojas en pequeños pedazos, de modo que la intensidad de herbivoría es fácilmente cuantificable (Figura 16).

Se recolectaron 30 hojas al azar de un individuo de *T. verticillatus* de cada uno de 10 hospederos (T-Sm, T-Fi, T-Bm; 300 hojas por especie de hospedero) y se dispusieron sobre un tablero de digitalización, fijándolas bajo una lámina transparente, para posteriormente digitalizar el contorno de las hojas. Posteriormente, se usó el programa Sigma Scan para medir el área perdida por herbivoría, en relación al área total de cada hoja.

Se comparó la herbivoría de 10 individuos de hemiparásitos (30 hojas por individuo) entre distintos hospederos (T-Sm, T-Fi, T-Bm) mediante una ANOVA y una prueba post-hoc.

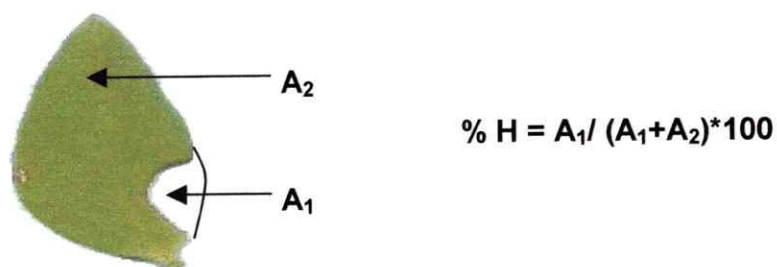


Figura 16. Cuantificación de la herbivoría por larvas de *M. leucothea* en hojas de *T. verticillatus*

3.4.2 Análisis de metabolitos secundarios internos en hojas de hospederos y hemiparásitos

Se obtuvo material vegetal de cada uno de 10 individuos de *T. verticillatus* proveniente de *S. montanus*, *B. montana* y *F. imbricata*, y también de cada uno de estos hospederos. Se colectaron hojas en los individuos de *T. verticillatus* de herbivoría previamente cuantificada, seleccionándose aquellas que no presentaran indicios de herbivoría o daño mecánico para evitar la presencia de defensas químicas inducidas. Las muestras consistieron en aproximadamente 5 g de hojas secas y molidas que se extrajeron con 15 ml de diclorometano p.a. durante 18 h (10 individuos de cada sistema, T-Sm, T-Fi y T-Bm). Cada residuo sólido fue posteriormente extraído con 30 ml de metanol p.a. durante 3 días. Los residuos de extractos en diclorometano fueron redissueltos en 10 ml de cloroformo p.a. y los extractos en metanol fueron concentrados a 10 ml para ser analizados por

cromatografía en capa fina (TLC) con el sistema éter de petróleo / diclorometano 4:1 para los extractos en cloroformo y el sistema cloroformo / metanol 3:1 para los extractos en metanol. Se utilizaron placas recubiertas de gel de sílica 60 F254 de 20x20 cm (Merck), las que fueron posteriormente reveladas con ácido sulfúrico al 25% para la detección general de compuestos apolares en cloroformo y polares en metanol. Las placas fueron reveladas además con *p*-anisaldehído (Stahl, 1969) para la detección de compuestos apolares en cloroformo y con NP-PEG (difetilborato de β -etilamino - polietilenglicol) para la detección de flavonoides en metanol (Wagner y col., 1984). Las placas de TLC de *T. verticillatus* fueron escaneadas y las áreas de las manchas reveladas con los reactivos antes mencionados fueron cuantificadas mediante el uso del programa Sigma-Scan.

3.4.3 Análisis discriminante de la composición de metabolitos secundarios internos de *T. verticillatus*

Para determinar si los hemiparásitos de distintos hospederos pertenecen a grupos estadísticamente distintos en función de sus metabolitos secundarios internos se realizó un análisis discriminante de las áreas de las manchas obtenidas en TLC por unidad de masa vegetal seca de compuestos apolares, revelados con *p*-anisaldehído y otro para compuestos polares, revelados con NP-PEG. Los análisis discriminantes se realizaron con el programa STATISTICA 6.0.

Dado que el número de manchas analizadas no sobrepasó la capacidad de cada análisis estadístico (n=10) no fue necesaria la extracción de componentes principales.

3.4.4 Análisis de regresión múltiple entre el porcentaje de herbivoría de *T. verticillatus* y la composición de metabolitos secundarios internos

Se realizó un análisis de regresión múltiple del porcentaje de herbivoría del hemiparásito en cada hospedero, como variable dependiente, en función de las áreas de las manchas reveladas en TLC (corregidas por la masa vegetal de cada muestra), como variables independientes. Se realizó un análisis de regresión múltiple para los tres sistemas (T-Sm, T-Fi, T-Bm) simultáneamente, considerando compuestos apolares extraídos con cloroformo (X_a) y compuestos polares extraídos con metanol (X_p), según la siguiente expresión:

$$y = \left(\beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_a X_a + \sum_{i=1}^3 \beta_p X_p \right) + \varepsilon \quad \text{ec. 10}$$

donde y es el porcentaje de herbivoría en el hemiparásito, x es el área de la mancha de cada tipo de compuesto a (apolar) y p (polar), β es la pendiente de cada variable independiente para cada tipo de compuesto, β_0 es el intercepto y ε es el error asociado a cada regresión lineal múltiple. Se aplicó además el procedimiento "forward stepwise" para seleccionar el mínimo de variables independientes que maximizan el ajuste de cada regresión.

3.4.5 Análisis químico de metabolitos secundarios internos significativos en correlación con herbivoría de *T. verticillatus*

Las manchas de los extractos en cloroformo y metanol de *T. verticillatus* cuyas áreas en TLC se correlacionaron significativamente con el porcentaje de herbivoría del hemiparásito se aislaron por cromatografía preparativa a partir de 50 g de planta con el mismo procedimiento de extracción que el utilizado para TLC, para su posterior análisis por GC-MS (fracción en cloroformo) y HPLC-UV-MS (fracción en metanol).

Las condiciones cromatográficas para el análisis por GC-MS de la fracción en cloroformo fueron las mismas utilizadas para el análisis de colecta de compuestos volátiles (sección 2.3.4). La identificación de los compuestos fue realizada por comparación de los espectros de masas con aquellos de la base de datos NIST 98 (National Institute of Standards and Technology), complementada con la comparación entre los índices de Kováts calculados y los obtenidos en la literatura para el mismo tipo de columna (SPB-5). Las condiciones cromatográficas para el análisis de la fracción en metanol por HPLC-UV y HPLC-MS se indican a continuación:

Condiciones cromatográficas del análisis por HPLC-UV

Equipo: Waters 600 acoplado a un detector DAD Waters 2996

Columna: Waters Symmetry C-18 150x3,9 mm.

T° columna: 30°C

Flujo: 1,0 ml/ min

Gradiente: lineal, desde 20% a 90% A (acetonitrilo) en B (1% ácido acético) durante 20 minutos

Vol. inyección: 20 µL

Condiciones cromatográficas del análisis por HPLC-MS

Equipo: HPLC 1100 SERIES acoplado a un detector de masas cuadrupolar

Columna: Phenomenex Luna C-18 250x4,6 mm.

T° columna: 30°C

Flujo: 0,6 ml/ min

Gradiente: lineal, desde 50% a 90% A (metanol) en B (0,1% ácido fórmico) durante 30 minutos

Vol. inyección: 10 µL

3.4.6 Análisis de alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios de ocurrencia frecuente en angiospermas, descritos como importantes mediadores de interacciones planta-insecto (Wink y Twardowski, 1992). Debido a ser previamente informada la presencia de alcaloides en los hospederos *F. imbricata* y *B. montana* se analizará la composición de alcaloides en hospederos y su posible influencia en la composición de alcaloides de *T. verticillatus* para determinar su eventual efecto sobre la intensidad de herbivoría por *M. leucothea*. Debido a que los alcaloides no son detectados según los métodos experimentales previamente descritos (sección 3.4.2), se procederá a detallar el procedimiento experimental para su análisis.

Se obtuvo material vegetal de cada hospedero y respectivo hemiparásito. Las muestras consistieron en aproximadamente 1000 g de hojas secas y molidas para hospederos y aproximadamente 500 g para hemiparásitos, las cuales se maceraron sucesivamente con 4 porciones de 2,5 L de metanol p.a. durante dos semanas. Cada extracto fue llevado a sequedad y luego suspendido en 200 ml de HCl al 10%. La suspensión obtenida fue filtrada, llevada a pH 10 y extraída mediante un embudo de decantación con cloroformo p.a. Se purificó el extracto clorofórmico de alcaloides sometiéndolo a una nueva extracción ácido-base y el segundo extracto clorofórmico obtenido a pH 10 (fracción purificada) fue secado y filtrado con sulfato de sodio. Para la detección de alcaloides mediante cromatografía en capa fina (TLC) se usó el reactivo de Dragendorff (Stahl, 1969), que los revela como manchas de color naranja.

Se examinó la translocación de alcaloides desde hospedero hasta hemiparásito mediante coincidencia en los valores de Rf de compuestos Dragendorff-positivos entre el hospedero y su respectivo hemiparásito.

Se procedió a la identificación por espectroscopia de NMR de los compuestos Dragendorff-positivos que presentaran coincidencia en los valores de Rf entre hospedero y hemiparásito. La separación de los compuestos se llevó a cabo utilizando sistemas de solventes de polaridad creciente (desde cloroformo puro hasta cloroformo/ metanol 7:3) en columnas de gel de sílica 60 de 230-400 mallas para la separación de los compuestos (diámetro de partícula: 0,040-0,063 mm) y de 35-70 mallas (diámetro de partícula: 0,2-0,5 mm) para la siembra de la muestra en la columna.

3.5 Resultados

3.5.1 Herbivoría de *T. verticillatus*

El porcentaje de herbivoría determinado en hojas de *T. verticillatus* varió entre hospederos ($F_{2,27} = 18$, $P < 0,001$), siendo T-Bm el hemiparásito más afectado por herbivoría, seguido por T-Fi y T-Sm (Figura 17).

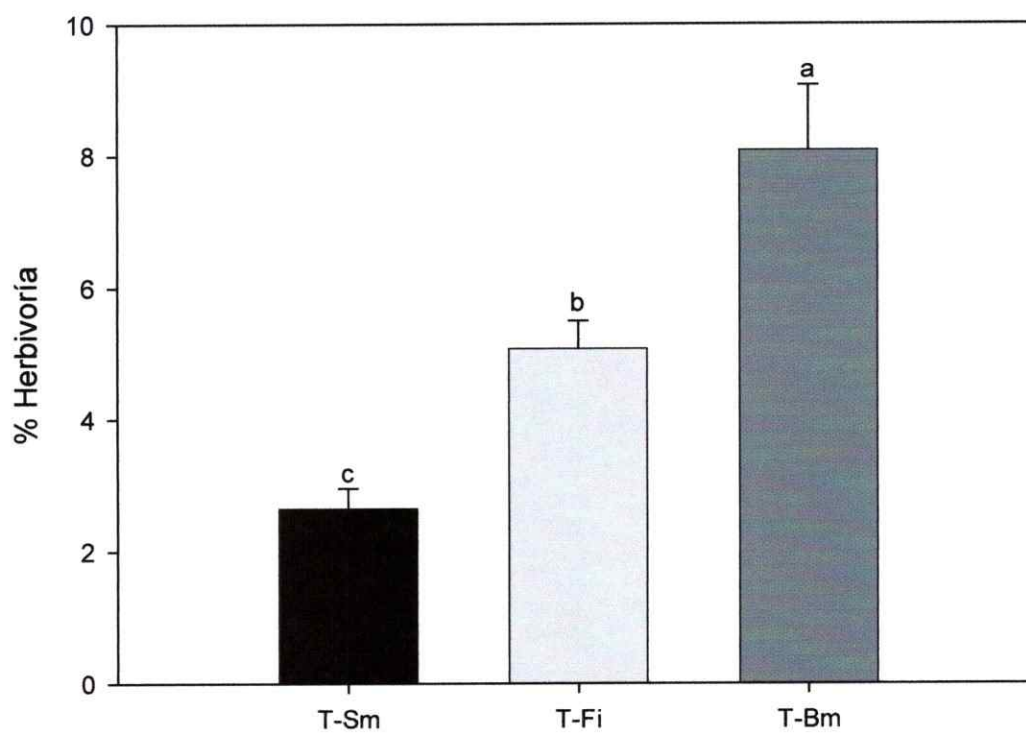


Figura 17. Intensidad de herbivoría de *T. verticillatus* sobre distintos hospederos (promedios y errores estándar). Las letras distintas sobre cada columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey con $p < 0,05$).

3.5.2 Análisis por TLC de metabolitos secundarios internos en hojas de hospederos y hemiparásitos

Los análisis de TLC de extractos tanto en cloroformo como en metanol de hojas de *T. verticillatus* no revelaron diferencias cualitativas en la composición de metabolitos secundarios entre los hemiparásitos creciendo sobre distintos hospederos, pero sí entre los hospederos, particularmente para compuestos más polares (Figura 18).

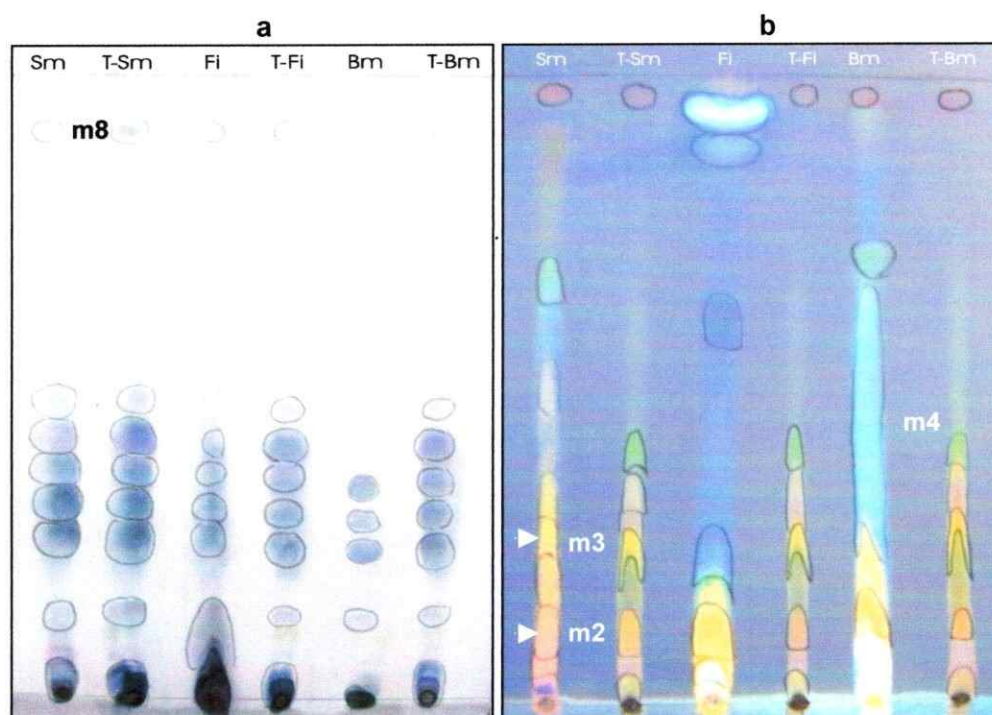


Figura 18. Placas de TLC de extractos de hojas en hospederos y hemiparásitos (10 mg/ml).
 a. extracto en cloroformo revelado con *p*-anisaldehído (éter de petróleo-diclorometano 4:1).
 b. extracto en metanol revelado con NP-PEG (cloroformo-metanol 3:1, vista bajo UV de 365 nm).

El hospedero *S. montanus* (Sm) presentó manchas similares en coloración y valor de Rf a las manchas m2 y m3 del hemiparásito, destacadas en la Figura 18b. Estas manchas no se presentan en los demás hospederos, denotando una posible relación biosintética entre Sm y T-Sm.

El hospedero *F. imbricata* (Fi) presentó en los extractos metanólicos una variada mezcla de compuestos revelados en azul con luz UV de 365 nm (Figura 18b). La mancha azul superior corresponde a la cumarina escopoletina, identificada según coincidencia en color (al irradiarla con luz UV de 365 nm) y en el valor de Rf con un estándar comercial. Es muy posible que las otras manchas azules también correspondan a cumarinas, ya que variados compuestos de esta familia han sido encontrados en *F. imbricata* (Muñoz, 1992). La mancha naranja inferior en la placa (Figura 18b) corresponde al flavonol rutina, identificada según coincidencia en color (luz UV de 365 nm) y en valor de Rf con un estándar comercial.

El hospedero *B. montana* (Bm) presenta en los extractos metanólicos una mezcla de compuestos revelados en celeste que lo distingue de los otros hospederos, destacados en la Figura 18 como m4. Se identificó además la presencia de rutina, por comparación de Rf con la mancha naranja observada en Fi (Figura 18b).

3.5.3 Análisis discriminante de la composición de metabolitos secundarios internos entre *T. verticillatus* de distintos hospederos

El análisis discriminante de la composición de metabolitos secundarios internos muestra una clara diferenciación entre hemiparásitos, para compuestos apolares revelados con *p*-anisaldehído ($U= 0,042$; $F= 14,2$; $P <0,0001$) y para compuestos polares revelados con NP-PEG ($U= 0,16$; $F= 7,0$; $P <0,0001$). La representación gráfica de cada análisis discriminante se observa en las Figuras 19 y 20.

Las distancias de Mahalanobis de cada análisis discriminante son significativas entre hemiparásitos de distintos hospederos, para compuestos apolares extraídos con cloroformo (Tabla 12) y compuestos polares extraídos con metanol (Tabla 13).

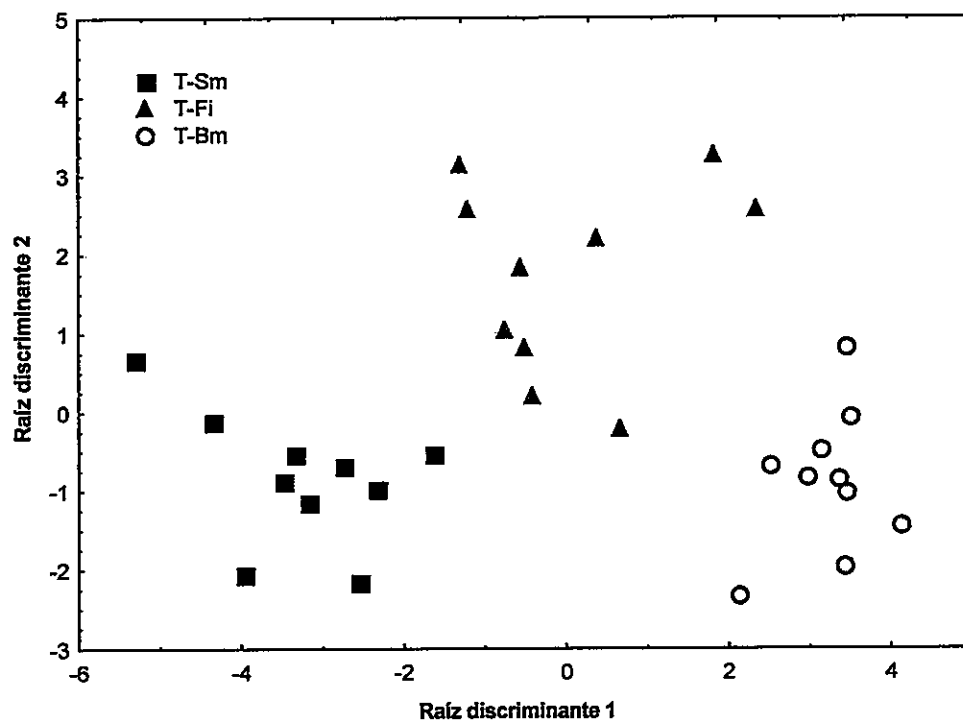


Figura 19. Análisis discriminante de las áreas en placas de TLC de metabolitos secundarios internos de extractos en cloroformo de *T. verticillatus* proveniente de distintos hospederos, reveladas con *p*-anisaldehído.

Tabla 12. Discriminación entre hemiparásitos de distintos hospederos (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de *P* (bajo la diagonal), en función de las áreas de metabolitos secundarios internos reveladas en TLC con *p*-anisaldehído (Figura 19).

<i>p</i> \ <i>D</i>	T-Sm	T-Fi	T-Bm
T-Sm		20	47
T-Fi	<0,001		19
T-Bm	<0,001	<0,001	

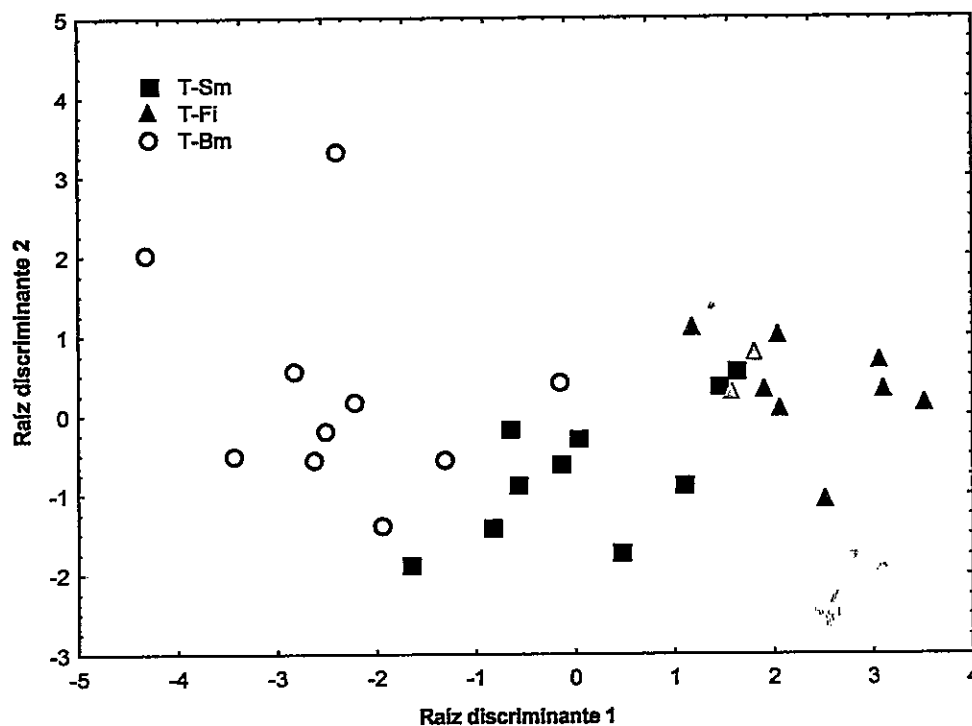


Figura 20. Análisis discriminante de las áreas en placas de TLC de metabolitos secundarios internos de extractos en metanol de *T. verticillatus* proveniente de distintos hospederos, reveladas con NP-PEG.

Tabla 13. Discriminación entre hemiparásitos de distintos hospederos (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de *P* (bajo la diagonal), en función de las áreas de metabolitos secundarios internos reveladas en TLC con NP-PEG (Figura 20).

p \ D	T-Sm	T-Fi	T-Bm
T-Sm		6,7	7,8
T-Fi	<0,001		24
T-Bm	<0,001	<0,001	

3.5.4 Análisis de regresión múltiple entre porcentaje de herbivoría de *T. verticillatus* y composición de metabolitos secundarios internos

Con el fin de evaluar eventuales relaciones entre las diferencias encontradas en herbivoría de *T. verticillatus* sobre distintos hospederos por el herbívoro especialista *M. leucothea* y composición de metabolitos internos de las hojas de *T. verticillatus* en esos hospederos, se consideró el siguiente modelo para el análisis de regresión múltiple con procedimiento "forward stepwise":

$$\% \text{ Herbivoría} = \beta_0 + \beta_a * [\text{compuestos apolares}] + \beta_p * [\text{compuestos polares}] + \varepsilon$$

donde se relacionó el porcentaje de herbivoría del hemiparásito en los tres hospederos en estudio con las áreas de las manchas en TLC de compuestos apolares (extraídos con cloroformo y revelados con *p*-anisaldehído) y compuestos polares (extraídos con metanol y revelados con NP-PEG) de hojas de *T. verticillatus*.

Según el análisis estadístico realizado (Tabla 14), se encontró una relación significativa entre el porcentaje de herbivoría y el área de las manchas m8 revelada con *p*-anisaldehído (Figura 18a) y m2 revelada con NP-PEG (Figura 18b), resultando la siguiente ecuación predictora:

$$\begin{aligned} \% \text{ Herbivoría} = & 12,63 - \mathbf{0,61} [\text{área m8/ cloroformo}] - \mathbf{0,42} [\text{área m2/ metanol}] \\ & + 0,20 [\text{área m4/ metanol}] - 0,18 [\text{área m7/ cloroformo}] \end{aligned} \quad \text{ec. 10}$$

El signo negativo de los coeficientes significativos (marcados en **negrita**) de la ecuación 10 indica una acción inhibitoria de estos compuestos sobre la herbivoría de *M. leucothea*. El resumen del procedimiento y los resultados del

análisis estadístico se muestran en tabla 14.

Tabla 14. Resumen del procedimiento "forward stepwise" de la regresión lineal múltiple del efecto de metabolitos secundarios sobre el porcentaje de herbivoría de *T. verticillatus*. Valores marcados en negrita son significativos ($P < 0,05$).

Procedimiento							
Paso	Variable ingresada	β	F	P	R	R ²	Cambio de R ²
1	área m8 (ext. CHCl ₃)	-0,61	20	<0,001	0,65	0,42	0,42
2	área m2 (ext. MeOH)	-0,42	8,3	0,008	0,75	0,56	0,14
3	área m4 (ext. MeOH)	0,20	1,8	0,189	0,77	0,59	0,03
4	área m7 (ext. CHCl ₃)	-0,18	1,5	0,226	0,78	0,61	0,02

En las Figuras 21 y 22 se observan las regresiones lineales significativas entre el área de las manchas m8 y m2 y el porcentaje de herbivoría de *T. verticillatus*. Según este análisis T-Sm presentaría la mayor proporción de estos compuestos, principales inhibidores de la herbivoría en el hemiparásito.

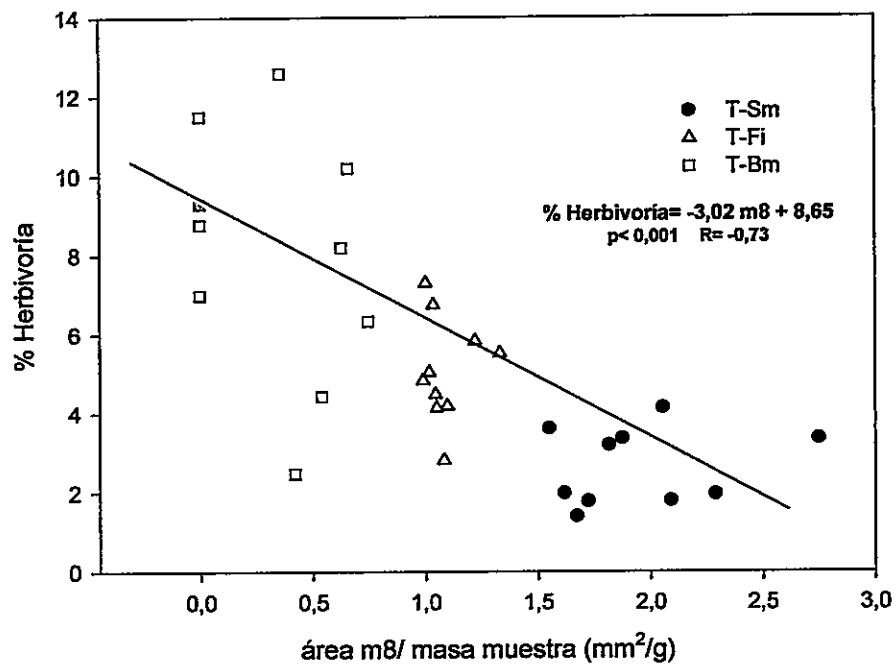


Figura 21. Relación entre porcentaje de herbivoría y área m8 en cloroformo de *T. verticillatus* en distintos hospederos

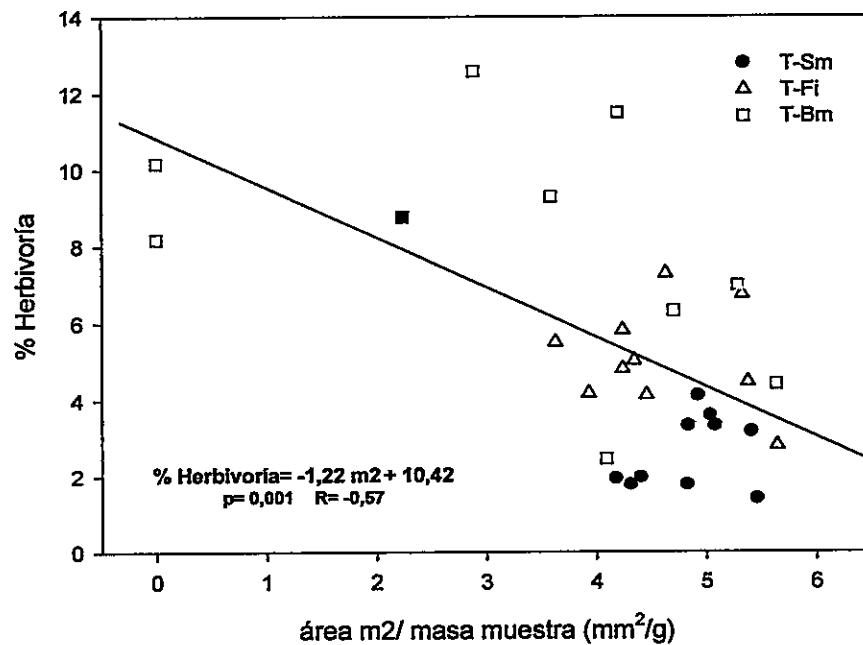


Figura 22. Relación entre porcentaje de herbivoría y el área m2 en metanol de *T. verticillatus* en distintos hospederos

3.5.4 Relación entre hospedero y hemiparásito de la abundancia de metabolitos secundarios internos significativos con herbivoría de *T. verticillatus*

La relación entre hospedero y hemiparásito de las áreas de las manchas m8 (cloroformo) y m2 (metanol), significativas con el porcentaje de herbivoría de *T. verticillatus*, fue también determinada a través de regresiones lineales. No se encontró una regresión lineal significativa entre hospedero y hemiparásito para la mancha m8 en cloroformo (Figura 23), pero sí para la mancha m2 en metanol (Figura 24).

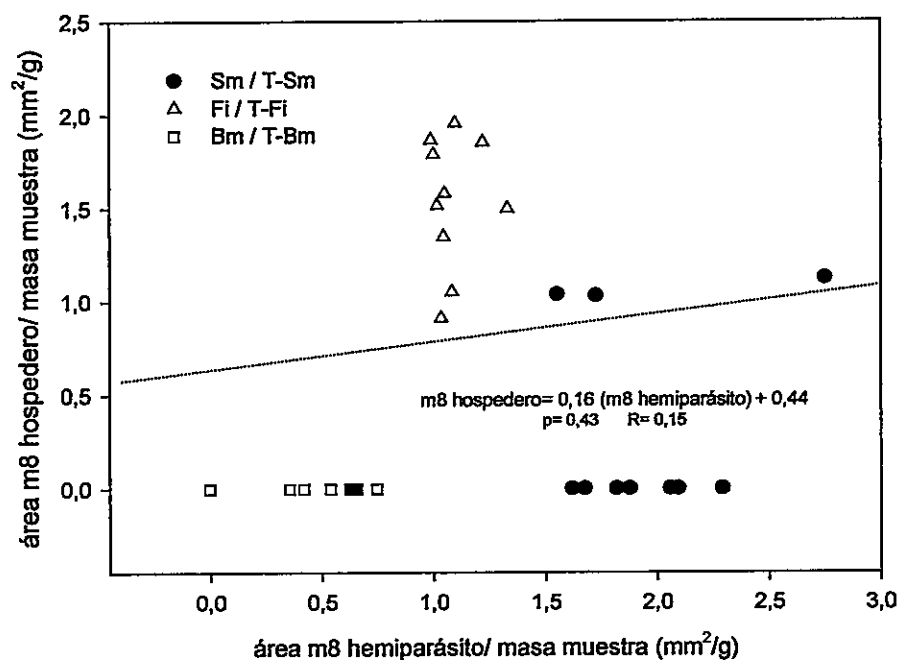


Figura 23. Relación lineal no significativa entre hospedero y hemiparásito del área m8 en cloroformo

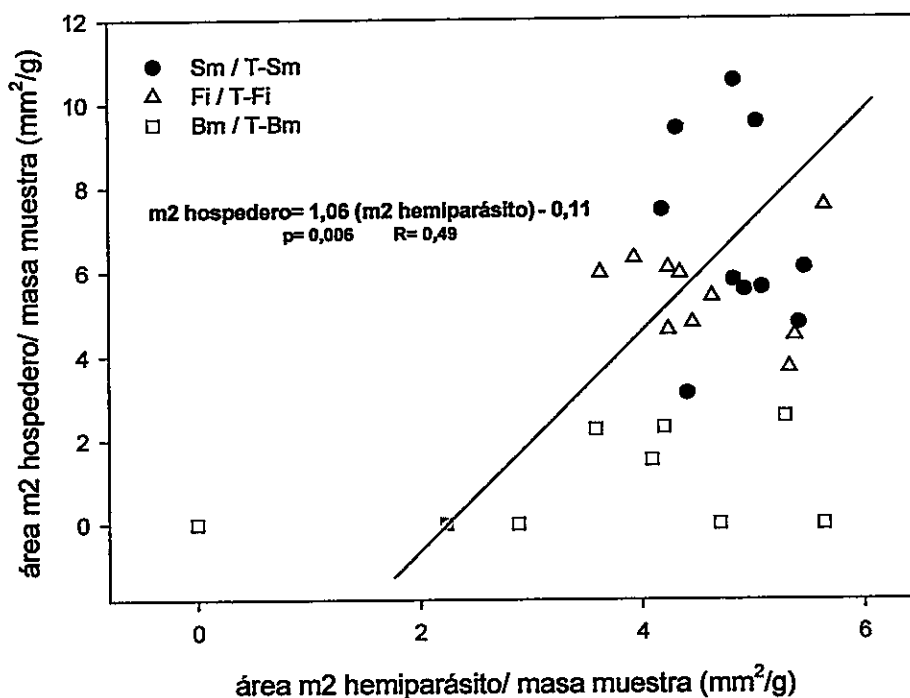


Figura 24. Relación entre hospedero y hemiparásito del área m2 en metanol

3.5.5 Análisis de fracciones de T-Sm relacionadas negativamente con el porcentaje de herbivoría de *M. leucothea* en *T. verticillatus*

Las fracciones m8 (en cloroformo) y m2 (en metanol), cuya relación estadística con la herbivoría de *M. leucothea* fue significativa, fueron analizadas en T-Sm por ser el hemiparásito que presentó una mayor área en TLC y una menor variación en el porcentaje de herbivoría entre muestras (Figuras 21 y 22). Estas fracciones fueron aisladas por cromatografía preparativa a partir de 50 g de hojas

molidas y secas, en las mismas condiciones experimentales que para TLC, para ser analizadas por GC-MS y HPLC-UV-MS, respectivamente. Se determinaron sus valores de R_f como la razón entre las distancias recorridas de cada muestra y la distancia recorrida por el solvente desde el origen de la placa. Las placas de TLC de las fracciones totales y las fracciones aisladas m8 ($R_f = 0,89$; éter de petróleo/diclorometano 4:1) y m2 ($R_f = 0,11$, cloroformo/metanol 3:1) de T-Sm, se muestran en la Figura 25.

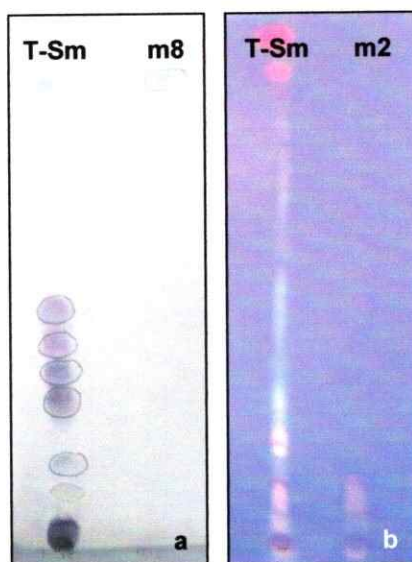


Figura 25. Placas de TLC de extractos totales y fracciones m8 y m2 de T-Sm (10 mg/ ml)
a. extractos en cloroformo revelados con *p*-anisaldehído (éter de petróleo-diclorometano 4:1)
b. extractos en metanol revelados con NP-PEG (cloroformo-metanol 3:1, vista bajo UV de 365 nm)

La fracción m8 del extracto clorofórmico de T-Sm, según el análisis por GC-MS (Tabla 15), presenta principalmente acetofenona (46%) y benzaldehído (38%).

Tabla 15. Análisis por GC-MS de la fracción m8 separada del extracto clorofórmico de T-Sm

Compuesto	CAS	RI	A (%)
Acetato de butilo	56-23-5	836	0,3
3-Heptanona	106-35-4	896	0,2
α -Pino	80-56-8	944	1,0
Benzaldehído	100-52-7	970	38,4
Limoneno	138-86-3	1037	0,8
1,8-Cineol	470-82-6	1040	0,9
Acetofenona	98-86-2	1075	46,3
Benzoato de metilo	93-58-3	1101	0,1
Nonanal	124-19-6	1104	0,1
Acido benzoico	65-85-0	1168	1,5
β -Ciclocitral	432-25-7	1225	0,2
Isosafrol	120-58-1	1297	0,6
α -Ioneno	475-03-6	1368	1,8

La fracción m2 del extracto metanólico de T-Sm fue analizada por HPLC-UV, detectándose la presencia de siete picos (Figura 27), entre los cuales la rutina (Figura 26, compuesto 7 en Tabla 16) fue identificada como compuesto mayoritario (54%), mediante la co-inyección de un estándar comercial y la confirmación de su espectro de UV con uno de referencia (Mabry y col., 1962). Los compuestos 1 a 6 presentan menores tiempos de retención que la rutina (Figura 27) en una columna HPLC C18 indicando una mayor polaridad correspondiente posiblemente a la presencia de un mayor número de grupos hidroxilo glicosilados.

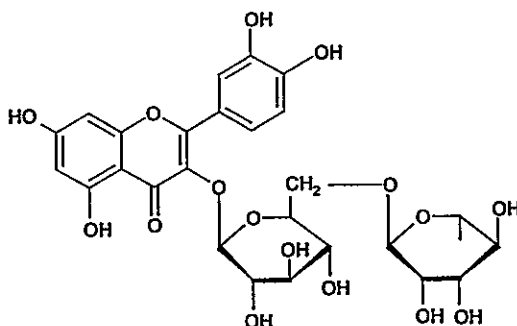


Figura 26. Estructura de la rutina

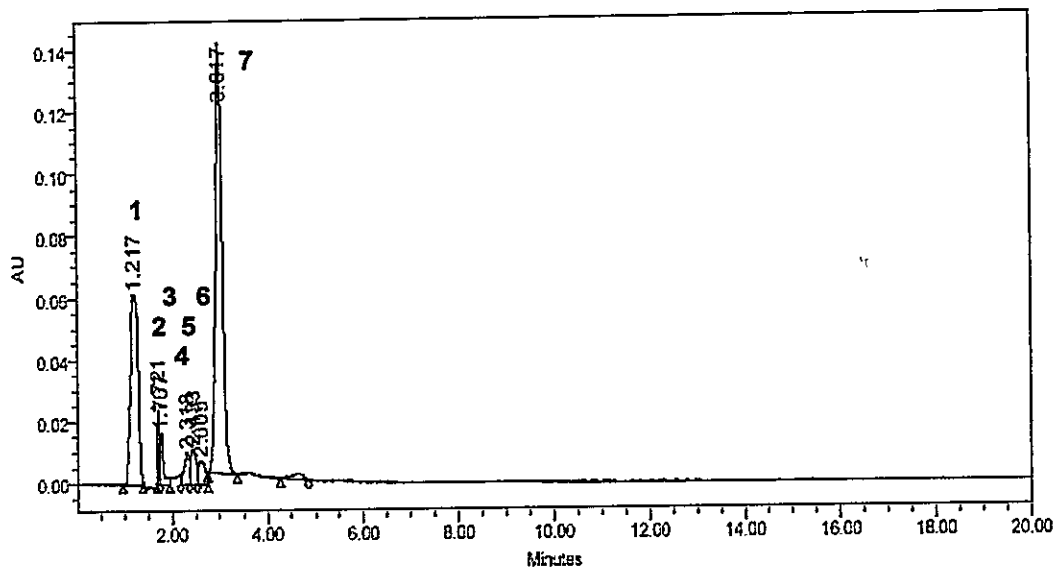


Figura 27. Cromatograma HPLC para detección por UV de los compuestos de la fracción m2 de T-Sm

Tabla 16. Análisis HPLC-UV de la fracción m2 de T-Sm

compuestos	t_R (min)	%Area	Espectro UV	
			Banda I	Banda II
1	1,217	29,0	353	266
2	1,721	2,7	-	-
3	1,767	3,1	-	-
4	2,318	3,0	-	274
5	2,433	3,8	343	266
6	2,609	3,1	354	258
7	3,017	54,0	355	257

Los espectros de UV de los compuestos 1, 5, 6 y 7 presentan dos bandas de absorción características de flavonoles (Tabla 16): una banda entre 240 y 280 nm (banda II), que corresponde a la absorción en el anillo A y una banda entre 328 y 357 nm (banda I), que corresponde a la absorción en el anillo B de flavonoles con

sustitución en el grupo hidroxilo en posición 3 (Mabry y col., 1962, ver Figura 28). Los compuestos 2 y 3 no presentan bandas de absorción entre 240 y 400 nm lo cual indica que no son flavonoides. El espectro de UV del compuesto 4 sólo presenta una intensa banda inespecífica en 270 nm.

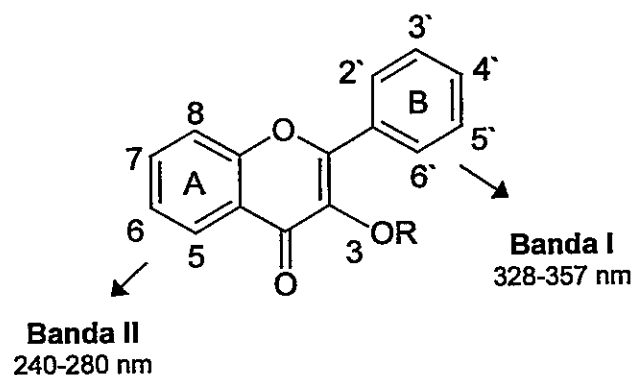


Figura 28. Estructura de flavonoles y su relación con bandas de absorción en el UV

Para complementar la información obtenida del análisis por HPLC-UV de m2, se realizó un análisis por HPLC-MS, empleando el método de ionización por "electrospray" (ESI), indicado en este caso por tratarse de compuestos más polares que la rutina, por lo tanto con un complejo patrón de glicosilación que requiere de una ionización suave. La muestra en HPLC-MS con el modo de ionización ESI es ingresada en forma de gotas de aerosol y sometida a un campo eléctrico que dependiendo de la polaridad del voltaje aplicado, son cargadas positiva (ESI+) o negativamente (ESI-). Cuando la repulsión electrostática entre los iones alcanza su punto crítico ("Coulombic explosion"), los iones suspendidos en estado de vapor son finalmente transportados hacia el detector de masas según su razón m/z (Webster y col., 1998). En modo ESI cada señal corresponde al peso molecular del fragmento más (ESI+) o menos (ESI-) un protón (ión pseudomolecular), aunque

también se puede registrar la diferencia de más de un protón con respecto al peso molecular (Webster y col., 1998). Ambos métodos de ionización ESI (positivo y negativo) fueron desarrollados. Sin embargo, el método de ionización finalmente utilizado para el análisis fue el ESI+ pues presentó una mayor estabilidad en las señales.

El cromatograma HPLC-MS de la fracción m2 obtenido en las condiciones descritas presenta interferencias en la línea base (Figura 29) que distorsionan las áreas relativas bajo cada pico (Tabla 17) en comparación con las obtenidas por HPLC-UV (Tabla 16), dificultando una cuantificación confiable. Sin embargo, existe un grado de correspondencia entre la información espectroscópica UV de algunos flavonoles (Tabla 16) y espectros de masas obtenidos por HPLC-MS (Tabla 17), como se discute más adelante.

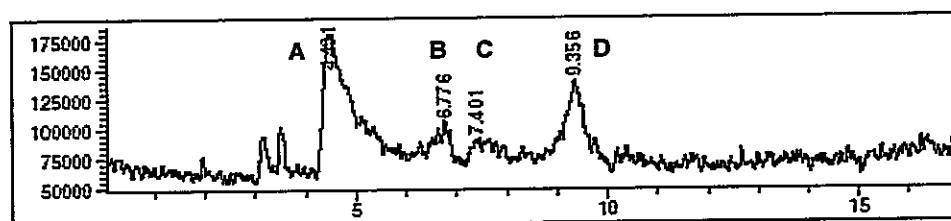


Figura 29. Cromatograma HPLC-MS de la fracción m2 en metanol de T-Sm

Tabla 17. Análisis HPLC-MS de la fracción m2 de T-Sm

compuestos		t _R (min)	% Area	Espectro de masas (modo ESI+)	
				[M+nH] ⁿ⁺	m/z (principales fragmentos)
1	A	4,502	52,0	920	433, 303, 287
-	B	6,768	13,8	922	622, 522, 337
-	C	7,441	11,7	922	622, 598, 307
7	D	9,350	22,6	611	303, 465

Los espectros de masas obtenidos en el modo de ionización ESI+ para los compuestos correspondientes a A, B y C (Tabla 17) presentan iones moleculares cercanos a m/z 920, que corresponden a agliconas con cuatro unidades de monosacárido, lo que explica su mayor polaridad frente a la rutina. Sin embargo, sus estructuras no pueden precisarse debido a la falta de información sobre la posición de los sustituyentes en los anillos A y B, la que puede obtenerse mediante espectroscopía de NMR bidimensional, como lo realizado en general para flavonoles glicosidados (Pastene y col., 2001; Ribeiro y col., 2002; Manguro y col., 2003). Pese a esto, a continuación se postularán posibles estructuras sobre la base de la información espectroscópica recopilada.

El pico A del cromatograma HPLC-MS en Figura 29 (Tabla 17) presenta probablemente una mezcla de glicósidos de quercetina (m/z 303) y kaempferol (m/z 287). Un ion molecular (M+2H)²⁺ en m/z 920 revela posiblemente un glicósido de kaempferol unido a tres unidades de hexosa y una metilpentosa en las posiciones 3-O y 7-O (Figura 30). La glicosilación en hidroxilos de otras posiciones es menos probable, ya que en 5-O se tendría un efecto hipsocrómico en las bandas I y II y en 4 se tendría un notable efecto hipsocrómico en la banda I (Mabry y col., 1962). La ruptura sucesiva de los enlaces glicosídicos daría origen a kaempferol unido a una

metilpentosa (m/z 433). El ion molecular $(M+2H)^{2+}$ en m/z 920 también puede corresponder a un glicósido de quercetina unida a dos unidades de hexosa y dos de metilpentosa. Sin embargo, el espectro de UV correspondiente (compuesto 1 en Tabla 16) presenta una banda II a 266 nm más característica de flavonoles de kaempferol (Mabry y col., 1962), aunque no es descartable la presencia adicional de un glicósido de quercetina en una pequeña proporción no detectable según la información de bandas en el UV.

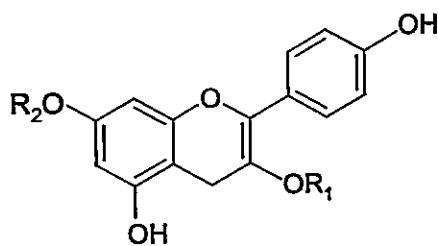


Figura 30. Tipo de estructura propuesta para compuesto 1 de fracción m2

Los compuestos B y C presentan señales en m/z 922 que posiblemente correspondan a iones moleculares de agliconas unidas a cuatro unidades de monosacárido. Sin embargo, sus fragmentos principales no permiten precisar alguna configuración estructural determinada.

El compuesto D (Figura 29, Tabla 17) muestra un ion molecular en m/z 611 correspondiente a rutina (compuesto 7, Tabla 16), identificada previamente por comparación con información de UV de referencia y co-inyección de un estándar comercial. La ruptura en 1 (Figura 31) libera una unidad de quercetina 3-O-glucósido (m/z 465) y la ruptura 2 en el enlace con el grupo ramnoglucosilo libera la aglicona quercetina (m/z 303).

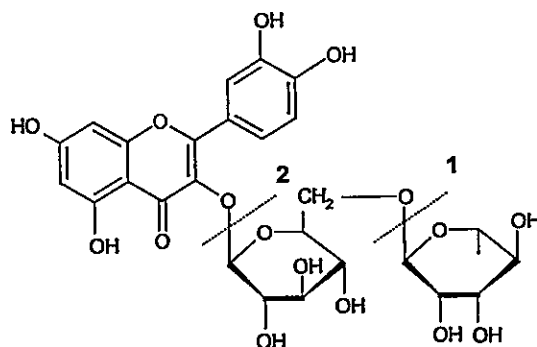


Figura 31. Fragmentación de rutina por HPLC-MS modo ESI+

3.5.6 Análisis de alcaloides

El análisis en cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos clorofórmicos obtenidos en ambiente básico para hospederos y hemiparásitos, reveló diferencias en composición de compuestos Dragendorff-positivos entre hospederos y entre hemiparásitos y una estrecha relación entre el hospedero Bm y T-Bm, como se observa en las Figuras 32, 33 y 34.

Schinus montanus no presenta alcaloides según el reactivo de Dragendorff. Sólo se observa en el UV cercano lo que podría ser una cumarina revelada en azul. Fi presenta un número bajo de alcaloides y un número mayor de cumarinas. Bm es el hospedero que presenta el mayor número de alcaloides. Se determinó una muy baja concentración de compuestos Dragendorff-positivos en los hemiparásitos T-Sm y T-Fi (5,6 y 20 mg de extracto total/ Kg de planta seca, respectivamente) por lo cual no fue posible aislarlos bajo las condiciones experimentales establecidas. T-

Sm presenta una mancha Dragendorff-positiva cuyo análisis por NMR sólo reveló la presencia mayoritaria de ftalato de isooctilo, posible de detectar en condiciones de alta concentración en ausencia de analito. T-Fi posiblemente presente alcaloides relacionados con los de su hospedero. En contraste, en T-Bm se determinó una gran concentración de compuestos Dragendorff-positivos (361 mg de extracto total/Kg de planta seca), algunos de los cuales presentan valores similares de Rf con los de su hospedero Bm, en los distintos sistemas de desarrollo para TLC (Figuras 32, 33 y 34).

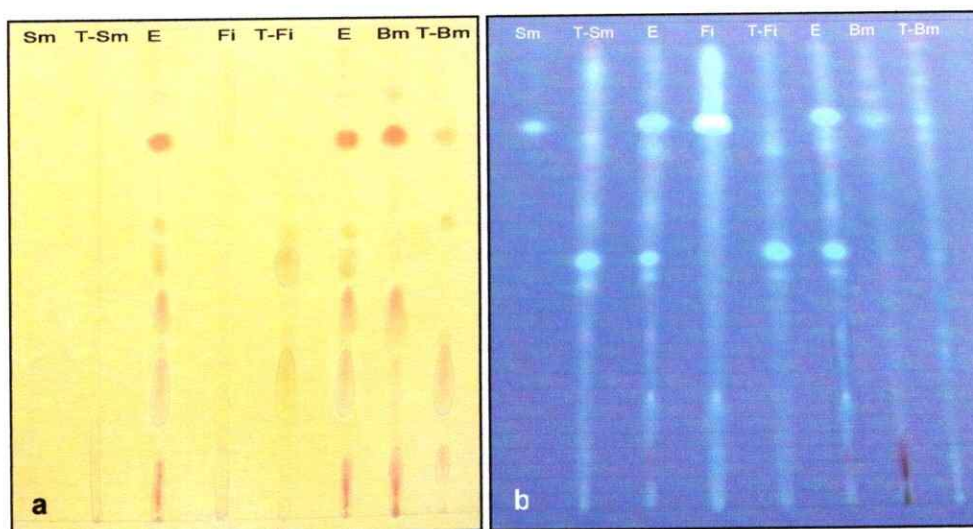


Figura 32. Placa cromatográfica de compuestos Dragendorff-positivos concentrados a 40 mg/ml (sistema de elución cloroformo/metanol 9:1). a. revelada con reactivo de Dragendorff. b. vista con luz UV (365 nm) antes de revelar. E= mezcla de extractos de todas las plantas a la misma concentración.

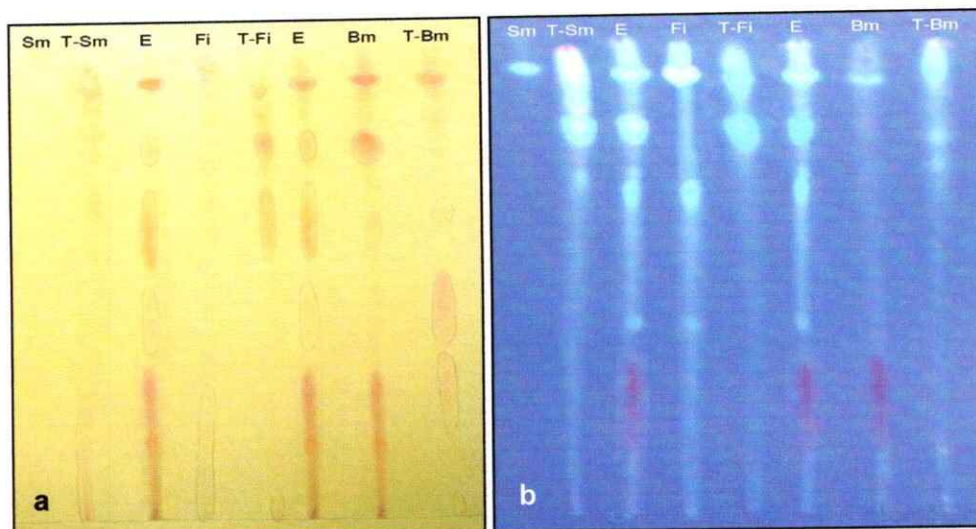


Figura 33. Placa cromatográfica de compuestos Dragendorff-positivos concentrados a 40 mg/ml (**sistema de elución cloroformo/metanol 4:1**). a. revelada con reactivo de Dragendorff. b. vista con luz UV (365 nm) antes de revelar. E= mezcla de extractos de todas las plantas a la misma concentración.

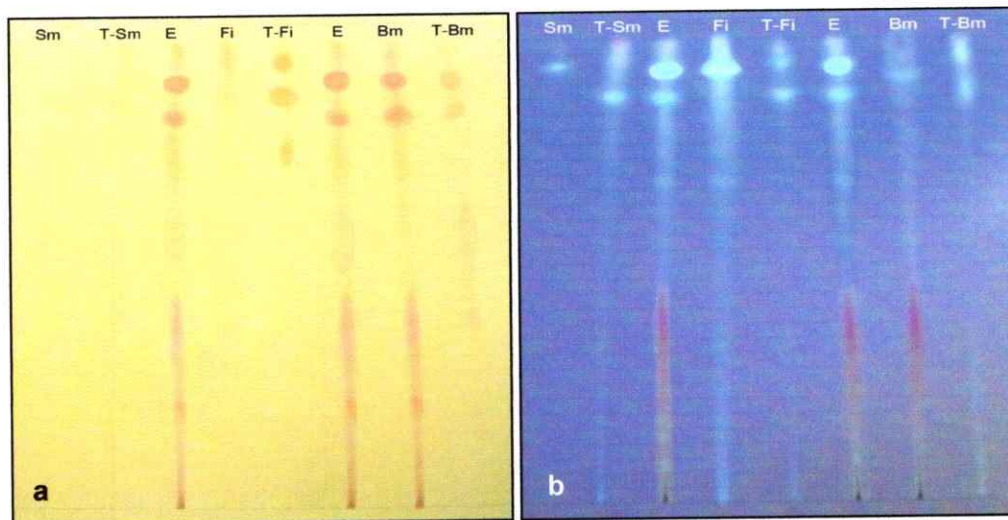


Figura 34. Placa cromatográfica de compuestos Dragendorff-positivos concentrados a 40 mg/ml (**sistema de elución cloroformo/metanol 7:3**). a. revelada con reactivo de Dragendorff. b. vista con luz UV (365 nm) antes de revelar. E= mezcla de extractos de todas las plantas a la misma concentración.

Fueron identificados cuatro alcaloides desde *B. montana* (información espectroscópica en las Figuras 35-38): la pronuciferina, como alcaloide mayoritario (412 mg/Kg peso seco, 30% del extracto total), la 9-metoxi-nuciferina (180 mg/ Kg de peso seco, 12% del extracto total) y los alcaloides minoritarios N-metil-coclaurina y 1,2-dimetoxi-9-hidroxiaporfina que representaron un 3,2 y un 1,7 % del extracto total, respectivamente.

Se determinó también la presencia de pronuciferina y glaucina (9,10-dimetoxi-nuciferina) en *T. verticillatus* sobre *B. montana*, con rendimientos de extracción de 14 mg/Kg (16% del extracto total) y 8 mg/Kg (10% del extracto total) respectivamente. Los análisis de ^1H NMR de estos alcaloides muestran señales, asignadas estructuralmente en las Figuras 39 y 40, muy similares a las observadas en los alcaloides de su hospedero (Tabla 18).

Tabla 18. Señales ^1H NMR de alcaloides encontrados en Bm y T-Bm

	Pronuciferina		O-metillirinina	Glaucina
	Bm	T-Bm	Bm	T-Bm
1	3,59 s (-OCH ₃)	3,58 s (-OCH ₃)	3,47 s (-OCH ₃)	3,49 s (-OCH ₃)
2	3,80 s (-OCH ₃)	3,80 s (-OCH ₃)	3,64 s (-OCH ₃)	3,67 s (-OCH ₃)
3	6,63 s	6,64 s	6,57 s	6,57 s
6	2,37 s (-NCH ₃)	2,39 s (-NCH ₃)	2,41 s (-NCH ₃)	2,44 s (-NCH ₃)
6a	3,45 dd (10; 4,8)	3,42 dd (10; 4,8)	2,98 dd (10; 4,1)	2,95 dd (10; 4,2)
7	2,30 m	2,32 m	2,91 m	2,89 m
8	6,88 dd (10; 2,8)	6,88 dd (10; 2,7)	6,64 d (2,8)	6,62 s
9	6,29 dd (10; 1,8)	6,29 dd (10; 1,6)	3,82 s (-OCH ₃)	3,81 s (-OCH ₃)
10	-	-	6,69 dd (8,4; 2,8)	3,87 s (-OCH ₃)
11	6,40 dd (9,9; 1,8)	6,40 dd (10; 1,6)	8,20 d (8,4)	8,12 s
12	7,03 dd (9,9; 2,8)	7,03 dd (10; 2,7)	-	-

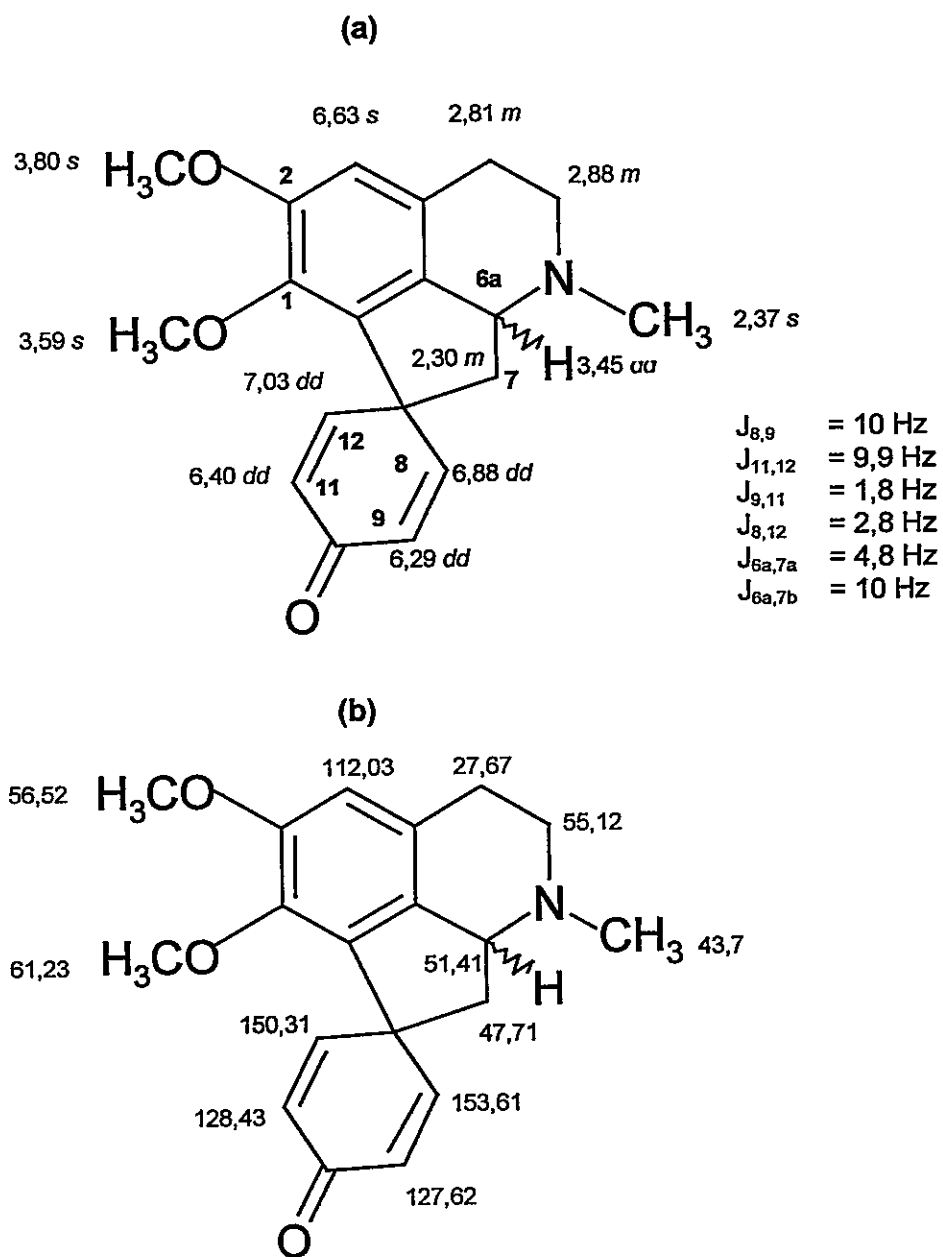


Figura 35. Información de ^1H (a) y ^{13}C NMR (b) de pronuciferina presente en *B. montana*

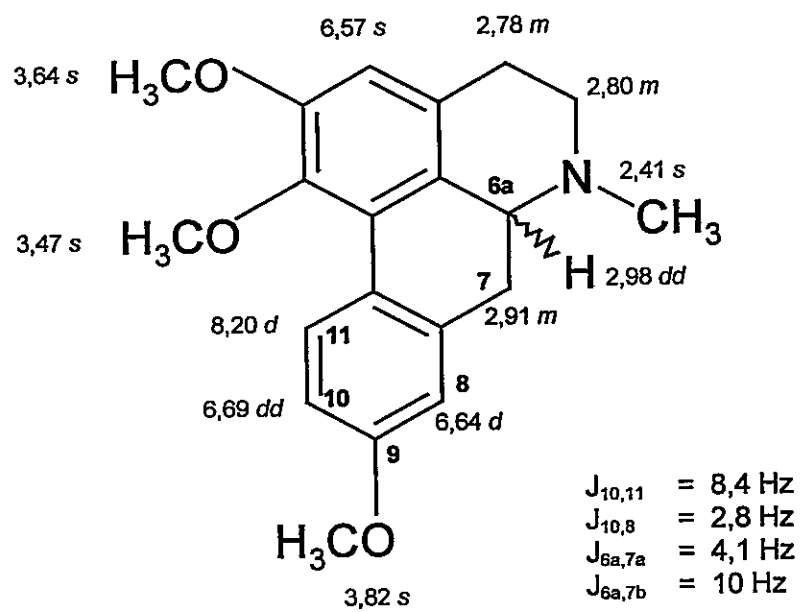


Figura 36. Información de ^1H NMR de O-metilirinina en *B. montana*

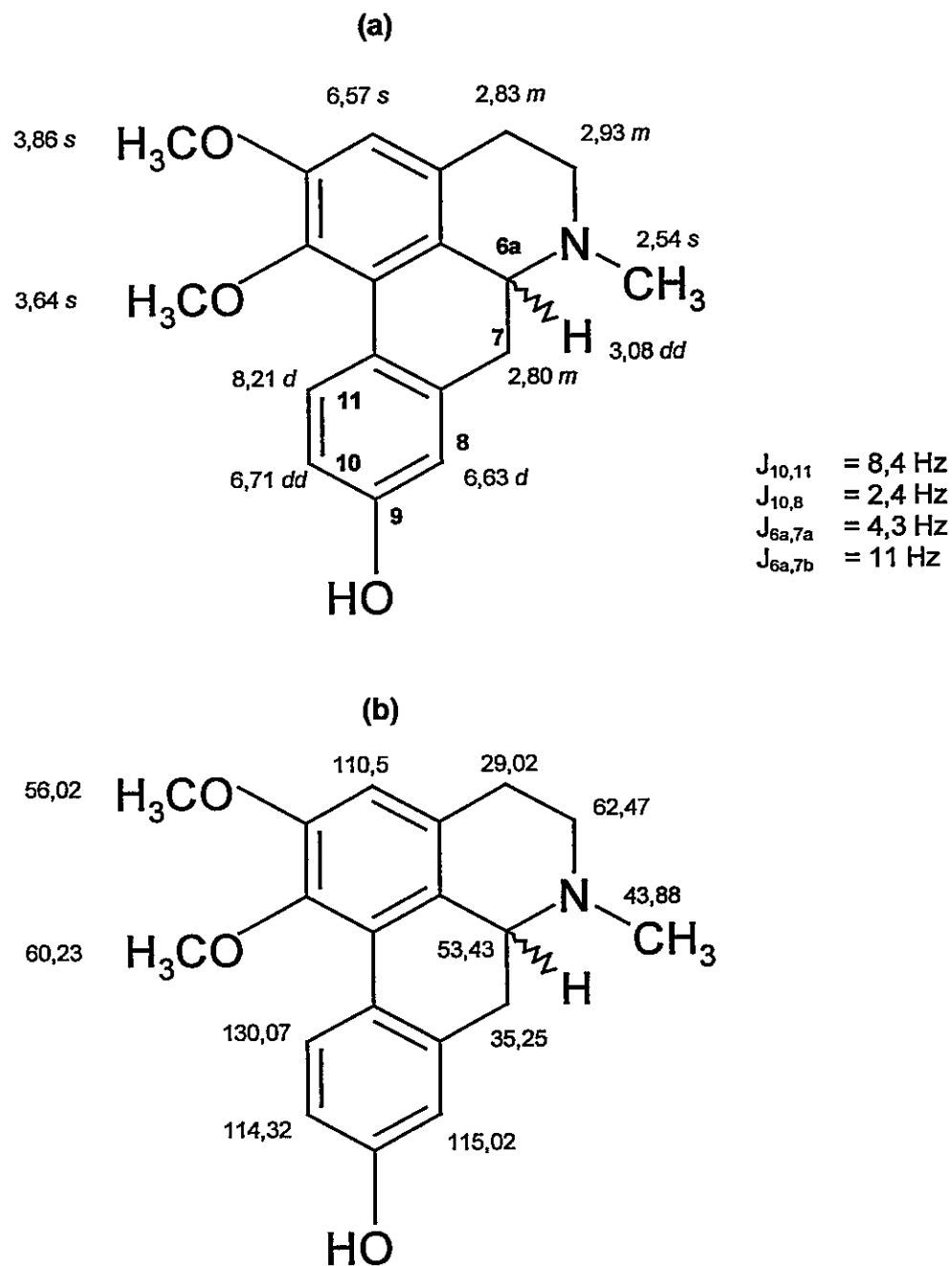


Figura 37. Información de ^1H (a) y ^{13}C NMR (b) de 1,2-dimetoxi-9-hidroxiaporfina en *B. montana*

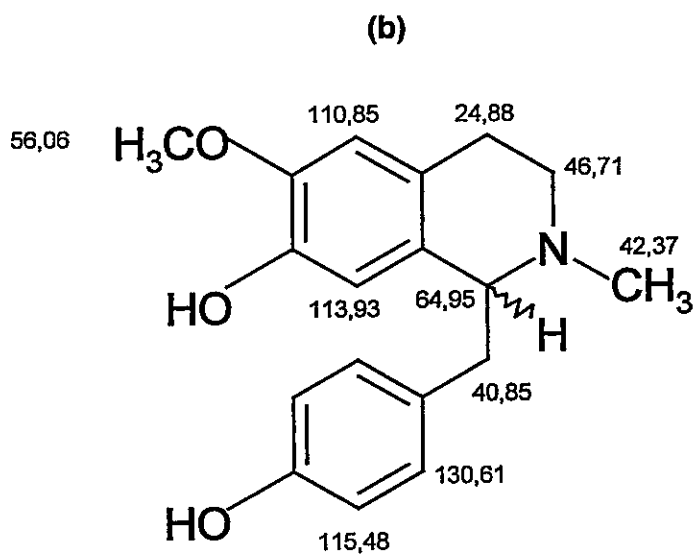
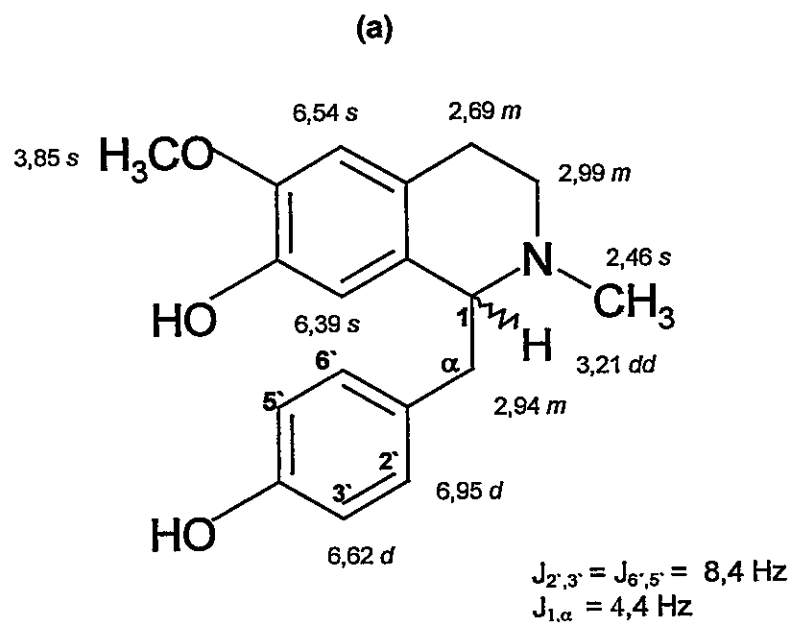


Figura 38. Información de ^1H (a) y ^{13}C NMR (b) de N-metil-coclaurina en *B. montana*

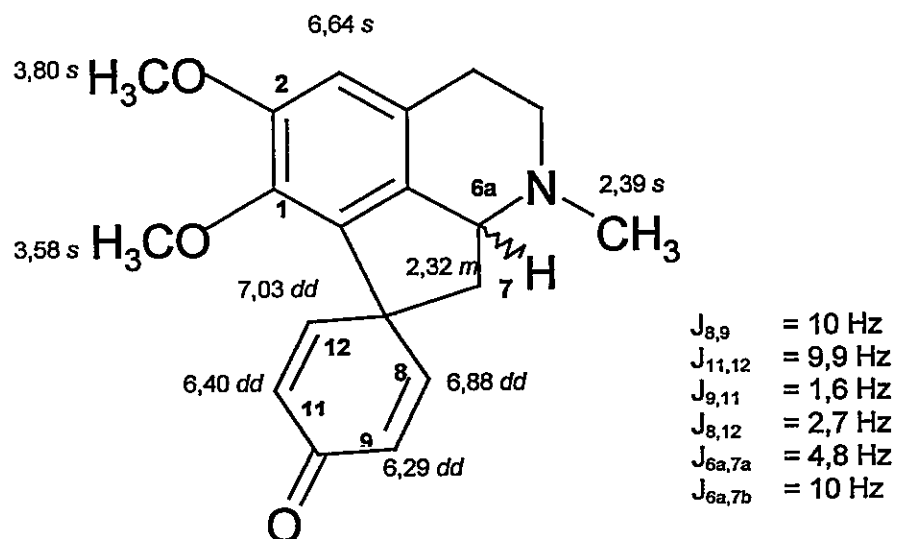


Figura 39. Información de ^1H NMR de pronociferina en *T. verticillatus* sobre *B. montana*

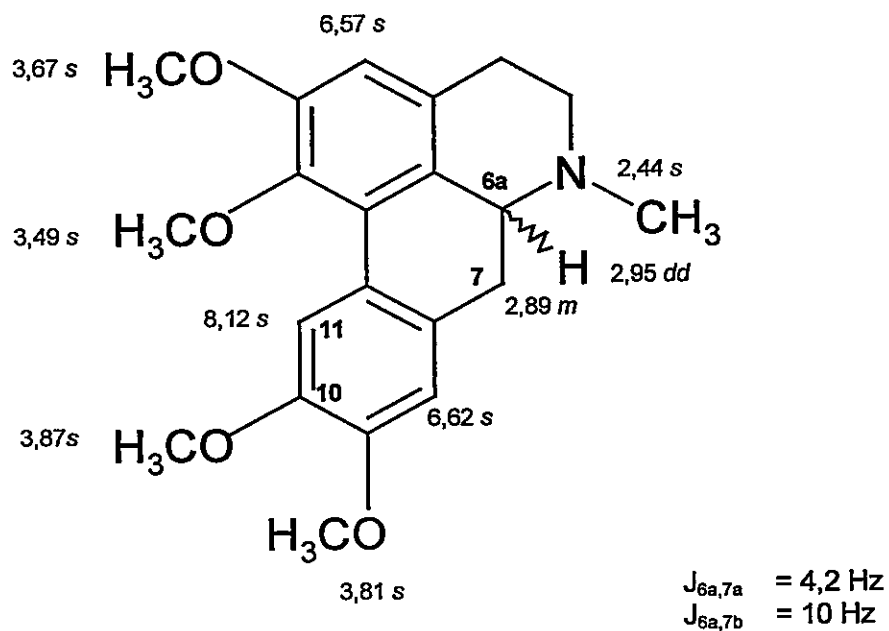


Figura 40. Información ^1H NMR de glaucina en *T. verticillatus* sobre *B. montana*

Según los resultados obtenidos, el hemiparásito *T. verticillatus* transloca pronuciferina desde el hospedero Bm y posiblemente biotransforma la O-metillirinina translocada en glaucina. Otra posibilidad es la bioacumulación de la glaucina en el hemiparásito permitiendo su detección en éste y no en su hospedero. La relación cromatográfica de ambos alcaloides en el hospedero y en el hemiparásito se presentan en la Figura 41. No se observa una clara evidencia cromatográfica de translocación de otros alcaloides, ya que las mezclas de compuestos Dragendorff-positivos de T-Bm, destacadas en la Figura 41, que parecen similares en Rf con alcaloides de su hospedero, se eluyen con distintos valores de Rf en un sistema cromatográfico de mayor polaridad. Sin embargo, no es descartable que se trate de una mezcla de alcaloides, no separable según las condiciones experimentales disponibles, que pueda presentar alguna relación biosintética con alcaloides de su hospedero.

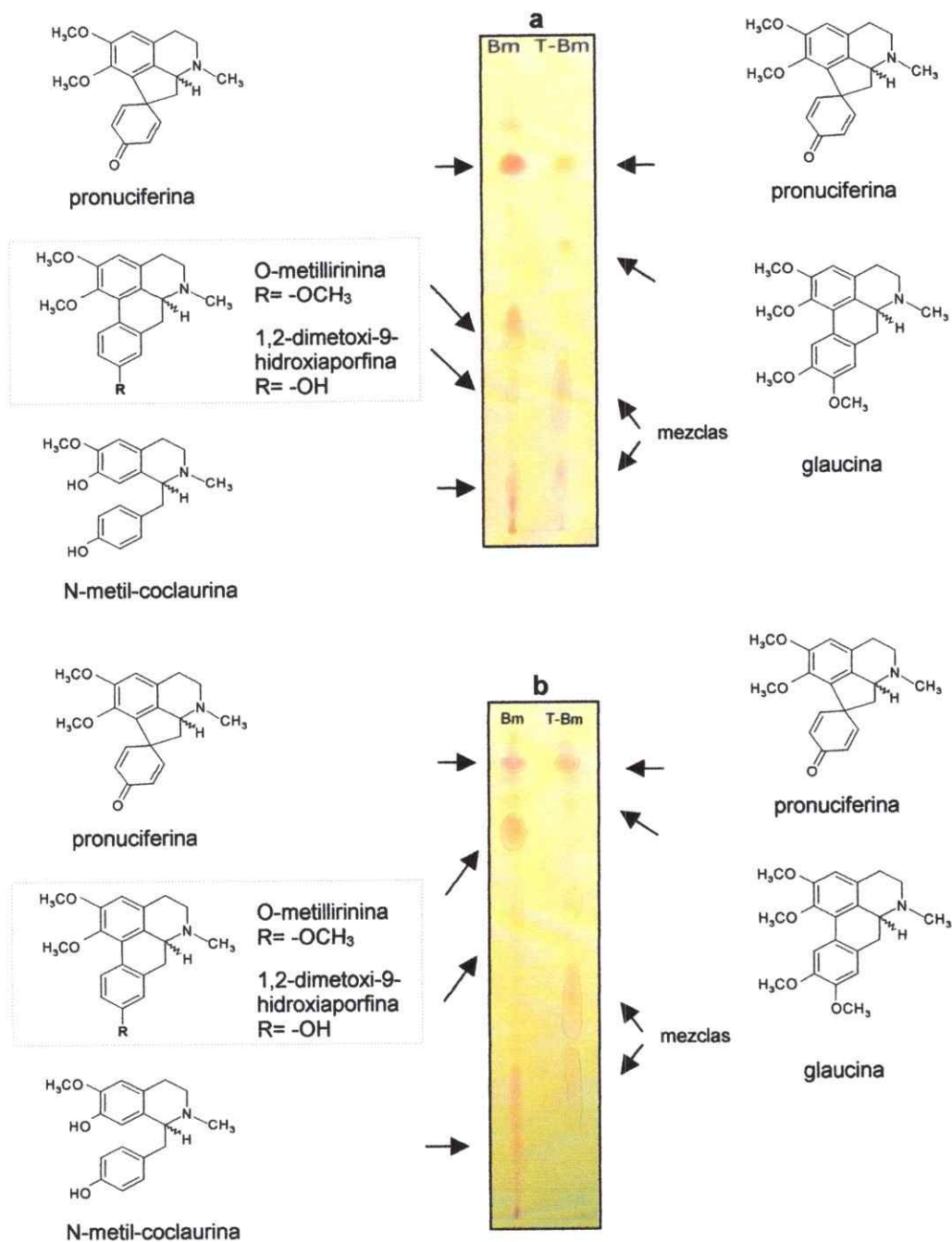


Figura 41. Estructuras de alcaloides de *Berberis montana* y su relación cromatográfica con alcaloides identificados en *T. verticillatus* sobre *B. montana*.
a: sistema cromatográfico cloroformo-metanol 9:1
b: sistema cromatográfico cloroformo-metanol 4:1

3.6 Discusión

3.6.1 Efecto del hospedero en la composición de metabolitos secundarios del hemiparásito

El hemiparásito *T. verticillatus* presenta en general un patrón cualitativo de compuestos apolares y de flavonoides independiente del hospedero donde se encuentra (Figura 18). Este patrón es distinto al de sus hospederos. Esto puede deberse a la existencia en *T. verticillatus* de una capacidad biosintética de metabolitos secundarios independiente del hospedero sobre el cual se encuentre. Más aún, los patrones cuantitativos de compuestos apolares y flavonoides difieren entre hemiparásitos (Figuras 19 y 20). Esto sugiere leves diferencias en capacidad biosintética entre los hemiparásitos asociados a distintos hospederos. Se ha informado de la presencia de flavonoides en *Tristerix* spp. (*T. verticillatus*, *T. corymbosus* y *T. aphyllus*), los cuales han sido utilizados como marcadores quimiotaxonómicos (Soto y col., 1996). Los flavonoides identificados en *T. verticillatus*, colectado del hospedero *S. polygamus*, fueron flavonoles y dihidroflavonoles glicosilados y no se detectó la presencia de rutina o de otros flavonoides glicosilados de mayor polaridad (Soto y col., 1996), detectados en gran proporción en *T. verticillatus* sobre *S. montanus*. Esta diferencia en composición de flavonoides de *T. verticillatus* puede deberse a diferencias en las metodologías de extracción, aunque también a la asociación del hemiparásito con distintos hospederos, por lo cual, estudios quimiotaxonómicos de flavonoides de hemiparásitos podrían reforzarse al considerar estos factores.

El hemiparásito *T. verticillatus* presenta diferencias en composición de alcaloides relacionada con el uso de distintos hospederos. En *S. montanus* (Sm), hospedero en el cual no se detectó la presencia de alcaloides no se confirmó la presencia de alcaloides en el hemiparásito. En *F. imbricata* (Fi) y en *T. verticillatus* sobre este hospedero (T-Fi) se detectó la presencia de compuestos Dragendorff-positivos. Sin embargo, la detección e identificación de alcaloides no pudo ser confirmada debido al bajo rendimiento obtenido. Se ha reportado en *F. imbricata* la presencia de fabianina y 2,5-dimetil-tetrahydroquinolina (Muñoz, 1992), por lo que T-Fi podría presentar alcaloides relacionados biosintéticamente con los de Fi, aunque la similitud en los valores de Rf de los compuestos Dragendorff-positivos entre hospedero y hemiparásito no es clara (Figuras 32-34). En *B. montana* (Bm), se identificaron los alcaloides pronuciferina, 1,2-dimetoxi-9-hidroxiaporfina, O-metillirina y N-metil-coclaurina, observándose una similitud en valores de Rf de estos alcaloides con compuestos Dragendorff-positivos del hemiparásito T-Bm (Figuras 32-34). Finalmente se identificó pronuciferina y glaucina en T-Bm, con lo cual se determinó la translocación de pronuciferina y la posible biotransformación de O-metillirina en glaucina (9,10-dimetoxi-nuciferina) en el hemiparásito *T. verticillatus*. Los resultados obtenidos confirman los de otros trabajos, donde se han identificado alcaloides en hemiparásitos pero sólo cuando crecen sobre hospederos que presentan alcaloides (Stermitz y Harris, 1986; Stermitz y Pomeroy, 1992). Este trabajo constituye la primera evidencia de translocación de alcaloides en una Loranthaceae, siendo en general un fenómeno poco informado en hemiparásitos aéreos (Martín-Cordero y col., 1993), en comparación con la gran cantidad de información disponible de hemiparásitos de raíces (Stermitz y Harris, 1986; Stermitz y Pomeroy, 1992; Schneider y Stermitz, 1990; Arslanian y col.,

1990; Marko, 1996; Adler y Wink, 2001), probablemente relacionado con la más alta disponibilidad de alcaloides directamente desde las raíces del hospedero. Sin embargo, sólo tres géneros de la familia Loranthaceae son hemiparásitos de raíces y los restantes 72 géneros son hemiparásitos aéreos (Wilson y Calvin, 2006). La información sobre la translocación de metabolitos secundarios parece particularmente escasa para la más grande familia de hemiparásitos (Norton y De Lange, 1999).

La translocación de alcaloides isoquinolínicos desde *B. montana* a *T. verticillatus* es propiciada por la gran concentración de alcaloides en el hospedero, los que suelen acumularse en las raíces (Karimov y Shakirov, 1993; Karimov y col., 1994), desde donde pueden translocarse a través del xilema hasta los haustorios del hemiparásito. Otros metabolitos secundarios, tales como cumarinas, aunque abundantes en *F. imbricata*, no aparecen translocados en el hemiparásito, probablemente por la imposibilidad de ser transportados directamente ya que se localizan preferentemente en glándulas superficiales del hospedero (Bernays y Chapman, 1994).

3.6.2 Efecto de la composición química del hospedero sobre la inhibición de la herbivoría de *M. leucothea* en el hemiparásito

El hemiparásito *T. verticillatus* presenta distinta intensidad de herbivoría relacionada con diferencias en composición de metabolitos secundarios determinada entre hospederos. Dos clases de compuestos de polaridades distintas están relacionados directamente en forma significativa con la inhibición de la

herbivoría por larvas de *M. leucothea* en *T. verticillatus*:

- (i) apolares (fracción m8 en cloroformo, Figura 25a): fracción constituida principalmente por benzaldehído (38%) y acetofenona (46%), los cuales han sido descritos como vapores repelentes liberados desde la superficie de las hojas hacia moscas *Dacus oleae* (Girolami, 1981). El benzaldehído es un aldehído aromático que presenta un fuerte olor a almendras amargas, fácilmente detectable por su gran coeficiente de difusión (Budavari, 1989), y puede presentar una acción irritante inespecífica (Pasteels y col., 1983).
- (ii) polares (fracción m2 en metanol, Figura 25b): glicósidos de flavonoides que pueden ser ingeridos por la larva al estar contenidos en el interior de las hojas de *T. verticillatus*. Esta fracción está constituida principalmente por rutina (54%) y un glicósido de kaempferol unido a cuatro unidades de monosacárido (Figura 30). Se ha determinado que los flavonoles que presentan un patrón de hidroxilación *orto*, tales como la rutina, presentan más actividad como inhibidores de crecimiento de larvas de lepidópteros, que aquellos que no lo presentan. Esto no implica necesariamente actividad pero sugiere un tipo de estructura para flavonoides inhibidores de herbivoría por larvas de lepidópteros (Elliger y col., 1980). La rutina ha sido descrita como inhibidora del crecimiento de larvas de lepidópteros tales como *Heliothis zea* (Elliger y col., 1981; Isman y Duffey, 1982), *Manduca sexta* (Stamp y Horwath, 1992) y *Trichoplusia ni* (Hoffmann-Campo y col., 2001). Su acción sobre *T. ni* es post-ingestiva, no detectando la larva su presencia en la dieta. Sin embargo, en mezcla con otros flavonoides puede desarrollarse un efecto sinérgico de repelencia (Hoffmann-Campo y col., 2001).

La actividad de estos compuestos, informada frente a otros organismos, deberá ser corroborada directamente frente a *M. leucothea*.

La composición de compuestos apolares (i) en el hemiparásito no presenta relación con este tipo de compuestos en los hospederos (Figura 23), a diferencia de los compuestos polares (ii), según se observa en Figura 24. Los compuestos (i) extraídos con cloroformo, debido a su baja polaridad (alto R_f en un sistema de elución de baja polaridad, Figura 25a) y alta volatilidad (bajos t_R en GC-MS), se encontrarían principalmente en la superficie de las hojas, formando parte de ceras cuticulares, en tricomas glandulares (Salisbury, 1994) o simplemente como compuestos volátiles emitidos desde la superficie de las hojas (benzaldehído y acetofenona, Girolami, 1981), por lo que la influencia química del hospedero no sería tan directa en este caso, aunque el benzaldehído y la acetofenona como derivados de la ruta biosintética del ácido chiquímico también podrían encontrarse en paredes floemáticas (Kutchan 2005), pero su limitada solubilidad en un medio acuoso vegetal dificultaría su translocación desde hospedero a hemiparásito. Por el contrario, los fenoles glicosilados tales como la rutina, presentan una polaridad que les permitiría translocarse a través del floema, a diferencia de un flavonol sin glicosilación (Strack y col., 1989), pudiendo transportarse desde hospedero a hemiparásito. Este es el caso de mangiferina (Ramchandra y col., 2005), un polifenol glicosilado similar en estructura a la rutina (Figura 42). Otro ejemplo de translocación desde hospedero a hemiparásito lo constituyen ciertos glicósidos de iridoides (Stermitz y col., 1993).

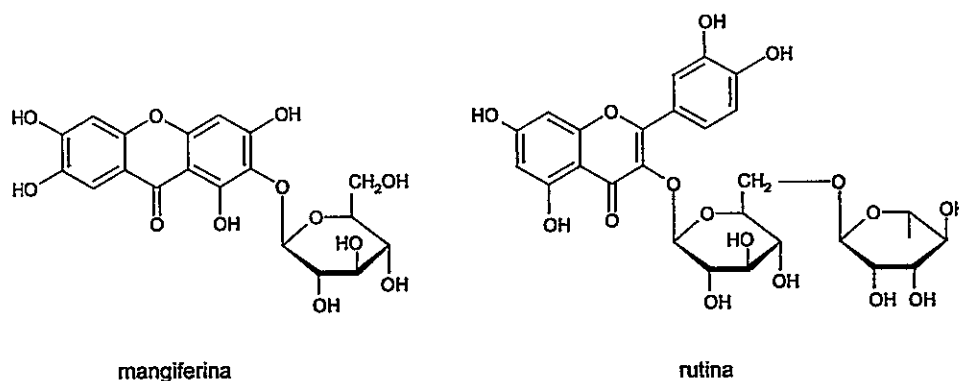


Figura 42. Estructuras de la mangiferina y la rutina

Schinus montanus es el hospedero que presenta la mayor abundancia y diversidad de flavonoides, principalmente de aquellos con bajos valores de R_f (Figura 18b) lo que potenciarían su solubilidad floemática, a diferencia de otros metabolitos tales como las cumarinas encontradas en *F. imbricata* que, aunque abundantes, no se translocarían a T-Fi (Figura 18b), debido a su más baja polaridad.

3.6.3 Posible efecto fagoestimulante por alcaloides sobre la herbivoría de *M. leucothea* en el hemiparásito

Los análisis de alcaloides de hospederos y hemiparásitos se focalizaron en las hojas, por su posible efecto sobre la herbivoría de *T. verticillatus* por *M. leucothea* (Pieridae). El alto porcentaje de herbivoría determinado en T-Bm sugiere la posibilidad de que estos compuestos sean usados por larvas de *M. leucothea* ya sea en la selección de hospederos o en su propia defensa. *Mathania leucothea* es

un herbívoro especialista de *Tristerix* spp. (Santalales: Loranthaceae), en contraste con la mayor parte de las mariposas de la familia Pieridae, tales como *Pieris* spp. o *Tatochila* spp., que se asocian principalmente a crucíferas (Ehrlich y Raven, 1964; Courtney, 1982). En consecuencia, es posible que *M. leucothea* haya desarrollado un mecanismo de resistencia hacia compuestos comúnmente disuasivos hacia otros herbívoros. Se ha reportado la actividad repelente de alcaloides isoquinolínicos, como los encontrados en T-Bm, sobre larvas de lepidópteros (Park, 2000), incluyendo la familia Pieridae (Feltwell, 1982), aunque se ha reportado también la falta de efecto de alcaloides quinolicidínicos sobre lepidópteros especialistas (Stermitz y col., 1989), que presentan toxicidad en lepidópteros generalistas (Johnson y Bentley, 1988). En este sentido, la adaptación de herbívoros especialistas a plantas con un alto contenido de compuestos tóxicos o repelentes, se traduce frecuentemente en el secuestro de estas sustancias, que llegan a constituirse como defensas contra depredadores (Montllor y col., 1991; Bernays y Graham, 1988; Feeny, 1992; Schaffner y col., 1994) y parasitoides (Sime, 2002; Bezzerides y col., 2004).

En este trabajo, hemos examinado algunos compuestos del hemiparásito que pueden ser responsables de disminuir la herbivoría por *M. leucothea*. No ha sido posible encontrar aquellos compuestos que eventualmente sean responsables o estén asociados a la especialización de *M. leucothea* hacia *T. verticillatus*.

4. Discusión General

4.1 Efecto del hospedero en la composición química de *T. verticillatus*

El hemiparásito *T. verticillatus* presentaría capacidad biosintética de compuestos tales como derivados del acetato, terpenos y flavonoides, ya que muestra compuestos que no están presentes en los hospederos. La mayoría de estos compuestos se acumulan generalmente en tejidos superficiales (en tricomas) de hojas y flores (Harborne, 1988; Bernays y Chapman, 1994), por lo cual no presentarían una influencia química directa del hospedero, pudiendo biosintetizarse en los hemiparásitos independientemente del hospedero sobre el cual se encuentren.

El hemiparásito *T. verticillatus* presenta una influencia del hospedero en la composición de metabolitos secundarios más polares, tales como alcaloides y flavonoides glicosilados, los cuales tendrían una mayor movilidad en medios acuosos, por lo tanto una mayor probabilidad de transporte a través del floema al hemiparásito. Se determinó la translocación y la posible biotransformación de alcaloides en el hemiparásito translocados desde el hospedero *B. montana*. Además, *T. verticillatus* presenta diferencias en la composición de flavonoides glicosilados relacionada proporcionalmente con la de sus hospederos (Figura 24). Esto sugiere una influencia del hospedero en la composición de flavonoides glicosilados, principalmente desde el hospedero *S. montanus*. Por lo tanto el hospedero puede influir directamente en la química de hemiparásito, particularmente en la composición de compuestos cuya polaridad les permita

transportarse libremente desde hospedero hasta hemiparásito.

Según los resultados obtenidos, el hemiparásito *T. verticillatus* presenta alcaloides únicamente sobre hospederos que contienen alcaloides, pudiendo translocarlos e incluso biotransformarlos, pero no biosintetizarlos por sí mismo.

4.2 Efecto de la composición química de hospedero y hemiparásito en las interacciones ecológicas de *T. verticillatus*

Se ha determinado estadísticamente la relación entre volátiles de tejidos vegetativos del hospedero y la tasa de visitas por insectos al hemiparásito. Se ha informado previamente la atraktividad de volátiles provenientes de hojas hacia insectos visitantes (Caissard y col., 2004). Sin embargo, este trabajo constituye la primera evidencia de la participación de los volátiles del hospedero en la atraktividad hacia insectos visitantes de un hemiparásito, esperable por la menor productividad de volátiles del hemiparásito y por el mayor volumen de un hospedero con respecto a un hemiparásito. La mayor tasa de visitas registrada por *Bombus* spp. (Apidae) en T-Sm se relaciona principalmente con la abundancia de terpenos de su hospedero, la mayor tasa de visitas por Tachinidae en T-Fi se relaciona principalmente con monoterpenos derivados del canfano de su hospedero y la menor tasa de visitas en T-Bm por Apidae y Vespidae se relaciona principalmente con derivados de la ruta biosintética del acetato de su hospedero. La menor tasa de visitas en el hemiparásito T-Bm podría relacionarse también con la eventual translocación de alcaloides desde *B. montana* hacia el néctar de la flor de *T. verticillatus*, ya que se ha determinado el efecto disuasivo de néctares con un

alto contenido de alcaloides sobre insectos visitantes que no presentan un patrón de especialización, como *Bombus* spp. (Gegeer y col., 2007).

El contenido de dos tipos de compuestos se relaciona negativamente en forma significativa con la herbivoría del hemiparásito. Un tipo de compuesto apolar y volátil, no es afectado directamente por el hospedero posiblemente por localizarse preferentemente en glándulas superficiales de las hojas. Otro tipo de compuesto, es polar y potencialmente transportable desde hospedero a hemiparásito, pudiendo afectar la intensidad de herbivoría del hemiparásito. La menor intensidad de herbivoría en T-Sm se relaciona con una gran variedad de metabolitos secundarios inhibidores de la herbivoría por *M. leucothea*. Esta variada composición puede superar la capacidad de detoxificación de *M. leucothea*, ya que como herbívoro especialista posee la capacidad de adaptarse a un restringido número de compuestos, a diferencia de herbívoros generalistas que presentan la capacidad de detoxificar una gran variedad de metabolitos secundarios (Bernays y Chapman, 2000), lo cual puede influir en la mayor sensibilidad de *M. leucothea* hacia compuestos repelentes en comparación con insectos generalistas (Bernays y col., 2000). Sin embargo, la mayor intensidad de herbivoría por *M. leucothea* se presentó en el hemiparásito con el mayor contenido de alcaloides isoquinolínicos, translocados desde su hospedero (T-Bm), cuya inhibición en la alimentación de insectos herbívoros en general ha sido previamente informada, lo cual sugiere una cierta capacidad de *M. leucothea* de detoxificarlos. Esta propiedad puede evitar la competencia con otros insectos herbívoros. Sin embargo, al no ser estos alcaloides constitutivos del hemiparásito no pueden ser considerados como compuestos relacionados con la especialización de *M. leucothea* en *T. verticillatus*.

Según los resultados obtenidos, las interacciones ecológicas del hemiparásito se relacionan directamente con la composición química de su hospedero. Las interacciones ecológicas del hemiparásito presentan una influencia química claramente más favorable (mayor probabilidad de polinización entomófila y menor herbivoría) cuando el hospedero es *Schinus molle*. Por el contrario, cuando el hospedero es *Berberis montana*, el hemiparásito presenta una influencia química menos favorable (menor probabilidad de polinización entomófila y mayor herbivoría).

4.3 Posible diferenciación genética del hemiparásito relacionada con diferencias en composición química de distintos hospederos

La diferenciación taxonómica de hemiparásitos, tales como *Tristerix* spp. ha sido realizada clásicamente por diferencias morfológicas en la forma de frutos (Grazi y Urech, 1981) o semillas (Kuijt, 1988). Sin embargo, también se ha encontrado diferenciación genética en hemiparásitos que no presentan diferencias morfológicas (Jerome y Ford, 2002). Por lo tanto la diferenciación genética no implica necesariamente una modificación visible de rasgos morfológicos. Sin embargo, la composición química de un hemiparásito adaptado fisiológicamente a un hospedero en particular puede verse fuertemente afectada por la adaptación a un nuevo hospedero. Este cambio en la composición química debido al proceso de adaptación a un nuevo hospedero puede eventualmente llevar a una diferenciación genética en el hemiparásito.

Se ha informado de la diferenciación genética de hemiparásitos asociados con distintos hospederos (Clay, 1985; Bohling y col., 2002; Jerome y Ford, 2002) y en relación con su distinta composición de metabolitos secundarios (Nickrent y Stell, 1990; Linhart, 2003). Por ejemplo, el hemiparásito *Viscum album* subsp. *abietis* asociado a *Abies* spp. y *V. album* subsp. *austriacum* asociado principalmente a *Pinus* spp., presentan diferencias en su composición de viscotoxinas (Zuber y Widmer, 2000). Además se ha determinado diferencias en composición química de hospederos asociados con distintas sub-especies de hemiparásito (Snyder y col., 1996). Las diferencias en la calidad de los hospederos determinadas por diferencias en su composición química pueden influir sobre la especialización en un hospedero o un rango de hospederos que presenten una composición química característica. En un reciente estudio realizado por Amico y col. (2007), se ha propuesto que la especiación ecológica de *Tristerix* ocurre en forma simpátrica, en asociación con distintos hospederos en distintos ambientes.

La influencia química de los hospederos sobre el hemiparásito *T. verticillatus* parece ser más beneficiosa ecológicamente (mayor transferencia de polen y menor herbivoría) desde *S. montanus*, y podría traducirse a especialización de *T. verticillatus* en este hospedero y eventualmente a especiación.

5. Conclusiones

Los compuestos volátiles son un importante factor en la atractividad de las flores hacia insectos visitantes. El origen de los volátiles no necesariamente son las flores visitadas, sino también el entorno. En este caso el hospedero puede afectar notablemente la atractividad de las flores del hemiparásito hacia insectos, a través de la emisión de volátiles atractivos. Las diferencias en la composición de volátiles del hospedero se relacionan además con diferencias en la naturaleza de los insectos visitantes del hemiparásito.

La composición de metabolitos secundarios del hemiparásito *T. verticillatus* varía entre hospederos, lo que puede relacionarse con diferencias en sus interacciones con insectos (visitantes florales y herbívoros).

6. Bibliografía

- Adler, L. S. (2000a) Alkaloid uptake increases fitness in a hemiparasitic plant via reduced herbivory and increased pollination. *Am. Nat.* 156: 92-99.
- Adler, L. S. (2000b) The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*. 91: 409-420.
- Adler, L. S. (2002) Host effects on herbivory and pollination in a hemiparasitic plant. *Ecol.* 83: 2700-2710.
- Adler, L. S. e Irwin, R. E. (2005) Ecological costs and benefits of defenses in nectar. *Ecol.* 86: 2968-2978.
- Adler, L. S. y Wink, M. (2001) Transfer of quinolizidine alkaloids from hosts to hemiparasites in two *Castilleja-Lupinus* associations: analysis of floral and vegetative tissues. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 551- 561.
- Amico, G. C., Vidal-Russel, R. y Nickrent, D. L. (2007) Phylogenetic relationships and ecological speciation in the mistletoe *Tristerix* (Loranthaceae): the influence of pollinators, dispersers, and hosts. *Am. J. Bot.* 94: 558-567.
- Andersson, S. (2003) Foraging responses in the butterflies *Inachis io*, *Aglais urticae* (Nymphalidae), and *Gonepteryx rhamni* (Pieridae) to floral scents. *Chemoecol.* 13: 1-11.
- APG II. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 399-436.
- Arslanian, R. L., Harris, G. H., Stermitz, F. R. (1990) New quinolizidine alkaloids from *Lupinus argenteus* and its hosted root parasite *Castilleja sulphurea*. Stereochemistry and conformation of some naturally occurring cyclic carbinolamides. *J. Org. Chem.* 55: 1204-1210.
- Barkley, F. A. (1957) A study of *Schinus* L. *Revista Botánica Lilloa*. Tomo XXVIII: 5-110.
- Bernays, E. A. y Chapman, R. F. (1994) Host-plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman and Hall, New York.
- Bernays, E. A. y Chapman, R. F. (2000) A neurophysiological study of sensitivity to a feeding deterrent in two sister species of *Heliothis* with different diet breadths. *J. Ins. Physiol.* 46: 905-912.
- Bernays, E. A. y Graham, M. (1988) On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecol.* 69: 886-892.
- Bernays, E. A., Openheim, S., Chapman, R. F., Kwon, H. Y Gould, F. (2000) Taste sensitivity of insect herbivores to deterrents is greater in specialists than in generalists: a behavioral test of the hypothesis with two closely related caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 26: 547-562.
- Bezzerides, A., Yong, T., Bezzerides, J., Hussein, J., Ladau, J., Eisner, M. y Eisner, T. (2004) Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostriniae*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 9029-9032.
- Blight, M. M., LeMetayer, M., Delege, M. H. P., Pickette, J. A., MarionPoll, F. y Wadhams, L. J. (1997) Identification of floral volatiles involved in recognition of oilseed rape flowers, *Brassica napus* by honeybees, *Apis mellifera*. *J. Chem. Ecol.* 23: 1715-1727.
- Boardman, N. K. (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 355-377.

- Bohling, N., Greuter, W., Raus, T., Snogerup, B., Snogerup, S. y Zuber, D. (2002) Notes on the Cretan mistletoe, *Viscum album* subsp. *creticum* subsp. *nova* (Loranthaceae/Viscaceae). *Isr. J. Pl. Sci.* 50: S77-S84.
- Borg-Karlson, A. K., Valterova, I. y Nilsson, L. A. (1994) Volatile compounds from flowers of six species in the family Apiaceae- bouquets for different pollinators. *Phytochemistry* 35: 111-119.
- Brown, G. D. (1994) The sesquiterpenes of *Fabiana imbricata*. *Phytochemistry* 35: 425-433.
- Budavari, S. (1989) The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck and Co., Inc. Rahway, New Jersey.
- Caissard, J. C., Meekijironroj, A., Baudino, S. y Anstett, M. C. (2004) Localization of production and emission of pollinator attractant on whole leaves of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *Am. J. Bot.* 91: 1190-1199.
- Clay, K., Dement, D. y Rejmanek, M. (1985) Experimental evidence for host races in mistletoe (*Phoradendron tomentosum*). *Am. J. Bot.* 72: 1225-1231.
- Courtney, S. P. (1982) Coevolution of pierid butterflies and their cruciferous food plants. *Oecol.* 54: 101-107.
- Courtney, S. P. (1985) Oviposition by the mistletoe-feeding pierid butterfly *Mathania leucothea* in Chile. *J. Res. Lep.* 24: 264-270.
- Dobson, H. E. M. (1987) Role of flower and pollen aromas in host-plant recognition by solitary bees. *Oecol.* 72: 618-623.
- Dobson, H. E. M. (1994) Floral volatiles in insect biology. En: Bernays, E. A. (ed), *Insect-Plant Interactions*, vol. V. CRC Press, Boca Raton.
- Dobson, H. E. M., Bergström, J., Bergström, G. y Groth, I. (1987) Pollen and flower volatiles in two *Rosa* species. *Phytochemistry* 26: 3171-3173.
- Ehrlich, P. R. y Raven, P. H. (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evol.* 18: 586-608.
- Elliger, C. A., Chan, B. C. y Waiss, Jr. (1980) Flavonoids as larval growth inhibitors. *Naturwissenschaften* 67: 358-360.
- Elliger, C. A., Wong, Y., Chan, B. G., Waiss, A. C. (1981) Growth inhibitors in tomato (*Lycopersicon*) to tomato fruitworm (*Heliothis zea*). *J. Chem. Ecol.* 7: 753-758.
- Faegri, K., van der Pijl, L. (1979) *The Principles of Pollination Ecology*, 3era ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fajardo, V. (1992) Alcaloides en especies del género *Berberis* de Chile. En O. Muñoz (ed), *Química de la Flora de Chile*. pp 215-240. Universidad de Chile, Santiago.
- Fajardo, V., Podestá, F. y Urzúa, A. (1986) Reseña de los alcaloides encontrados en el género *Berberis* de Chile. *Rev. Lat. Quim.* 16: 141-156.
- Feeny, P. (1992) The evolution of chemical ecology: contributions from the study of herbivorous insects. En Rosenthal, G. A. y Berenbaum, M. R. (eds), *Herbivores their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. pp. 1-35. Academic Press, London.
- Feltwell, J. (1982) Large White Butterfly. *The Biology, Biochemistry and Physiology of Pieris brassicae* (Linnaeus). Dr. W. Junk Publishers. The Hague-Boston-London.
- Fonta, C. y Masson, C. (1984) Comparative study by electrophysiology of olfactory responses in bumblebees (*Bombus hypnorum* and *Bombus terrestris*). *J. Chem. Ecol.* 10: 1157-1168.

- Galen, C. (1985) Regulation of seed-set in *Polonium viscosum*: floral scents, pollination, and resources. *Ecol.* 66: 792-797.
- Galen, C. y Kevan, P. (1983) Bumblebee foraging and floral scent dimorphism: *Bombus kirbyellus* Curtis (Hymenoptera: Apidae) and *Polemonium viscosum* Nutt. (Polemoniaceae). *Can. J. Zool.* 61: 1207-1213.
- Gasket, A. C., Conti, E. y Schiestl, F. P. (2005) Floral odor variation in two heterostylous species of *Primula*. *J. Chem. Ecol.* 31: 1223-1228.
- Gegear, R. J., Manson, J. S., Thomson, J. D. (2007) Ecological context influences pollinator deterrence by alkaloids in floral nectar. *Ecol. Letters* 10: 375-382.
- Gerlach, G. y Schill, R. (1991) Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Bot. Acta* 104: 379-391.
- Girolami, V., Vianello, A., Strapazzon, A., Ragazzi, E. y Veronese, G. (1981) Ovipositional deterrents in *Dacus oleae*. *Entomol. Exp. Appl.* 29: 177-188.
- Goldstein, G., Rada, F., Sternberg, L., Burguera, J. L., Burguera, M.; Orozco, A.; Montilla, M.; Zabala, O.; Azócar, A.; Canales, M. J. y Celis, A. (1989) Gas exchange and water balance of a mistletoe species and its mangrove hosts. *Oecol.* 60: 396-400.
- Grazi, G., Urech, K. (1981) Einige morphologische Merkmale der Mistelbeere (*Viscum album* L.) und deren taxonomische Bedeutung. *Beit. Biol. Pflanz.* 56: 293-306.
- Grison, L., Edwards, A. A., Hossaert-McKey, M. (1999) Interspecies variation in floral emitted by tropical *Ficus* species. *Phytochemistry* 52: 1293-1299.
- Grison-Pigé, L., Bessière, J.-M., Hossaert-McKey, M. (2002) Specific attraction of fig-pollinating wasps: role of volatiles compounds released by tropical figs. *J. Chem. Ecol.* 28: 283-295.
- Harborne, J. B. (1988) *Introduction to Ecological Biochemistry*. 3ª edición. Academic Press.
- Henning, J. A. y Teuber, L. R. (1992) Combined gas-chromatography-electroantennogram characterization of alfalfa floral volatiles recognized by honey-bees (Hymenoptera, Apidae). *J. Eco. Entomol.* 85: 226-232.
- Hoffmann, A. J., Fuentes, E. R., Cortés, I., Liberona, F. y Costa, V. (1986) *Tristerix tetrandrus* (Loranthaceae) and its host-plants in the Chilean matorral: patterns and mechanisms. *Oecol.* 69: 202-206.
- Hoffmann-Campo, C. B., Harborne, J. B. y McCaffery, A. R. (2001) Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. *Entomol. Exp. Appl.* 98: 181-194.
- Honda, K., Omura, H., y Hayashi, N. (1998) Identification of floral volatiles from *Ligustrum japonicum* that stimulate flower-visiting by cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* 24: 2167-2180.
- Isman, M. B. y Duffey, S. S. (1982) Toxicity of tomato phenolic compounds to the fruitworm, *Heliothis zea*. *Entomol. Exp. Appl.* 31: 370-376.
- Jakobsen, H.B., Friis, P., Nielsen, J. K. & Olsen, C. E. (1994) Emission of volatiles from flowers and leaves of *Brassica napus in situ*. *Phytochemistry* 37: 695-699.
- James, D. G. (2005) Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. *J. Chem. Ecol.* 31: 481-495.
- Jerome, C. A. y Ford, B. (2002) The discovery of three genetic races of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) provides insight into the evolution of parasitic angiosperms. *Mol. Ecol.* 11: 387-405.

- Johnson, N.D. y Bentley, B. L. (1988) Effects of dietary protein and lupine alkaloids on growth and survivorship of *Spodoptera eridania*. J. Chem. Ecol. 14: 1391-1403.
- Jürgens, A. (2004) Flower scent composition in diurnal *Silene* species (Caryophyllaceae): phylogenetic constraints or adaptation to flower visitors?. Biochem. Syst. Ecol. 32: 841-859.
- Karimov, A. y Shakirov, R. Sh. (1993) *Berberis* alkaloids XIV. Dynamics of the accumulation of alkaloids in *Berberis oblonga*. Chem. Nat. Compounds 28: 524-525.
- Karimov, A., Butayarov, A. B., Yusupov, M. M., Mirzamatov, R. T. y Shakirov, R. Sh. (1994) *Berberis* alkaloids XXX. Dynamics of the accumulation of the alkaloids of *Berberis integerrima* and *B. nummularia*. Chem. Nat. Compounds 29: 412-413.
- Keeping, M.G., Crewe, R.M., y Field, B.I. (1982) Mandibular gland secretions of the old world stingless bee, *Trigona gribodoi* Magretti: isolation, identification, and compositional changes with age. J. Api. Res. 21:65-73
- Knudsen, J.T., Mori, S. A. (1996) Floral scents and pollination in neotropical Lecythidaceae. Biotropica 28: 42-60.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L., Groth, I., Bergstrom, G. y Raguso, R. A. (2004) Trends in floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. Bot. J. Linn. Soc. 146: 191-199.
- Kuijt, J. (1969) The Mistletoes. En The Biology of Parasitic Flowering Plants. University of California Press. Berkeley, Los Angeles.
- Kuijt, J. (1988) Revision of *Tristerix* (Loranthaceae). Syst. Bot. Monogr. 19: 1-61.
- Kutchan, T. M. (2005) A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. Curr. Op. Pl. Biol. 8: 292-300.
- Laverty, T. (1980) The flower-visiting behavior of bumble bees: floral complexity and learning. Can. J. Zool. 58: 1324-1335.
- Levin, R. A., Raguso, R. A. y McDade, L. (2001) Fragrance chemistry and pollinator affinities in Nyctaginaceae. Phytochemistry 58: 429-440.
- Linhart, Y. B., Ellwood, L. M., Karron, J. D. y Gehring, J. L. (2003) Genetic differentiation in the dwarf mistletoes *Arceuthobium vaginatum* and *Arceuthobium americanum* on their principal and secondary hosts. Int. J. Pl. Sci. 164: 61-69.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. y Thomas, M. B. (1962) The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York- Heidelberg- Berlin.
- Macior, L. W. (1986) Floral resource sharing by bumblebees and hummingbirds in *Pedicularis* (Scrophulariaceae) pollination. Bull. Torr. Bot. Club 113:101-109.
- Manguro, L. O. A., Ugi, I., Lemmen, P. Hermann, R. (2003) Flavonol glycosides of *Warburgia ugandensis* leaves. Phytochemistry 64: 891-896.
- Marko, M. D. (1996) Hemiparasitism by *Castilleja sulphurea*: alkaloid incorporation and herbivore response. M. S. Tesis, Universidad del estado de Colorado.
- Martín-Cordero, C., Gil, A. M. y Ayuso, M. J. (1993) Transfer of bipiperidyl and quinolizidine alkaloids to *Viscum cruciatum* Sieber (Loranthaceae) hemiparasitic on *Retama sphaerocarpa* Boissier (Leguminosae). J. Chem. Ecol. 19: 2389- 2393.
- Martín-Cordero, C., Pedraza, M. A., Gil, A. M. y Ayuso, M. J. 1997. Bipiperidyl and quinolizidine alkaloids in fruits of *Viscum cruciatum* hemiparasitic on *Retama sphaerocarpa* Boissier (Leguminosae). J. Chem. Ecol. 19: 2389-2393.

- Marvier, M. A. (1996) Parasitic plant-host interactions: Plant performance and indirect effects on parasite-feeding herbivores. *Ecol.* 77: 1398-1409.
- Marvier, M. A. (1998) A mixed diet improves performance and herbivore resistance of a parasitic plant. *Ecol.* 79: 1272-1280.
- Montllor, C. B., Bernays, E. A. y Cornelius, M. L. (1991) Responses of two hymenopteran predators to surface chemistry of their prey: significance for an alkaloid-sequestering caterpillar. *J. Chem. Ecol.* 17: 391-399.
- Muñoz, O. (1992) Género *Fabiana*. Estudios fitoquímicos de la familia Solanaceae en Chile. Solanaceae. En *Química de la Flora de Chile*. pp 189-212. Universidad de Chile, Santiago.
- Navas, L. E. (1976) *Berberis*. En *Flora de la Cuenca de Santiago*. Tomo II. pág 110. Ediciones de la Universidad de Chile.
- Navas, L. E. (1979) *Fabiana*. En *Flora de la Cuenca de Santiago*. Tomo III. pág 96. Ediciones de la Universidad de Chile.
- Nickrent, D. L. y Stell, A. L. (1990) Biochemical systematics of the *Arceuthobium campylopodum* complex (dwarf mistletoes, Viscaceae). 2. Electrophoretic evidence for genetic differentiation in 2 host races of hemlock dwarf mistletoe (*Arceuthobium tsugense*). *Biochem. Syst. Ecol.* 18: 267-280.
- Nishida, R. (2002) Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 47: 57-92.
- Nishida, R. (2005) Chemosensory basis of host recognition in butterflies-multi-component system of oviposition stimulants and deterrents. *Chem. Senses* 30: i293-i294.
- Norton D. A. y De Lange, P. J. (1999) Host specificity in parasitic mistletoes (Loranthaceae) in New Zealand. *Funct. Ecol.* 13: 552-559.
- Norton, D. A. y Carpenter, M. A. (1998) Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 13: 101-105.
- Odell, E., Raguso, R. A., Jones, K. N. (1999) Bumblebee foraging responses to variation in floral scent and color in snapdragons (*Antirrhinum*: Scrophulariaceae). *Am. Mid. Nat.* 142: 257-265.
- Ômura, H. y Honda, K. (2005) Priority of color over scent during flower visitation by adult *Vanessa indica* butterflies. *Oecol.* 142: 588-596.
- Overton, J. M. (1997) Host specialization and partial reproductive isolation in desert mistletoe (*Phoradendron californicum*). *Southwest. Nat.* 42: 201-209.
- Park, I. K., Lee, H. S., Lee, S. G., Park, J. D. y Ahn Y. J. (2000) Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids identified in *Coptis japonica* roots against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae). *J. Eco. Entomol.* 93: 331-335.
- Pasteels, J. M., Grégoire, J. C. y Rowell-Rahier, M. (1983) The chemical ecology of defense in arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 28: 263-289.
- Pastene, E. R., Wilkomirsky, T., Bocaz, G., Havel, J., Peric, I., Vega, M., González, M. y Alderete, J. (2001) Uso de espectroscopia de RMN y Maldit-ToF MS en la elucidación estructural de flavonoides antioxidantes provenientes de la planta medicinal chilena *Cheilanthes glauca* (Cav.) Mett. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 46: 449-457.
- Pham-Delegue, M. H., Etievant, P., Guichard, E. y Masson, C. (1989) Sunflower volatiles involved in honeybee discrimination among genotypes and flowering stages. *J. Chem. Ecol.* 15: 329-343.

- Pleasants, J. M. y Waser, N. (1985) Bumblebee foraging at a "hummingbird" flower: reward economics and floral choice. *Am. Mid. Nat.* 114: 283-291.
- Press, M. C. y Stewart, G. R. (1991) Carbon acquisition and assimilation in parasitic plants. *Funct. Ecol.* 5: 278-283.
- Proctor, M. Yeo, P. y Lack, A. (1996) *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Raguso, R. A. (2004) Why are some floral nectars scented?. *Ecol.* 85: 1486-1494.
- Raguso, R. A. y Willis, M. A. (2002) Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by naive hawkmoths, *Manduca sexta*. *Anim. Behav.* 64: 685-695.
- Ramchandra, B. J., Sneha, J. A., Sanjay, J. S. y Shivaji, B. G. (2005) Host-hemiparasite transfer of the C-glucosyl xanthone mangiferin between *Mangifera indica* and *Dendrophthoe falcata*. *J. Pl. Int.* 1: 171-177.
- Reis, M.G., Pansarim, E.R., da Silva, U.F., do Amaral, M. C. E. y Marsaioli, A.J. (2004) Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. *Ark. vi:* 103-111.
- Ribeiro, A. B., Silva, D. H. S. y Bolzani, V. S. (2002) Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). *Eclat. Quím.* 27: 35-44.
- Riveros, M. (1991) Aspectos sobre la Biología Reproductiva en Dos Comunidades en el Sur de Chile, 40°S. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.
- Robacker, D. C., Flottum, P. K., Sammataro, D., Ericksson, E. H. (1983) Effects of climatic and edaphic factors on soybean flowers and on the subsequent attractiveness of the plants to honey bees. *Field Crops. Res.* 6: 267-278.
- Roland, J., Denford, K. E. y Jimenez, L. (1995) Borneol as an attractant for *Cyzenis albicans*, a tachinid parasitoid of the winter moth, *Operophtera brumata* L. (Lepidoptera: Geometridae). *Can. Entomol.* 127:413-421.
- Saiz, F. y Núñez, C. (1997) Estudio ecológico de las cecidias del género *Schinus*, especialmente las de hoja y de rama de *S. polygamus* y *S. latifolius* (Anacardiaceae), en Chile central. *Acta Entomol. Chil.* 21: 39-53.
- Salisbury, F. B. (1994) Lípidos y otros productos naturales. En *Fisiología Vegetal*. pp 339-359. Grupo ed. Iberoamerica, S.A. de C.V.
- Sappington, T.W., and Taylor, O.R. 1990. Developmental and environmental sources of pheromone variation in *Colias eurytheme* butterflies. *J. Chem. Ecol.* 16:2771-2786.
- Sazima, M., Vogel, S., Cocucci, A., Hausner, G. (1993) The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae)-pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Pl. Syst. Evol.* 187: 51-88.
- Schaffner, U., Boevé, J., Gfeller, H. y Schlunegger, U. (1994) Sequestration of *Veratrum* alkaloids by specialist *Rhadnoceraea nodicornis* Konow (Hymenoptera, Tenthredinidae) and its ecoethological implications. *J. Chem. Ecol.* 20: 3233-3250.
- Schiestl, F. P. y Roubik, D. W. (2003) Odor compound detection in male euglossine bees. *J. Chem. Ecol.* 29: 253-257.
- Schneider, M. J. y Stermitz, F. R. (1990) Uptake of host plant alkaloids by root parasitic *Pedicularis* species. *Phytochemistry* 29: 1811-1814.
- Schoonhoven, L. M., Jermy, T. y van Loon, J. J. A. (1998) *Insect-Plant Biology: From Physiology to Evolution*. Chapman and Hall, London.

- Sime, K. (2002) Chemical defence of *Battus philenor* larvae against attack by the parasitoid *Trogus pennator*. *Ecol. Entomol.* 27: 337-345.
- Snyder, M.A., Fineschi, B., Linhart, Y. B. y Smith, R. H. (1996) Multivariate discrimination of host use by dwarf mistletoe *Arceuthobium vaginatum* subsp. *cryptopodum*: inter- and intraspecific comparisons. *J. Chem. Ecol.* 22: 295-305.
- Soto, J. E., Ruiz, E. A., Becerra, J., Alarcón, J. y Silva, M. (1996) Contribución a la quimiotaxonomía de las Loranthaceae chilenas. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 41: 377-382.
- Stahl, E. (1969) *Thin Layer Chromatography: Laboratory Handbook*. 2da ed. Springer, New York.
- Stamp, N. E. y Horwath, K. L. (1992) Interactive effects of temperature and concentration of the flavonol rutin on growth, molt, and food utilization of *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol. Exp. Appl.* 64: 135-150.
- Stermitz, F. R., Belofsky, G. N., David, N. G. y Singer, M. C. (1989) Quinolizidine alkaloids obtained by *Pedicularis semibarbata* (Scrophulariaceae) from *Lupinus fulcratus* (Leguminosae) fail to influence the specialist herbivore *Euphydryas editha* (Lepidoptera). *J. Chem. Ecol.* 15: 2521- 2530.
- Stermitz F. R., Foderato, T. A. y Li, Y. X. (1993) Chemistry of the Scrophulariaceae. 26. Iridoid glycoside uptake by *Castilleja integra* via root parasitism on *Penstemon teucrioides*. *Phytochemistry* 32: 1151-1153.
- Stermitz, F. R., Guy, H. H. y Wang, J. (1986) Iridoids and alkaloids from *Castilleja* host plants for *Platyptilia pica*. Rhexifoline content of *P. pica*. *Biochem. Syst. Ecol.* 14: 499-506.
- Stermitz, F. R. y Harris, G. H. (1986) Transfer of pyrrolizidine and quinolizidine alkaloids to *Castilleja* (Scrophulariaceae) hemiparasites from composite and legume host plants. *J. Chem. Ecol.* 13: 1917- 1926.
- Stermitz, F. R. y Pomeroy, M. (1992) Iridoid glycosides from *Castilleja purpurea* and *C. indivisa*, and quinolizidine alkaloid transfer from *Lupinus texensis* to *C. indivisa* via root parasitism. *Biochem. Syst. Ecol.* 20: 473-475.
- Stout, J. C. y Goulson, D. y Allen, J. A. (1998) Repellent scent-marking of flowers by a guild of foraging bumblebees (*Bombus* spp.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43: 317-326.
- Strack, D., Heilemann, J., Wray, V. Y Dirks, H. (1989) Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry* 28: 2071-2078.
- Strong, G. L., Bannister, P. y Burritt, D. (2000) Are mistletoes shade plants? CO₂ assimilation and chlorophyll fluorescence of temperate mistletoes and their hosts. *Ann. Bot.* 85: 511-519.
- Svensson, B.G. and Bergström, G. 1977. Volatile marking secretions from the labial gland of north European *Pyrobombus* D.T. males (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Soc.* 24:213-224.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (1991) Surface protection and secondary defense compounds. En "Plant Physiology". pp 318-345. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. Red wood City, California.
- Theis, N. y Lerda, M. (2003) The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Pl. Sci.* 164: S93-S102.
- Tilney P. y Lubke R. (1974) A chemotaxonomic study of twelve species of the family Loranthaceae. *J. South Afr. Bot.* 40: 315-322.

- Ulriksen, P. (2003) Análisis vegetacional y palinológico de especies dominantes de la comuna Litueche, VI Región. Tesis de ingeniería agrónoma, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Universidad Católica de Chile, Santiago.
- von Kováts, E. (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta* 41: 1915-1932.
- Wagner, H., Bladt, S. y Zganski, E. M. (1984) *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Webster, F. X., Millar, J. G. y Kiemle, D. J. (1998) Mass spectrometry. En Millar, J. G. and Haynes, K. F. (eds), *Methods in Chemical Ecology*. pp 127-152. Chapman and Hall.
- Williams, N. H. (1983) Floral fragrances as cues in animal behavior. En: Jones E. C., Little, R. J. (eds) *Handbook of Experimental Pollination Biology*. pp. 50-72. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Williams, N. H. y Dodson, C. H. (1972) Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evol.* 26: 84-95.
- Wilson, C. A. y Calvin, C. (2006) Character divergences and convergences in canopy-dwelling Loranthaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 150: 101-113.
- Wink, M. y Twardowski, T. (1992) Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. En S. J. H., Rizvi and V. Rizvi (eds), *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*. pp 129-150. Chapman and Hall, London.
- Wittstock, U. Agerbirk, N., Stauber, E. S., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J. y Vogel, H. (2004) Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Ecol.* 101: 4859-4864.
- Zuber, D. y Widmer, A. (2000) Genetic evidence for host specificity in the hemiparasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Mol. Ecol.* 9: 1069-1073.