



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

EFFECTO DEL HOSPEDERO SOBRE CARACTERÍSTICAS FRUTALES DE
***Tristerix verticillatus* (LORANTHACEAE)**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

María Francisca Lilienfeld Barahona

Directores de Seminario de Título:

Dr. Hermann Niemeyer Marich

Dra. Alejandra Troncoso Joffré

Abril, 2012
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. María Francisca Lilienfeld**.

“EFECTOS DEL HOSPEDERO SOBRE CARACTERÍSTICAS FRUTALES DE *Tristerix verticillatus* (LORANTHACEAE)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Hermann M. Niemeyer
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Hermann M. Niemeyer in black ink, positioned above a horizontal line.

Dra. Alejandra J. Troncoso
Co-Director Seminario de Título

A horizontal line intended for the signature of Dra. Alejandra J. Troncoso.

Comisión de Evaluación

Dr. Ramiro Bustamante
Presidente Comisión

Handwritten signature of Ramiro Bustamante in blue ink, positioned above a horizontal line.

Dr. Rodrigo Medel
Evaluador

A horizontal line intended for the signature of Dr. Rodrigo Medel.

Santiago de Chile, 20 de abril de 2012



Nací el 21 de febrero de 1985 en Santiago de Chile. Toda mi enseñanza básica y media fue en el Colegio Suizo de Santiago, donde tuve una educación de primera calidad y conocí hermosas personas. El año 2003 ingresé a Bachillerato en Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Chile, con la idea de estudiar medicina, pero en vez de aclarar mi camino me confundió inmensamente, decidiendo estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la misma universidad... continúo inmensamente confundida! Mi Seminario de Título lo realicé en el laboratorio de Química Ecológica con el Dr. Hermann Niemeyer y la Dra. Alejandra Troncoso. Tengo una lindísima familia, la cual agradezco diariamente. Soy de pocos pero muy buenos amigos, amigos de la vida. Mi pasatiempo es nadar, jugar fútbol y pensar que la vida es una y muy breve por lo que debo disfrutarla.

A mis papás por contenerme todo este tiempo y siempre

A Miguel por ser nuestro ángel de colores y alegría

...

Agradecimientos

Esto es lo más difícil de todo el escrito...por donde partir.

Quienes hicieron mis días de trabajo días alegres...muchas gracias Beautiful People LQE. Un excelente grupo de profesionales y aún mejor grupo de amigos. Me dejaré caer en el lab justo cuando tengan torta, no se preocupen. Gracias Marce, Dani B., Dani T., Luchito, Claudita, Clau T., Kathy Co., Andy y en especial gracias Dani A de Apolineo por escucharme y ayudarme cada una de las mil veces que te pedí socorro; Mi Carolita, gracias por absolutamente TODO, sin ti no lo hubiese logrado, gracias por tu paciencia, dedicación y sobre todo por tu amistad; Marioli, empatamos! Gracias por todas las risas, alegría y por rabear conmigo. Pasmos lindos, divertidos, largos momentos juntas...ah! Y estrepitosos momentos juntas...para nosotras siempre será un puma. Ale, gracias gracias y más gracias, por tu inmensa ayuda, por tu sabiduría, por guiarme todo el tiempo, por cuidarnos y querernos. Muchas gracias Herman Niemeyer por adoptarme en el laboratorio cuando no tenía nada claro y me contaste con entusiasmo el proyecto del Quintral, convenciéndome de inmediato.

Amigas de la vida, amigas de siempre, hermanas de corazón que me hacen la vida más fácil. Steffi, Tama, Pau, Katha, Carito, Lari gracias por hacerme feliz, gracias por compartir conmigo 23 años, las adoro.

Como no agradecerte Jocy, amiga linda, hermana, apoyo incondicional, cuántas pataletas, indecisiones, rabias pasamos juntas, pero finalmente podemos decir las dos que lo logramos! Seguiremos cantando y bailando juntas.

Agradecer de corazón a Matías, por contenerme cada vez que colapsé, por escucharme sin parar, por tus consejos y abrazos, muchas gracias por estar a mi lado y por caminar junto a mí. Gracias por darme un Oso hermoso.

A mis hermanos Mathias y Vicente, gracias por vuestro apoyo de hermanos, hacerme reír cuando lo necesitaba, rabear cuando no lo necesitaba y aceptar que soy la preferida.

Familia entera, a los Tatas, tíos, tías y primos, que siempre confiaron en mi y siempre estuvieron pendientes y preguntando constantemente por esta tesis, sufriendo y celebrando cada vez que les daba noticias y apoyando en cada momento. Me encanta la familia que tengo y este será un nuevo motivo para reunirnos y celebrar juntos como tantas miles de veces lo hemos hecho y lo seguiremos haciendo.

A quienes más me aman. Agradezco infinitamente a mis papás Andrea y Carlos, que sin ellos absolutamente nada de esto hubiese ocurrido...obvio! Gracias por todo el cariño, por toda la confianza, por enseñarme a ser una mejor persona. Gracias por ser mis papás y estar conmigo siempre siempre. Los adoro y quiero infinito!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| BIOGRAFIA..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| INDICE DE CONTENIDOS..... | vii |
| INDICE DE FIGURAS..... | ix |
| INDICE DE TABLAS..... | x |
| LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Características visuales de los frutos | 4 |
| Composición y concentración de azúcares solubles en la pulpa del frutos | 5 |
| 1.1 Presentación del problema..... | 6 |
| 1.2 Objetivo general..... | 6 |
| 1.3 Objetivos específicos..... | 6 |
| 2. METODOLOGÍA..... | 7 |
| 2.1 Área de estudio..... | 7 |
| 2.2 Descripción de la hemiparásita <i>Tristerix verticillatus</i> | 9 |
| 2.3 Descripción de las plantas hospederas de <i>T. verticillatus</i> | 10 |
| <i>Schinus molle</i> | 10 |
| <i>Fabiana imbricata</i> | 11 |
| <i>Berberis montana</i> | 12 |
| 2.4 Selección de frutos de <i>T. verticillatus</i> | 12 |
| 2.5 Morfometría de frutos..... | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Colorimetría de frutos..... | 14 |
| Análisis de los espectros de reflexión | 15 |
| 2.7 Composición química de la pulpa de los frutos..... | 16 |
| 2.8 Análisis estadístico..... | 18 |
| 3. RESULTADOS..... | 20 |
| 3.1 Selección de frutos..... | 20 |
| 3.2 Patrones de reflexión y características morfológicas de los frutos. | 21 |
| 3.3 Composición de azúcares solubles en la pulpa de los frutos..... | 26 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 32 |
| 5. CONCLUSIÓN..... | 36 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 37 |
| 7. ANEXOS..... | 44 |
| Anexo 1. Trabajos anteriores en el mismo sistema | 44 |
| Anexo 2. Espectros de masa de algunos estándares de los azúcares | 46 |
| Anexo 3. Cromatogramas de los ocho estándares de azúcares | 48 |
| Anexo 4. Cromatogramas de los azúcares solubles identificados a través de GC-MS | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1 | Estructura que conecta la planta parásita con el hospedero | 2 |
| Figura 2 | Mapa de la ubicación del Santuario de la Naturaleza Yerba Loca | 8 |
| Figura 3 | Vista en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca | 9 |
| Figura 4 | Imágenes de la planta hemiparásita <i>T. verticillatus</i> | 10 |
| Figura 5 | Imágenes de la planta hospedera <i>Schinus montanus</i> | 11 |
| Figura 6 | Imágenes de la planta hospedera <i>Fabiana imbricata</i> | 11 |
| Figura 7 | Imágenes de la planta hospedera <i>Berberis montana</i> | 12 |
| Figura 8 | Estados de desarrollo del fruto de <i>T. verticillatus</i> | 13 |
| Figura 9 | Mediciones morfológicas realizadas a los frutos de <i>T. verticillatus</i> | 13 |
| Figura 10 | Patrones de reflexión a lo largo de todo el espectro de luz de los frutos de <i>T. verticillatus</i>. | 15 |
| Figura 11 | Gráficos de las variables colorimétricas y morfológicas de los frutos de <i>T. verticillatus</i> | 23 |
| Figura 12 | Cromatograma de una mezcla de tres estándares de azúcares inyectados e identificados por HPLC | 28 |
| Figura 13 | Rectas de calibración de los estándares de azúcares identificados a través de HPLC | 28 |
| Figura 14 | Cromatograma de los azúcares identificados en la pulpa de un fruto de <i>T. verticillatus</i> analizado por HPLC | 29 |
| Figura 15 | Contenido de azúcares solubles principales en los frutos de <i>T. verticillatus</i>, | 31 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|---------|--|----|
| Tabla 1 | Selección de frutos de <i>T. verticillatus</i> sobre los tres hospederos | 20 |
| Tabla 2 | Coordenadas de las variables, sobre la base de las correlaciones | 25 |
| Tabla 3 | Resultados de análisis discriminante de las variables morfométricas y colorimétricas | 26 |
| Tabla 4 | Características de los azúcares encontrados en la pulpa de los frutos de <i>T. verticillatus</i> sobre las tres especies de plantas hospederas | 30 |

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS

| | |
|-----------|---|
| Tv/Sm | <i>Tristerix verticillatus</i> sobre <i>Schinus montanus</i> |
| Tv/Fi | <i>Tristerix verticillatus</i> sobre <i>Fabiana imbricata</i> |
| Tv/Bm | <i>Tristerix verticillatus</i> sobre <i>Berberis montana</i> |
| SNYL | Santuario de la Naturaleza Yerba Loca |
| SHH | Sistema hemiparásito-hospedero |
| GC-MS | Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta presión |
| RI | Índice de Kováts |
| MSTFA | N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ACP | Análisis de componentes principales |
| AD | Análisis de discriminante |
| UV | Ultra violeta |
| Vis | Visible |
| vol | Volúmen |
| λ | Longitud de onda |
| R | Reflexión |
| msnm | Metros sobre nivel del mar |

RESUMEN

Las plantas hemiparásitas, aunque contienen clorofila y por lo tanto realizan fotosíntesis, reciben agua, nutrientes, minerales y metabolitos secundarios desde la planta hospedera. En consecuencia son de vital importancia para las plantas hemiparásitas las interacciones que establecen con su planta hospedera.

El interés del presente seminario de título es determinar los efectos del hospedero *Schinus molle*, *Fabiana imbricata* y *Berberis montana* sobre las características colorimétricas (brillo, croma y tono), morfológicas (longitud y diámetro) y químicas (composición de azúcares solubles en la pulpa) de los frutos del hemiparásito *Tristerix verticillatus* que crece sobre cada uno de ellos (Tv/Sm, Tv/Fi y Tv/Bm) en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca (SNYL).

Se colectaron frutos de *T. verticillatus* en distintos estados de desarrollo de cada sistema hemiparásito-hospedero (SHH) en el SNYL. Posteriormente se cuantificó el color de los frutos cinco estados de desarrollo predefinidos, usando un espectrofotómetro que registra el porcentaje de luz policromática reflejada en la superficie del fruto a distintas longitudes de onda en el rango de 300-700 nm, a partir del cual derivamos las tres variables de color (brillo, croma y tono). Se midió la longitud y diámetro de los frutos y se analizaron cualitativa y cuantitativamente los azúcares solubles presentes en la pulpa de los frutos en los cinco estados a través de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Tras analizar los datos de colorimetría y morfometría obtenidos a través de ANOVA de dos vías, componentes principales y análisis de discriminantes, se determinó que no es posible referirnos a los tres SHH como grupos distintos, es decir,

que la planta hospedera no afectaría el fenotipo de los frutos de *T. verticillatus*. El hospedero tampoco determina la composición ni la concentración de azúcares solubles presentes en la pulpa de los frutos de acuerdo a su estado de desarrollo.

En conclusión, las variables medidas en este trabajo no se verían afectadas por el hospedero que *T. verticillatus* parasita en el SNYL.

ABSTRACT

Hemiparasitic plants, although they contain chlorophyll and perform photosynthesis, receive water, nutrients, minerals and secondary metabolites from the host plant. Consequently, the interactions they establish with their host plant are of vital importance to the hemiparasitic plant.

The focus of this seminar is to determine the effects of the host on the colorimetric (brightness, chroma and hue), morphological (length and diameter) and chemical (composition of soluble sugar in the pulp) characteristics of the fruits of the hemiparasite *Tristerix verticillatus* growing on each of them (Tv/Sm, Tv/Fi and Tv/Bm) in the Yerba Loca Natural Sanctuary (SNYL).

Fruits of *T. verticillatus* at different stages of development from each hemiparasitic-host system (SHH) were collected in the SNYL. Subsequently, the color of the fruits in five stages of development was quantified using a spectrophotometer which records the percentage of the reflected polychromatic light from the surface of the fruit at different wavelengths in the range of 300-700 nm, from which we derived the three color variables (brightness, chroma and hue). We measured the length and diameter of the fruit and we analyzed qualitatively and quantitatively the soluble sugars present in the pulp of the fruits using high pressure liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

After analyzing the colorimetry and morphometry data obtained through two-way ANOVA, principal component and discriminant analysis, we determined that the three SHH cannot be referred to as distinct groups; the host plant does not affect the phenotype of the fruits of *T. verticillatus*. The host determines neither the composition

nor concentration of soluble sugars present in the pulp of the fruit according to their stage of development.

In conclusion, the variables determined in this work are not affected by the host that *T. verticillatus* is parasitizing in SNYL.

1. INTRODUCCION

El parasitismo es un tipo de relación biológica en la que un organismo (el parásito) satisface sus necesidades vitales residiendo permanente o temporalmente en un organismo de otra especie (el hospedero) (Brooks y McLennan 1993, Rohde 2001, Sorci y Garnier 2008). El parásito se ve beneficiado con esta interacción, mientras que el hospedero es perjudicado por ella. El parasitismo implica una suerte de coevolución por parte de los integrantes; por parte del hospedero hay adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento tendientes a evitar o limitar el ataque del parásito, mientras que el parásito desarrolla contra adaptaciones que contrarrestan los sistemas de defensa desarrollados por el hospedero (Sorci y Garnier 2008).

Las plantas parásitas y hemiparásitas se adhieren a su hospedero a través del haustorio, órgano de fijación y absorción, que establece el contacto con la planta hospedera (Fig. 1a). El haustorio penetra el tejido leñoso de ésta, estableciendo conexiones con el tejido vascular, por lo general en el xilema (Fig. 1b) (Mathiasen y col. 2008). El lugar de unión parásito-hospedero determina si la planta es parásita de raíz o de rama (aérea), mientras que la presencia o ausencia de cloroplastos funcionales en la planta parásita determina si es hemiparásita u holoparásita, respectivamente (Press y Phoenix 2005, Queded 2008). Una vez establecida la semilla sobre una rama de la planta hospedera, comienza la elongación del haustorio hasta que el disco haustorial (estructura en el extremo haustorial con forma de ventosa con sustancias químicas viscosas que le permiten adherirse a la corteza y digerirla) hace contacto con una rama de la planta hospedera. Una vez que se logra una conexión, la planta hemiparásita desarrolla los tallos aéreos (primordios foliares) y comienza a fotosintetizar (Fig. 1a) (Aukema 2003). La conexión haustorial es la principal vía de conexión parásito-

hospedero por la cual la planta parásita obtiene principalmente agua, pero también nutrientes, minerales y metabolitos secundarios desde el hospedero (Cabezas 2007, Mathiasen y col. 2008, Troncoso y col. 2010).

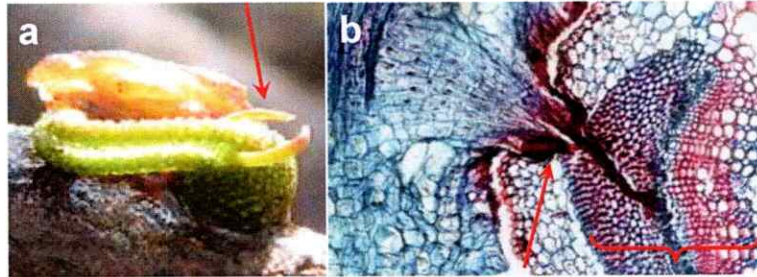


Figura 1. Estructura que conecta la planta parásita con el hospedero. (a) Contacto del haustorio con el hospedero y desarrollo de los primordios foliares (flecha roja); (b) sección microscópica del haustorio (flecha roja) penetrando el tejido vascular del hospedero (corchete rojo) (fotografía de P.N. Sharma).

Gran parte de las especies del orden Santalales son nombrados comúnmente muérdagos (Mathiasen y col. 2008). La familia Loranthaceae es la que tiene el mayor número de géneros de muérdagos, que están distribuidos por los cinco continentes (Norton y Carpenter 1998, Watson 2001). Los muérdagos son plantas hemiparásitas aéreas, generalmente arbustivas; son también hemiparásitas obligadas, ya que obtienen todos los minerales y agua a través de la planta hospedera (Norton y Carpenter 1998, Watson 2001).

El éxito de las plantas depende en gran medida de la calidad de las interacciones ecológicas que ellas establezcan. Por ejemplo, con herbívoros que consumen sus tejidos fotosintetizadores o reproductivos; con polinizadores, que transportan polen entre individuos; con dispersores de semillas, que se alimentan de sus frutos y luego defecan las semillas permitiendo su germinación.

Ya que las plantas hemiparásitas pueden recibir nutrientes y metabolitos secundarios característicos de su planta hospedera, ésta puede ejercer una influencia

química sobre las plantas hemiparásitas que posteriormente afecte sus interacciones ecológicas bióticas. Por ejemplo, se ha descrito para la planta hemiparásita *Castilleja miniata* (Scrophulariaceae) que el hospedero influye sobre las interacciones entre el hemiparásito y sus herbívoros y polinizadores. Es así como tras adquirir metabolitos secundarios de su hospedero *Lupinus texensis* aumenta la resistencia hacia herbívoros y también aumentan las visitas de polinizadores; más aún, dependiendo del hospedero que *C. miniata* parasite hay una mayor o menor producción de semillas (Adler 2003).

En el caso de la planta hemiparásita *Tristerix verticillatus* (Loranthaceae), que en Santuario de la Naturaleza Yerba Loca cerca de Santiago, Chile (SNYL) se encuentra parasitando a tres especies de hospedero, se ha informado que la composición y abundancia de los compuestos volátiles emitidos varían entre los tres sistemas hemiparásito-hospedero (SHH) y que estas características están correlacionadas con la diversidad de polinizadores de *T. verticillatus* (Cabezas 2007; Troncoso y col. 2010) (Anexo 1).

Estos antecedentes llevan a pensar que los organismos que interactúan con una planta parásita pueden discriminar entre parásitos asociados a distintos tipos de hospedero. La calidad de un hospedero podría estar relacionada con su disponibilidad de nitrógeno, el acceso a su sistema vascular o la efectividad de sus sistemas de defensa.

Las semillas de los muérdagos son mayoritariamente dispersadas por aves (Aukema 2003, Aukema y Martínez del Río 2002, Watson 2001). Estas aves frugívoras seleccionan el fruto, desprenden el exocarpo, digieren la pulpa y luego defecan la semilla recubierta por la viscina (tejido viscoso que recubre la semilla), lo que permite su adhesión al potencial hospedero y eventualmente la germinación y establecimiento de nuevos individuos (Aukema y Aizen 2005, Mathiasen y col. 2008, Kuijt 1988). Los

frutos de numerosas especies de muérdagos muestran atributos claros para atraer a sus dispersores: son dulces y de colores llamativos. La composición de la pulpa varía entre las distintas especies de muérdagos, pero la mayoría tiene un alto contenido de carbohidratos solubles, que varía entre un 40 y 60% peso seco (Watson 2001). El contenido de lípidos y proteínas es menor, pero se han registrado valores de hasta 35 y 22%, respectivamente (Watson 2001).

Estos antecedentes sugieren la posibilidad de efectos del hospedero sobre características de los frutos de *T. verticillatus* tanto visuales (color y tamaño) como energéticas (composición y concentración de azúcares en la pulpa) que pueden afectar sus interacción con frugívoros dispersores de semillas.

Características visuales de los frutos

El color en los frutos cumple con la función de atraer a los dispersores de semillas y les permite identificar el fruto y diferenciar un fruto maduro de uno inmaduro (Schaefer y col. 2006, Wheelwright 1985); luego del consumo, el dispersor aprende a asociarlo con la calidad de la recompensa (Melendez-Ackerman y col. 1997). Las aves son frecuentemente dispersores de semillas; su gran capacidad de reconocimiento de frutos palatables estaría asociado a la agudeza y alto grado de desarrollo de su sentido de la vista. Las aves tienen un amplio rango de visión (315-700 nm), y son capaces de distinguir una gran variación cromática (Cuthill 2006, Mäntylä y col. 2008). Esto se debe a que poseen gotas de aceite que filtran la luz al entrar a los conos, mejorando la visión, y cuatro tipos celulares de conos en la retina por lo que tienen una visión tetracromática donde cada color se compone de rojo, verde, azul y ultravioleta (UV: 320-400 nm) (Cuthill 2006).

El tamaño del fruto es una variable que a menudo aparece en los estudios sobre diferencias en habilidades de alimentación y preferencias entre diferentes gremios de organismos frugívoros. En aves, la masa corporal y el tamaño del pico están positivamente relacionados con el tamaño o el rango de tamaños de frutos consumidos (Lord 2004).

Composición y concentración de azúcares en la pulpa del fruto

La composición y concentración de azúcares presentes en la pulpa de los frutos difiere entre distintas especies de plantas. Los azúcares más comunes son glucosa, fructosa y sacarosa (Baker y col. 1998, Lotz y Schondube 2006, Martínez del Río 1992).

Existe una relación entre la clase de dispersor de semillas y la naturaleza de los azúcares que ellos buscan (Baker y col. 1998, Lotz y Schondube 2006, Martínez del Río 1992). Por ejemplo, la pulpa de los frutos consumidos por murciélagos (Megachiroptera) es rica en sacarosa, mientras que los frutos consumidos por algunas aves paserinas (Mimidae, Turdidae y Sturnidae) tienen una baja concentración de sacarosa pero alta concentración de hexosas (glucosa y fructosa) (Baker y col. 1998, Lotz y Schondube 2006, Martínez del Río 1992). El rechazo de ciertos frutos podría deberse a una incapacidad para asimilar algunos azúcares. Por ejemplo, existen especies de aves que carecen de la enzima sacarasa; en ellas, el azúcar no es absorbido y se acumula en el intestino, generando una diarrea osmótica y un comportamiento de rechazo hacia alimentos que contengan sacarosa (Lotz y Schondube 2006, Martínez del Río 1992). No ocurre lo mismo con las hexosas glucosa y fructosa, que son asimiladas eficientemente por las aves frugívoras (Lotz y Schondube 2006).

1.1 Presentación del problema

Tristerix verticillatus es una planta hemiparásita que se encuentra parasitando simpátricamente tres especies de plantas hospederas en el SNYL (Villa Paulina). Se ha demostrado que los compuestos volátiles emitidos por el muérdago varían entre los distintos SHH y que las diferencias están correlacionadas con la diversidad de polinizadores de *T. verticillatus* (Cabezas 2007; Troncoso y col. 2010). Estos antecedentes sugieren que características de los frutos de *T. verticillatus*, tales como visuales (color y tamaño) y energéticas (composición y concentración de azúcares en la pulpa), varían en función del SHH. En consecuencia, hemos realizado un estudio morfológico, colorimétrico y químico de los frutos de *T. verticillatus* del SNYL.

1.2 Objetivo general

Analizar características morfológicas, colorimétricas y químicas de los frutos de la planta hemiparásita *T. verticillatus* en el SNYL en cada uno de los tres SHH.

1.3 Objetivos específicos

- a. Determinar las características morfológicas y colorimétricas y la composición química de los azúcares solubles en la pulpa de los frutos de la planta hemiparásita *T. verticillatus* en cada uno de los tres SHH en el SNYL.
- b. Determinar eventuales correlaciones entre las características fenotípicas de los frutos de *T. verticillatus* sobre los tres SHH en el SNYL.

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

El SNYL es un área protegida de 11.575 hectáreas con vegetación principalmente del tipo matorral esclerófilo y bosque esclerófilo montano, ubicada en la cordillera de los Andes a 25 km al noroeste de Santiago en la comuna de Lo Barnechea (33° 10' - 33° 22' S y 70° 13' - 70° 24' O) (Fig. 2).

Se estudió el sistema constituido por la planta hemiparásita, *T. verticillatus*, cuando parasita en simpatria tres especies de hospederos en un área de aproximadamente 15 hectáreas en el sector de Villa Paulina (1900 a 2100 msnm), en el SNYL (Fig. 3). En este sector la temperatura media anual es de 14,4°C con escasa precipitación, que en invierno se presenta en forma de nieve.

En el SNYL, los frutos de *T. verticillatus* comienzan su desarrollo en mayo y maduran entre los meses de noviembre y marzo del siguiente año, mientras que los frutos de las plantas hospederas maduran en otoño e invierno.

SANTUARIO DE LA NATURALEZA YERBA LOCA
Región Metropolitana - Chile

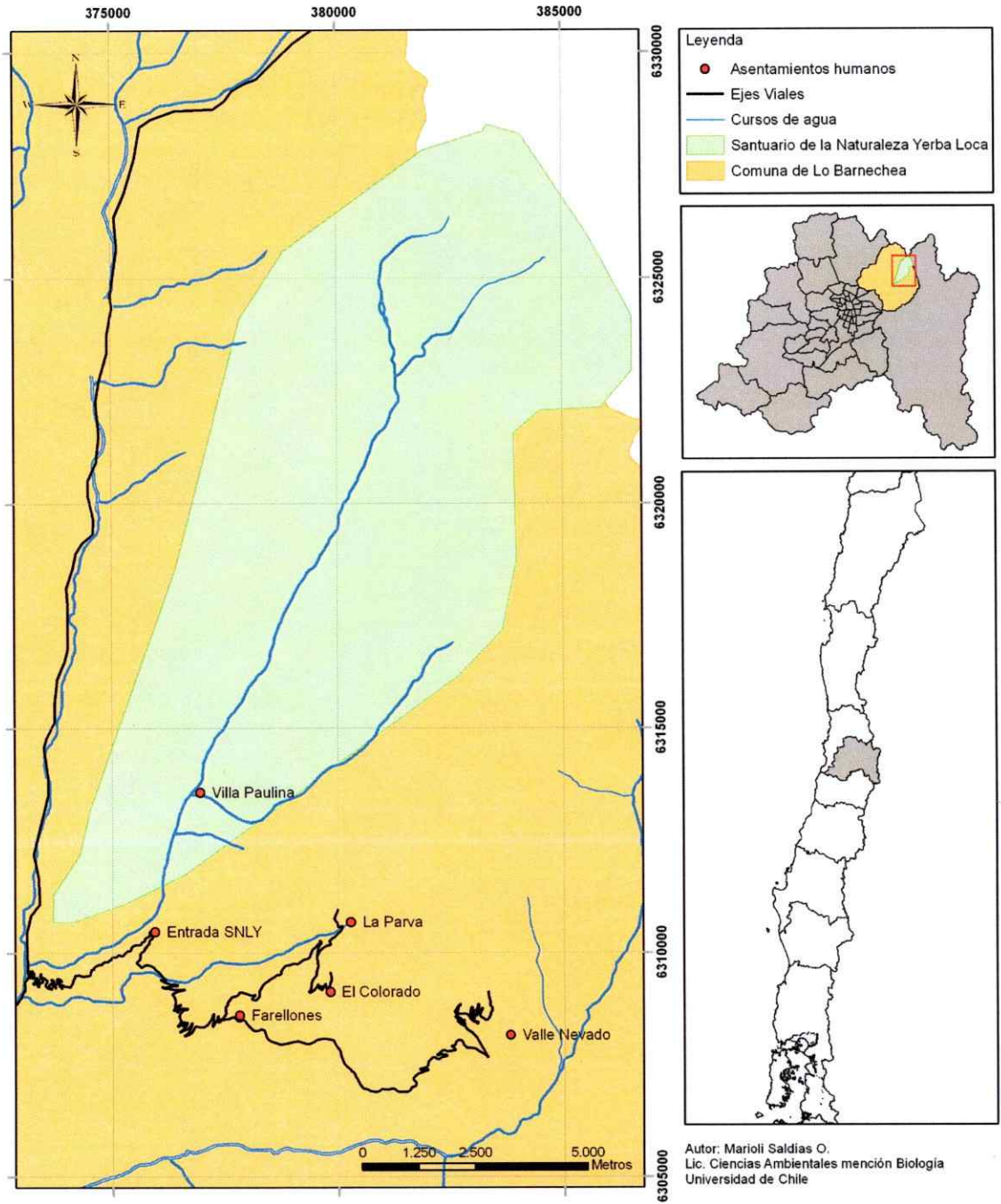


Figura 2. Mapa de la ubicación del Santuario de la Naturaleza Yerba Loca.



Figura 3. Vista en el Santuario de la Naturaleza Yerba Loca.

2.2 Descripción de la planta hemiparásita *Tristerix verticillatus*

Tristerix verticillatus es una planta hemiparásita perteneciente a la familia Loranthaceae. Conocida como “quintral del molle”, se encuentra ampliamente distribuida presente en el sur de Bolivia, noroeste de Argentina y centro-sur de Chile (Amico 2007, Kuijt 1988). El género suele tener un amplio rango de plantas hospederas aunque *T. verticillatus* se encuentra más frecuentemente sobre el género *Schinus* (Anacardiaceae) (Amico 2007, Kuijt 1988).

Tristerix verticillatus tiene flores pentámeras de forma alargada y de color rojo muy llamativo y característico del género; se disponen en inflorescencias y producen un néctar rico en azúcares que atrae a picaflores e insectos (Mathiasen y col. 2008) (Fig. 4a, b). La floración en la zona central de Chile ocurre entre los meses de marzo y mayo. El fruto es una baya de forma ovalada, de color naranja bastante intenso (Fig. 4c); contiene una semilla cubierta por un tejido viscoso llamado viscina (Fig. 4d). Los

frutos se encuentran en racimos, siendo el número de frutos por racimo irregular. Los frutos maduros se encuentran entre los meses de noviembre y marzo.



Figura 4. Imágenes de la planta hemiparásita *T. verticillatus*. (a) Planta hemiparásita; (b) Inflorescencia; (c) Infrutescencia con frutos maduros; (d) semilla del fruto cubierta por viscina.

En el Santuario de la Naturaleza de Yerba Loca existe una población de *T. verticillatus* que parasita simpátricamente tres especies de hospedero, *Schinus montanus* (Anacardiaceae), *Fabiana imbricata* (Solanaceae) y *Berberis montana* (Berberidaceae), con los que constituye tres SHH (Tv/Sm, Tv/Fi y Tv/Bm, respectivamente).

2.3 Descripción de las plantas hospederas de *T. verticillatus*

Schinus montanus (litrecillo) es un arbusto nativo siempreverde de hasta 4 m de altura, que se encuentra en la zona central de Chile (V y Región Metropolitana) y en Argentina. Es de hojas simples y gruesas, su flor es pequeña, de 2 - 4 cm de longitud, de color amarillo y florece en racimos durante la primavera. El fruto es una baya de color oscuro (Enciclopedia de la Flora Chilena 2010, Hoffman 1998) (Fig. 5).



Figura 5. Imágenes de la planta hospedera *Schinus molle*. (a) Arbusto completo; (b) fruto.

Fabiana imbricata (pichiromero) es un arbusto siempre verde de hasta 3 m de altura, nativo de Chile y Argentina, que se encuentra desde Coquimbo hasta la Patagonia (IV a XII región). Tiene un gran número de pequeñas hojas imbricadas a lo largo de los tallos. Las flores son solitarias, de aproximadamente 1 cm de longitud, forma tubular, con una coloración que va desde el blanco al lila suave y se encuentran en el extremo de la rama semejjando un racimo. La floración ocurre durante la primavera entre los meses de noviembre y diciembre. Los frutos son una cápsula de color café aproximadamente de 0,5 cm de longitud; las semillas maduran entre verano y otoño (Enciclopedia de la Flora Chilena 2010, Hoffman 1998, Riedemann y Aldunate 2001 (Fig. 6).



Figura 6. Imágenes de la planta hospedera *Fabiana imbricata*. (a) Arbusto completo; (b) fruto.

Berberis montana (palo amarillo) es un arbusto nativo de hasta 1 m de altura, que se encuentra entre la V y X región de Chile, así como también en Argentina en los alrededores del lago Nahuelhuapi. Sus hojas son pequeñas y membranosas, tiene espinas tripartitas, las flores son solitarias de color amarillo anaranjado de 3,5 - 6 mm de longitud, y florecen en la zona central de Chile entre los meses de octubre y diciembre. El fruto es un baya comestible de color morado oscuro; en el SNYL comienza a madurar en diciembre (Enciclopedia de la Flora Chilena 2010, Hoffman 1998) (Fig. 7).

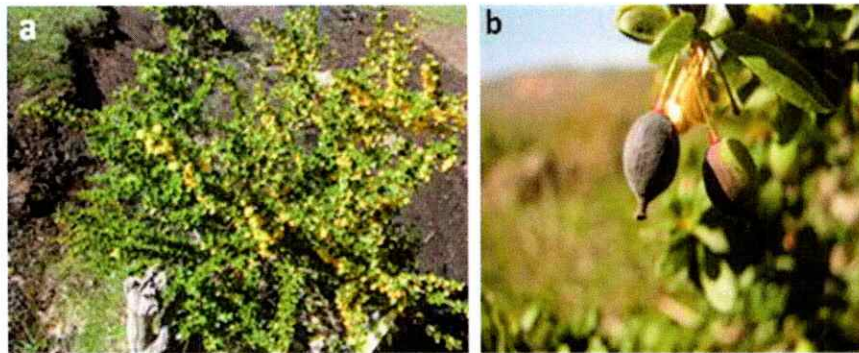


Figura 7. Imágenes de la planta hospedera *Berberis montana*. (a) Arbusto completo; (b) fruto.

2.4 Selección de frutos de *T. verticillatus*

Durante los meses de noviembre y diciembre de 2009, enero y diciembre de 2010, y enero del 2011 se seleccionaron frutos de *T. verticillatus* de cada sistema hemiparásito-hospedero. Se recogieron frutos en distintos estados de desarrollo utilizando tijeras para cortar parte del tallo, y se transportaron al laboratorio en Santiago dentro de cajas de polipropileno. Se definió una escala de madurez, entre el Estado 1

(frutos más inmaduros, pequeños, coloración verde con sector rojizo) hasta el Estado 5 (frutos maduros, hinchados, coloración amarillo-naranja) (Fig. 8).

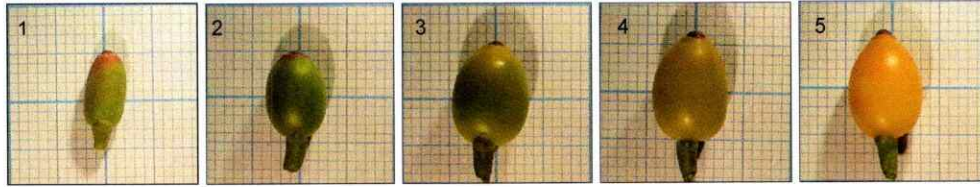


Figura 8. Estados de desarrollo del fruto de *T. verticillatus*.

Las mediciones de longitud, diámetro, peso y naturaleza de la luz policromática reflejada de los frutos fueron realizadas durante el mismo día de colección. La determinación de la composición de azúcares solubles fue realizada posteriormente.

2.5 Morfometría de frutos

La longitud y diámetro del fruto fueron medidos computacionalmente mediante la medición de fotografías digitales a través del programa ImageJ. Los frutos se fotografiaron contra una superficie de papel milimetrado (Fig. 9) y luego de extraerles el pecíolo, se pesaron (peso húmedo) en una balanza digital (± 0.1 mg, Precisa 262SMA-FR).

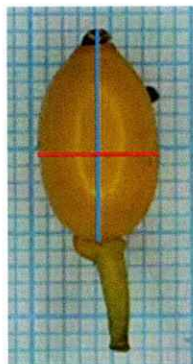


Figura 9. Mediciones morfológicas realizadas a los frutos de *T. verticillatus*. Línea azul: medición longitudinal del fruto; Línea roja: medición transversal del fruto.

2.6 Colorimetría de frutos

Se cuantificó el color de los frutos de *T. verticillatus* mediante un espectrofotómetro de fibra óptica Ocean Optics USB4000 que registra el porcentaje de luz policromática reflejada en la superficie del fruto a distintas longitudes de onda en el rango 300-700 nm. Un espectro de referencia de un cuerpo negro y un estándar blanco se tomaron aproximadamente cada 15 minutos durante las mediciones de las muestras para comprobar y corregir variables instrumentales. Las muestras fueron iluminadas con una fuente de luz de halógeno y deuterio conducida por una fibra óptica de 100 μm de diámetro y 2 m de largo posicionada a 2 mm de cada muestra utilizando un micromanipulador. El ángulo de incidencia del haz de luz en cada medición fue de 90°. Las mediciones se realizaron en un cuarto oscuro y los frutos se dispusieron sobre un trozo de esponja negra. Se promediaron tres mediciones de cada fruto y sobre estos resultados se realizaron los análisis correspondientes.

Los espectros de reflexión fueron utilizados para derivar, usando el programa Spectra Suite, las siguientes variables del color en el intervalo de 300-700 nm correspondiente al rango de sensibilidad de las aves (Endler 1990, Van Dongen 2007): (1) brillo total (intensidad del espectro), calculado como el área bajo el espectro de reflexión entre 300 y 700 nm ($R_{300-700}$); (2) tono (ubicación espectral o color), calculado como el promedio entre la longitud de onda (λ) de las reflexiones mínima (λR_{\min}) y máxima (λR_{\max}) correspondientes al pico máximo ($\lambda(R_{50})$); (3) croma (saturación del espectro), calculada dividiendo la reflexión de las λ donde el color naranja refleja mayormente (550-650 nm) por la reflexión total ($R_{550-650}/R_{\text{Total}}$), tal como describen Dowling y Mulder (2006); (4) croma UV, calculada como la reflexión en el intervalo de 300-400 nm, en relación a la reflexión total ($R_{300-400}/R_{\text{Total}}$); (5) ubicación espectral del UV o bien Reflexión máxima en el intervalo UV ($\lambda(R_{\max \text{ UV}})$) (Mougeot y col. 2007). La

ubicación espectral son medidas que corresponden a la percepción humana de tono. El brillo total, croma UV y croma Vis se relacionan con la cantidad de luz incidente que es reflejada por los frutos a través de todo el espectro, en el UV y en el Visible, respectivamente. La Figura 10 muestra los patrones de reflexión utilizados en este estudio.

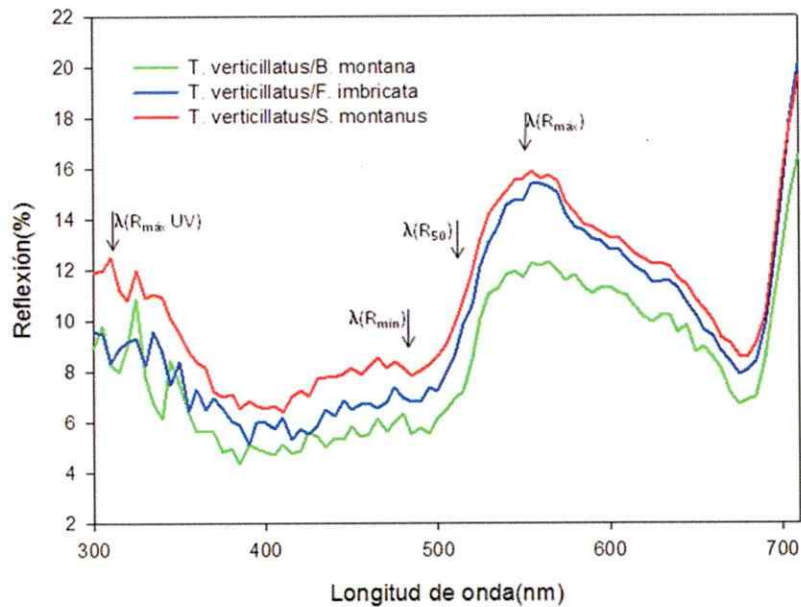


Figura 10. Patrones de reflexión a lo largo de todo el espectro de luz de los frutos de *T. verticillatus*.

Análisis de los espectros de reflexión

Cada espectro contenía 3648 valores de reflexión desde 177,51 hasta 889,66 nm a intervalos de 0,22 nm. El rango de longitud de onda utilizado en este trabajo contempla el espectro UV cercano desde 300 nm hasta 400 nm y el espectro visible hasta 700 nm, de forma que los valores de reflexión se redujeron a 2065. A dichos valores se les determinó la mediana a intervalos de 5 nm desde 300 nm hasta 710 nm.

Ya que en los espectros era posible encontrar valores extremos se utilizó la mediana, que en este caso es menos sensible que la media. Luego se determinó el promedio de las reflexiones en cada longitud de onda de los espectros ordenados por estado (desde el estado 1 hasta el estado 5) y por SHH.

2.7 Composición química de la pulpa de los frutos

Se analizaron cualitativa y cuantitativamente los azúcares solubles presentes en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus* colectados durante los meses de diciembre y enero de 2011. Los azúcares solubles fueron obtenidos tras rasgar la cáscara de los frutos, adicionarles 1 ml de agua destilada a la pulpa expuesta en un tubo Eppendorf, sonicar durante una hora y mantenerlos durante 24 h a 5 °C. Posteriormente, las suspensiones fueron agitadas durante dos minutos en un agitador (Super Mixer® II) y sonicadas durante una hora para luego remover mecánicamente los restos de los frutos. Se centrifugaron los extractos durante 10 minutos a 10.000 rpm y se extrajo mecánicamente el sobrenadante de cada muestra, que luego se filtraron utilizando una membrana de celulosa Millipore® (poros de 0,45 µm) para obtener una solución con los azúcares solubles.

Es necesario derivatizar las muestras de azúcares antes de inyectarlas en el cromatógrafo de gases (en este proceso se aumenta la volatilidad de la molécula transformando los grupos OH en OR, donde R es un radical sililado). Previo a la derivatización, se obtuvieron muestras anhidras depositando 5 µl de muestra en un vial, calentando a 80°C y luego inyectando directamente en el vial un flujo de nitrógeno seco. La derivatización se obtuvo adicionando a la muestra anhidra 125 µl de N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (Heil y col. 2005). Las muestras se diluyeron con 700 µl de diclorometano, se agitaron durante 1 min y se mantuvieron a 50° C por

24 h. Azúcares comerciales (arabinosa, xilosa, fructosa, galactosa, glucosa, manosa, ramnosa y sacarosa; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) se utilizaron como estándares, se trataron de la misma forma que las muestras de azúcares de la pulpa y se inyectaron 2 µl de cada solución en el cromatógrafo de gases (100 mg ml⁻¹).

La identidad de los azúcares presentes en la pulpa fue determinada por cromatografía de gases (Hewlett Packard modelo 5890) acoplada a espectrometría de masas (Hewlett Packard modelo 5972) (GC-MS) utilizando una columna SDB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Alltech, Unterhaching, Alemania). El gas portador fue helio con un flujo de 1,25 ml min⁻¹. La temperatura del inyector fue 220° C y la del detector de 280° C. Los azúcares fueron separados con el siguiente programa: temperatura inicial de 120° C durante 2 min, luego fue aumentando a 7° C min⁻¹ hasta 280° C, manteniéndose en esta temperatura durante 20 min. El tiempo de análisis fue de 41 min para cada muestra.

Los azúcares solubles presentes en la pulpa de los frutos se identificaron por comparación de los espectros de masas con los de la base de datos NIST 98 (National Institute of Standards and Technology), AMDIS 32 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) y por los espectros de masas de los estándares comerciales inyectados. Adicionalmente, se calculó el índice de Kovats de cada azúcar identificado y se comparó con el índice de Kovats encontrado en la literatura para el mismo tipo de columna cromatográfica.

El índice de Kovats para cada tipo de azúcar se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$RI_x = \frac{100 (n + (\log (\bar{t}_x - t_m) - \log (\bar{t}_n - t_m)))}{(\log (\bar{t}_{n+1} - t_m) - \log (\bar{t}_n - t_m))}$$

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

La cuantificación de azúcares se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Shimadzu SIL-10A) acoplado a un detector de índice de refracción (Shimadzu RID-10A) y utilizando una columna Restek (Pinnacle II Amino 5 μm de 150 x 4,6 mm). El análisis fue isocrático con un flujo de 1 ml min^{-1} de solvente constituido por acetonitrilo : agua (85:15 vol/vol) a una presión cercana a los 25-26 psi y a una temperatura constante de 35 °C. Se inyectaron 10 μl de muestra y cada análisis duró 17 min. A través del programa Shimadzu LCsolution Analysis Report se obtuvo los informes de cada muestra y estándares inyectados.

La concentración de azúcares en cada muestra fue extrapolada a partir de curvas de calibración obtenidas a partir de la inyección de estándares comerciales de los azúcares, que previamente habían sido identificados por GC-MS. El rango de concentración fue de 0,5 - 42 mg ml^{-1} .

2.8 Análisis estadístico

Las variables de colorimetría y morfometría se compararon a través de un análisis de varianza de dos vías con el método de Holm-Sidak para comparaciones múltiples *a posteriori*, siendo los factores de variación la planta hospedera, con tres niveles de variación (Tv/Sm, Tv/Fi y Tv/Bm), y el estado de desarrollo del fruto, con cinco niveles que corresponden a los cinco estados de desarrollo de los frutos. Cuando las variables no cumplieron con las condiciones de normalidad y homocedasticidad, los

datos fueron transformados a rangos y posteriormente se prosiguió con el análisis de varianza paramétrico de dos vías.

Las características morfológicas (largo y diámetro) y colorimétricas (brillo, tono y croma) de los frutos fueron sometidas a un análisis de componentes principales (ACP) para determinar el grado de correlación entre variables y posteriormente a un análisis discriminante (AD) para determinar si el conjunto de variables permite separar los frutos en relación al sistema parásito-hospedero de procedencia.

La concentración de azúcares solubles de frutos en distintos estados de desarrollo provenientes de distintos SHH fue analizada a través de ANOVA de dos vías, siendo los factores de variación la planta hospedera y el estado de desarrollo del fruto, seguido por un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de Holm-Sidak.

3. RESULTADOS

3.1 Selección de frutos

Para los análisis colorimétricos y morfológicos se seleccionó un total de 457 (Tabla 1) frutos de *T. verticillatus* de los distintos SHH durante los meses de noviembre y diciembre de 2009 y enero de 2010. Para el análisis químico se seleccionaron 150 frutos (10 frutos por cada estado de desarrollo para cada SHH) durante los meses de diciembre de 2010 y enero de 2011.

Tabla 1. Selección de frutos de *T. verticillatus* sobre los tres hospederos.

| | <i>Tristerix verticillatus/ Schinus montanus</i> | | | | | <i>Tristerix verticillatus/ Fabiana imbricata</i> | | | | | <i>Tristerix verticillatus/ Berberis montana</i> | | | | | N° total de frutos |
|----------------------------------|--|----|-----|----|----|---|----|-----|----|----|--|----|-----|----|----|--------------------------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | |
| Noviembre 2009 | 12 | 12 | 11 | 10 | 5 | 9 | 11 | 11 | 8 | 6 | 5 | 6 | 6 | 3 | 0 | 115 |
| Diciembre 2010 | 11 | 16 | 13 | 7 | 7 | 14 | 15 | 16 | 9 | 7 | 3 | 21 | 24 | 3 | 3 | 169 |
| Enero 2011 | 0 | 15 | 11 | 14 | 9 | 5 | 11 | 22 | 11 | 12 | 0 | 3 | 29 | 9 | 22 | 173 |
| N° total de frutos por SHH | | | 153 | | | | | 167 | | | | | 137 | | | 457 |

3.2 Patrones de reflexión y características morfológicas de los frutos

En la figura 11 se observa los valores de las variables estudiadas a lo largo del desarrollo de los frutos y entre los SHH. El análisis de la luz reflejada por los frutos y el análisis morfológico de los frutos de *T. verticillatus* sobre cada uno de sus hospederos en el SNYL reveló que hasta los estados más avanzados de desarrollo no se observan diferencias significativas entre las variables estudiadas, es decir, solo a partir del estado cuatro de desarrollo se encuentran diferencias de las variables entre SHH.

El Brillo de los frutos aumenta a medida que madura el fruto ($F_{\text{estado}} = 6,191$; $P < 0,001$), siendo el cambio en brillo más pronunciado entre el paso de estado 1 a 3 (comparaciones múltiples *a posteriori*). En los tres SHH se observa un patrón semejante de variación en el brillo del fruto a lo largo de su desarrollo, y no existen diferencias entre los SHH ($F = 2,759$; $P = 0,064$).

El CromauV, aumenta a lo largo del desarrollo del fruto en los tres sistemas SHH ($F = 16,336$; $P < 0,001$), y el incremento en CromauV es más pronunciado en Tv/Sm y Tv/Fi en comparación a Tv/Bm ($F = 5,968$; $P = 0,003$).

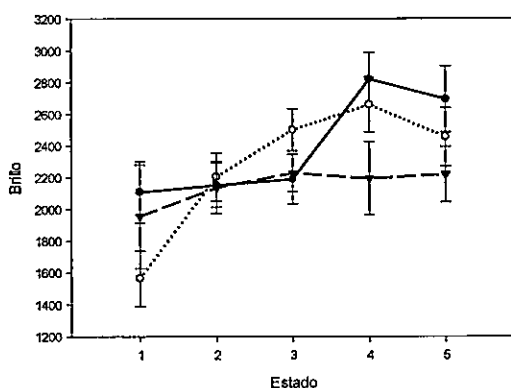
El Cromav, en contraste con el CromauV, disminuye a lo largo del desarrollo del fruto ($F = 23,225$; $P < 0,001$), y el patrón de variación difiere significativamente entre los sistemas Tv/Sm y Tv/Bm ($F = 5,329$; $P = 0,005$).

No se observan diferencias de la variable RmaxUV a lo largo del desarrollo de los frutos de los tres SHH ($F = 1,064$; $P = 0,374$) ni tampoco entre los distintos SHH ($F = 1,041$; $P = 0,354$).

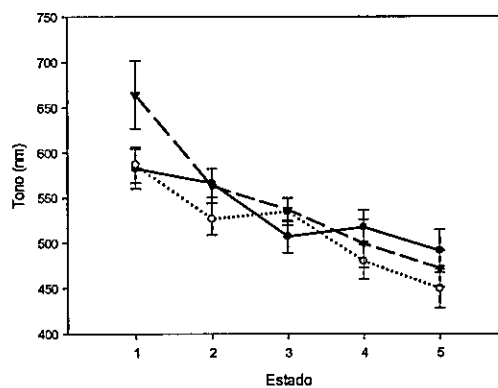
El tono o color de los frutos varía en relación al hospedero que parasita ($F = 3,994$; $P = 0,019$), y también varía entre los estados de desarrollo de los frutos ($F = 12,462$; $P < 0,001$).

Las variables peso, longitud y diámetro incrementan significativamente a medida que maduran los frutos ($F = 125,005$, $F = 89,605$, $F = 99,596$, respectivamente; $P_{\text{todos}} < 0,001$). Este patrón de variación difiere entre TS y TF para la variable peso ($F = 4,279$; $P = 0,015$); la variable longitud presenta un patrón de variación muy similar entre los tres SHH ($F = 2,209$; $P = 0,111$), y TF difiere de TS y TB para la variable diámetro ($F = 4,408$; $P = 0,013$) a lo largo de los estados de desarrollo.

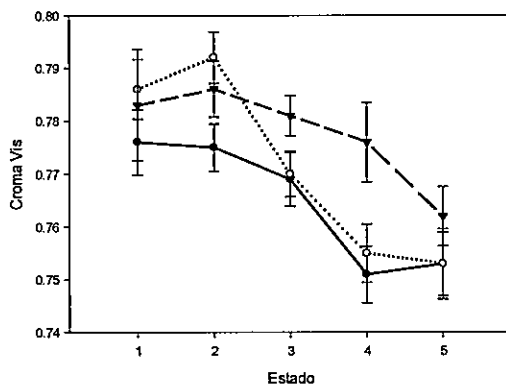
Brillo de los frutos de *T. verticillatus*



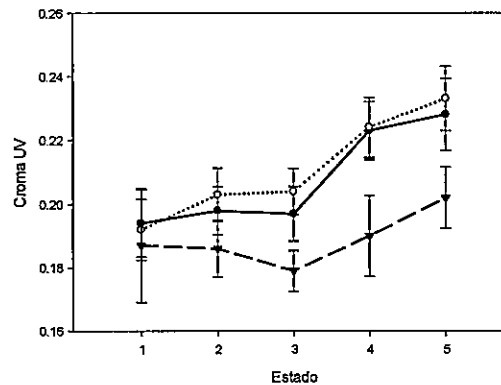
Tono de los frutos de *T. verticillatus*



Croma Vis en frutos de *T. verticillatus*



Croma UV en los frutos de *T. verticillatus*



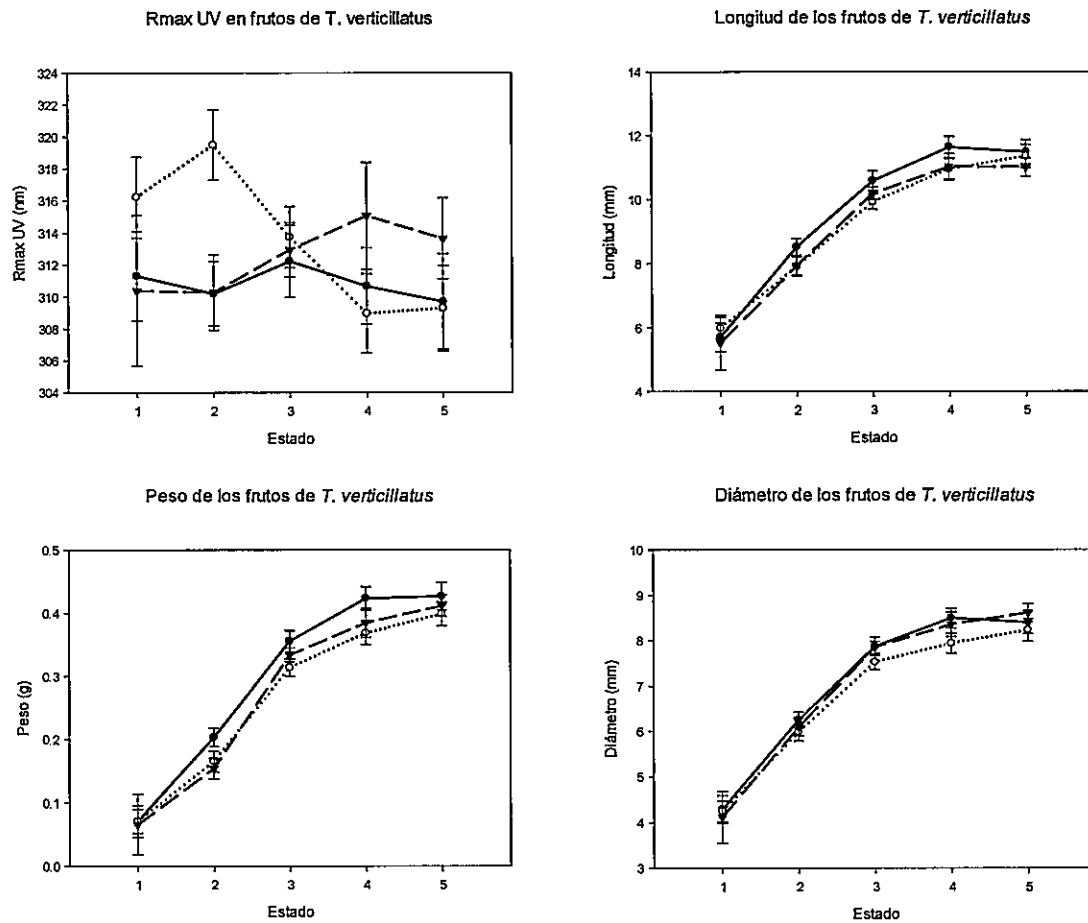


Figura 11. Gráficos de las variables colorimétricas y morfológicas de los frutos de *T. verticillatus* donde se aprecian las diferencias entre SHH y entre los estados de desarrollo de los frutos, como también la presencia o ausencia de interacciones entre los factores independientes. Las líneas sólidas corresponden al sistema Tv/Sm, las líneas punteadas al sistema Tv/Fi y los guiones largos al sistema Tv/Bm.

Por otro lado, se realizó un análisis de componentes principales sobre las variables morfológicas y colorimétricas de los frutos de la planta hemiparásita durante la maduración del fruto, obteniéndose dos factores por cada estado (Tabla 2), los cuales representan en cada estado de desarrollo sobre el 99,9 % de la varianza en los datos. Cada factor está correlacionado con sólo una variable. Cargas mayores a 0,70 para el primer factor (F_1) en todos los estados de desarrollo revelan que la variable que más contribuye a dicho factor es la variable colorimétrica Brillo. De la misma forma el

segundo factor (F_2) está elevadamente correlacionado con variables colorimétricas (Tono) durante todos los estados de desarrollo. Un completo informe de los factores y cargas para todas las variables se muestra en la Tabla 2.

El análisis discriminante permitió la detección de las variables que separan los tres SHH. En este caso sólo se puede discriminar entre sistemas en el primer estado de desarrollo de los frutos basándose en el componente principal 1 (CP1) y 2 (CP2) ($F = 3,59$, $P = 0,04$), es decir, se puede discriminar basándose en las variables colorimétricas Brillo y Tono (Tabla 3), mientras que en los estado de desarrollo más avanzados no es posible discriminar entre los tres SHH basándose en las variables medidas en este estudio, lo que se evidencia con los valores de P y la disminución en el porcentaje de precisión en la discriminación entre SHH a medida que se desarrollan los frutos (Tabla 3).

Tabla 2. Coordenadas de las variables, sobre la base de las correlaciones. Cargas factoriales de cada una de las variables medidas a partir de los factores extraídos de los datos de las variables obtenidas a partir de los frutos de *T. verticillatus* sobre las tres plantas hospederas. Coeficientes de correlación cuyo módulo es > 0,70 se muestran en cursiva.

| Variable | Estado 1 | | Estado 2 | | Estado 3 | | Estado 4 | | Estado 5 | |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ | F ₁ | F ₂ |
| Brillo | 0,99 | -0,02 | 1,00 | -0,00 | 1,00 | -0,00 | 1,00 | -0,00 | 1,00 | -0,00 |
| Croma Vis | 0,12 | 0,37 | -0,36 | -0,07 | 0,31 | 0,10 | -0,41 | 0,05 | -0,21 | -0,08 |
| Tono | 0,33 | 0,94 | 0,18 | 0,98 | 0,49 | 0,87 | 0,35 | 0,94 | 0,60 | 0,80 |
| CromaUV | -0,09 | -0,29 | -0,12 | -0,08 | 0,16 | -0,07 | 0,31 | -0,05 | 0,17 | 0,08 |
| RmaxUV | -0,21 | -0,14 | -0,33 | -0,03 | -0,22 | 0,06 | -0,23 | 0,03 | -0,17 | 0,02 |
| Peso | 0,38 | 0,15 | 0,34 | -0,22 | 0,10 | -0,05 | 0,27 | -0,05 | 0,18 | -0,01 |
| Longitud | -0,16 | 0,16 | 0,15 | -0,19 | -0,09 | -0,08 | 0,38 | -0,02 | 0,20 | -0,05 |
| Diámetro | 0,35 | 0,03 | 0,32 | 0,22 | 0,00 | -0,04 | 0,23 | -0,14 | 0,04 | 0,08 |
| Valor propio | 2,7E05 | 1,3E05 | 9,5E05 | 1,5E04 | 1,2E06 | 9,7E03 | 4,2E05 | 4,7E03 | 4,3E05 | 2,5E03 |
| % Total de Varianza | 95,30 | 4,63 | 98,46 | 1,52 | 99,18 | 0,81 | 98,86 | 1,09 | 99,38 | 0,58 |

Tabla 3. Resultados de análisis discriminante a partir de componentes principales extraídos de las variables morfométricas y colorimétricas. Se informan los parámetros de discriminación obtenidos en cada estado de desarrollo de los frutos de *T. verticillatus*. El modelo de discriminación significativa ($P < 0,05$) y porcentaje de precisión se muestran en negrita.

| Estado | Parámetros de Discriminación | | | |
|--------|------------------------------|------|-------------|-------------------|
| | Hotelling's t^2 | F | P | Clasificación (%) |
| 1 | 7,43 | 3,59 | 0,04 | 72,73 |
| 2 | 4,91 | 2,42 | 0,09 | 63,10 |
| 3 | 0,63 | 0,31 | 0,73 | 45,76 |
| 4 | 1,82 | 0,89 | 0,42 | 61,11 |
| 5 | 2,80 | 1,37 | 0,26 | 61,11 |

3.3 Composición de azúcares solubles en la pulpa de los frutos

Se inyectaron ocho estándares de azúcares (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) derivatizados con MSTFA en el GC-MS, de los cuales siete eran monosacáridos (pentosas: L-(+)-arabinosa y D-(+)-xilosa; hexosas: D-(-)-fructosa, D-(+)-galactosa, D-(+)-glucosa, D-(+)-manosa y L-(+)-ramnosa) y uno era un disacárido (sacarosa). Algunos monosacáridos presentaron dos picos en el GC, debido a las configuraciones α y β del carbono anomérico en las formas cíclicas piranósicas (5C+1O) o furanósicas (4C+1O). Los espectros de masas de monosacáridos con el anillo pirano se caracterizan por presentar m/z de 204 como fragmento iónico principal, mientras que en la fragmentación con el anillo furano el ion principal tiene m/z de 217 (Anexo 2, Fig. 18 a, b, c y d). Los dos fragmentos pueden ser utilizados para identificar azúcares en extractos complejos. Los disacáridos derivatizados con MSTFA se caracterizan por el ion m/z 361 (Anexo 2, Fig. 18 e).

En el presente estudio se analizó la composición de los azúcares solubles de extractos de frutos de *T. verticillatus*. El programa AMDIS extrae los espectros a partir del archivo de datos del GC-MS e identifica los compuestos comparando sus espectros de masas con aquellos en la base de datos NIST02. De esta forma fueron identificados cinco azúcares solubles. La composición, el tiempo de retención y el índice de Kovats de azúcares de la pulpa de los frutos se muestran en Tabla 4. Los cromatogramas GC de los estándares de azúcares y de muestras de la pulpa de los frutos de *T. verticillatus* se muestran en los Anexos 3 y 4, respectivamente.

La fructosa y la glucosa fueron identificadas como los monosacáridos principales detectados en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus*; están presentes durante todo el desarrollo del fruto, mientras que arabinosa, galactosa y sacarosa no se encuentran en todos los estados de desarrollo del fruto, estando presentes principalmente en los estados tardíos de desarrollo del fruto (estados 3, 4 y 5). Estas observaciones fueron independientes del SHH.

Se construyeron rectas de calibración con los estándares analizados por HPLC (Figs. 12 y 13). Los tres azúcares principales (fructosa, glucosa y sacarosa) presentes en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus* sobre *S. montanus* y *F. imbricata* fueron luego cuantificados por extrapolación desde estas rectas (Fig. 14). No se pudieron realizar mediciones suficientes de la pulpa de los frutos de *T. verticillatus* sobre *B. montana*, debido a desperfectos en el equipo de HPLC y la pérdida de muestras tras el terremoto del 27 de febrero de 2010.

Las concentraciones de los azúcares identificados fueron analizadas a través de ANOVA de dos vías (factores: estado de desarrollo y hospedero), que demostró que entre los estados de desarrollo de los frutos sí difieren las concentraciones de los azúcares ($P < 0,001$), siendo menor en los primeros estados, mientras que entre SHH

no hay diferencia en cuanto a concentración de los azúcares solubles analizados ($P > 5,25$) (Fig. 15).

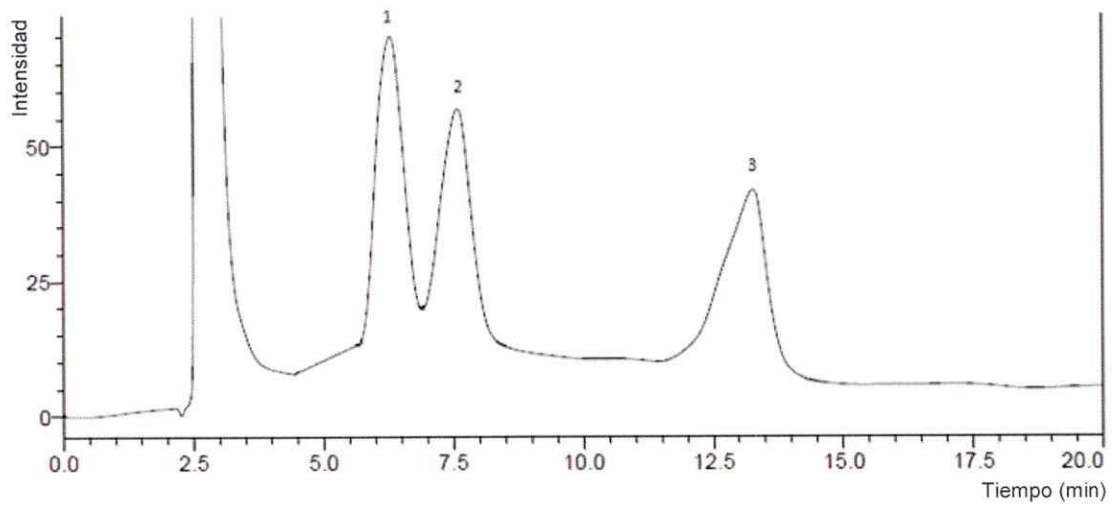


Figura 12: Cromatograma de una mezcla de tres estándares de azúcares inyectados e identificados por HPLC: (1) fructosa, (2) glucosa y (3) sacarosa.

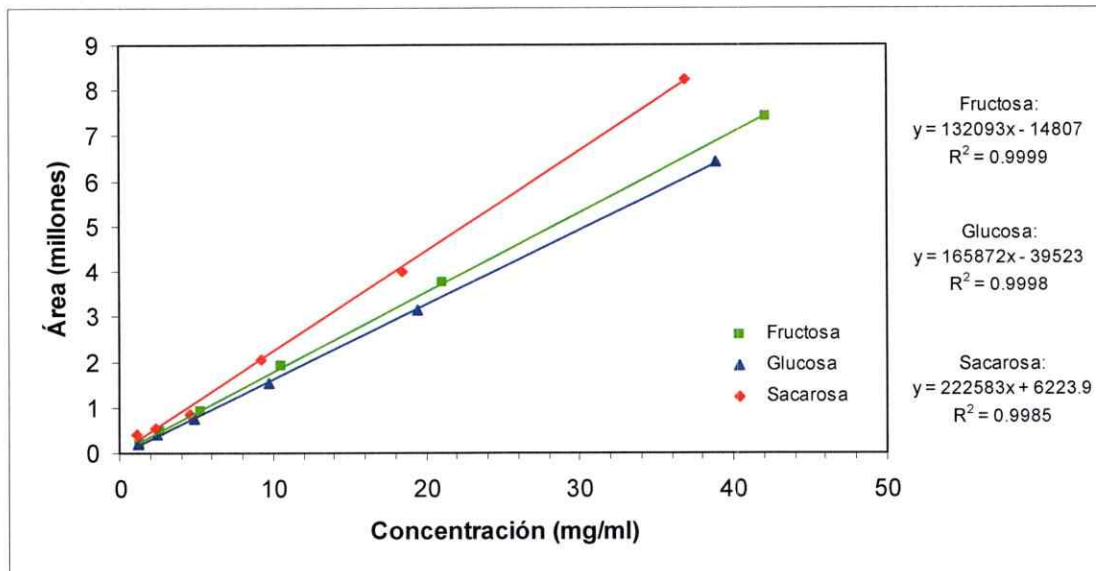


Figura 13: Rectas de calibración de los estándares de azúcares identificados a través de HPLC.

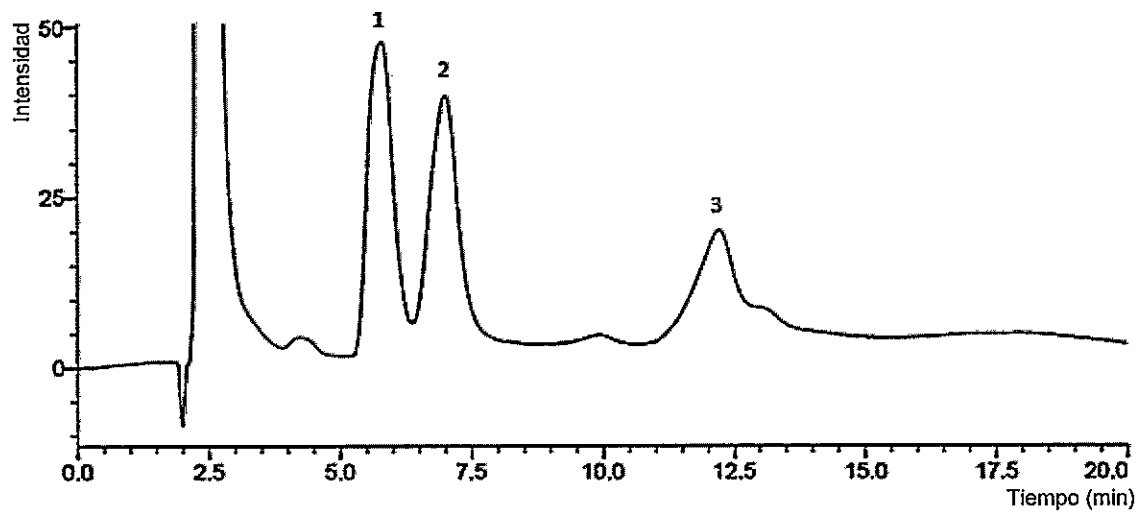


Figura 14: Cromatograma de los azúcares identificados en la pulpa de un fruto de *T. verticillatus* analizado por HPLC. (1) fructosa, (2) glucosa y (3) sacarosa.

Tabla 4. Características de los azúcares encontrados en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus* sobre las tres especies de plantas hospederas.

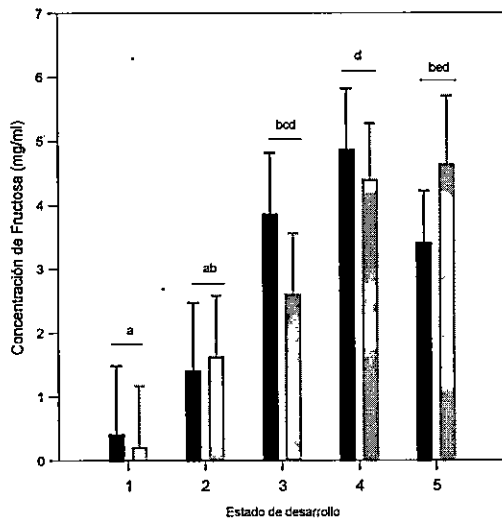
| Componente | Fórmula Molecular | Masa Molecular (g/mol) | Número CAS | Retención (min; α - β -) | Tiempo de m/z^a | Coincidencia (%) ^b | Índice de Kovats Exp | Índice de Kovats Lit. ^c |
|----------------|---|------------------------|------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| L(+)-Arabinosa | C ₅ H ₁₀ O ₅ | 150 | 5328-37-0 | 13,7;14,2 | 217, 204, 191 | 906 | 1624, 1657 | 1644, 1674 |
| D(-)-Fructosa | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180 | 57-48-7 | 16,9;17,2 | 217, 437, 147 | 873 | 1815, 1835 | 1839, 1847 |
| D(+)-Glucosa | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180 | 492-62-6 | 18,3;19,5 | 204, 191, 217 | 958 | 1903, 1989 | 1932, 2025 |
| D(+)-Galactosa | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180 | 26566-61-0 | 17,8;18,5 | 204, 191, 217 | 850 | 1869, 1921 | 1898, 1943 |
| Sacarosa | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 342 | 99-20-7 | 30,2 | 361, 217, 437 | 898 | 2688 | 2712 |

^a primer ion clave (m/z) es el pico base

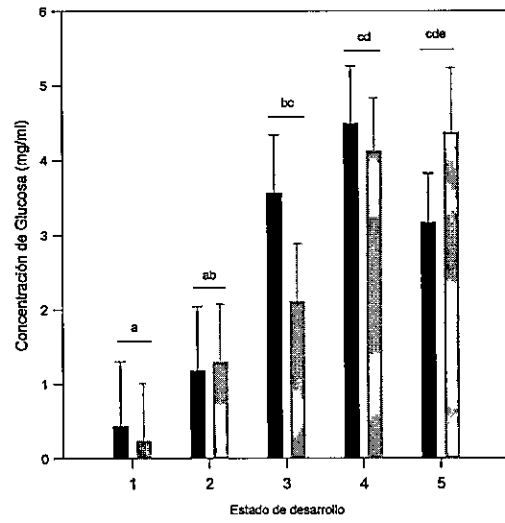
^b Corresponde a la coincidencia entre el espectro del azúcar de la muestra y el de la librería

^c Medeiros and Simoneit 2008⁷

Contenido de Fructosa en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus*



Contenido de Glucosa en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus*



Contenido de Sacarosa en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus*

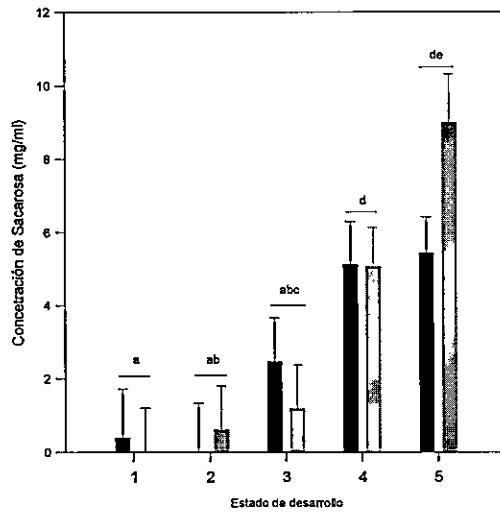


Figura 15: Contenido de azúcares solubles principales en los frutos de *T. verticillatus*, analizados con ANOVA de dos vías y método de Holm-Sidak para las comparaciones múltiples. Barras negras y grises corresponden a los frutos de *T. verticillatus* sobre *F. imbricata* y *S. montanus*, respectivamente.

4. DISCUSIÓN

Estudios realizados en el SNYL mostraron que el hospedero afectó de diversas maneras a la planta hemiparásita *T. verticillatus*: tanto la translocación de alcaloides y flavonoides, como la composición de metabolitos secundarios y de compuestos volátiles emitidos varió entre SHH, lo que se reflejó en el número de visitas florales y en la intensidad de herbivoría. Además, se demostró que *T. verticillatus* sobre *S. montanus* presentó mayor tasa de visitas florales por parte de insectos, lo que permitiría una mayor transferencia de polen. En otro trabajo se demostró un mayor número de infecciones exitosas sobre *S. montanus*, a pesar de ser el hospedero menos abundante, lo que sugiere que el SHH más exitoso es el constituido por *T. verticillatus* sobre *S. montanus* (Cabezas 2007, Lemaitre 2010, Saldías 2011, Troncoso y col. 2010). Sin embargo, hay visitantes florales que no son afectados mayormente por la abundancia de compuestos volátiles, siendo el color, la forma y la cantidad de néctar de las flores un factor importante (Cabezas 2007, Proctor y col. 1996).

El ANOVA de dos vías mostró diferencias de las variables colorimétricas (tono, cromavis y cromauv) y de las variables morfológicas (peso y diámetro) entre los SHH. Cuando las variables colorimétricas y morfológicas se combinaron para realizar el análisis discriminante se demostró que sólo en el estado uno de desarrollo es posible considerar el fenotipo de los frutos como distintos entre los SHH. El conjunto de variables medidas en este trabajo, no son suficientes para discriminar los sistemas H-H como grupos distintos en los estados más avanzados de desarrollo.

Técnicamente el color está en función de la luz reflejada por el objeto, del ambiente en el cual se encuentra y del sistema sensorial del receptor (Grill y Rush

2000). En este estudio el color se consideró únicamente como una combinación de los componentes físicos que conforman el espectro, cuyos componentes principales son, el *brillo* que es una medida de la intensidad de la luz en todas las longitudes de onda, el *croma* que es la medida de cuanto luz blanca y gris está mezclada con el color puro del organismo u objeto en estudio y el *tono* que es el color propiamente tal. En términos generales no se encontraron claras diferencias en los componentes del color entre los frutos de *T. verticillatus* parasitando las tres especies de hospederos.

El color de los frutos dependen de la síntesis, distribución y contenido de pigmentos en los distintos tejidos del fruto, principalmente carotenoides y flavonoides que se encuentran en plástidos y en el citoplasma, lo cual está condicionado en gran medida por expresión genética. Además, el color está sujeto a un conjunto de factores (ej.: condiciones ambientales) que afectan su expresión (Shaw 1991). Ahora bien, el "ambiente" de *T. verticillatus* debe considerarse a dos niveles. El primer nivel está constituido por la planta hospedero en sí, la cual es su principal sustrato de alimentación, y el segundo nivel las condiciones de hábitat donde los hospederos ocurren (SNYL). Los tres SHH comparten las condiciones ambientales a gran escala; sin embargo, los hemiparásitos no comparten las condiciones ambientales a escala inmediata (hospedero). A pesar de utilizar distintos hospederos, éstos no influyen significativamente sobre las características colorimétricas de los frutos del hemiparásito, por lo que se podría deducir que los frugívoros de *T. verticillatus* perciben a los frutos de los tres SHH como similares en el sentido colorimétrico.

La comunicación entre plantas y dispersores debe ser mediada por señales que sean correctamente emitidas y comprendidas, respectivamente. La señal del emisor es clara, honesta e independiente del contexto, como también lo es la atención del receptor de la señal para obtener una recompensa nutricional (Schaefer y col. 2004,

Schaefer y col. 2006). Las señales de las plantas deben ser llamativas para los mutualistas y discretas para los antagonistas; la fotosensibilidad es una solución a este dilema si ella difiere entre estos gremios, ya que la señal puede estar en un rango espectral en el que el mutualista es sensible y no así el antagonista. Entre los dispersores de semillas se encuentran aves con visión tetracromática, insectos con visión tricromática y mamíferos con visión tri- y dicromática (Schaefer y col. 2004). Las diferencias en fotosensibilidad que resultan de este factor anatómico se pueden traducir, por ejemplo, en una atracción selectiva de aves mediante señales rojas o en el espectro del UV, ya que estos colores son prácticamente invisibles para insectos y mamíferos, respectivamente.

La selección de frutos por parte de aves es guiada por la recompensa nutricional que ellos proveen, siendo de fundamental importancia la composición y concentración de azúcares en la pulpa (Baker y col. 1998; Wheelwright 1985). Es así como las aves generan un mecanismo de aprendizaje para asociar un alimento nutritivo con señales que permiten encontrar el alimento, como es el color y tamaño de los frutos.

La composición de azúcares en frutas y néctar floral, está controlado por la acción de la enzima ácido invertasa (Lotz y Schondube 2006) y plantas con actividad alta de la enzima tienen una pulpa y néctar rico en hexosas, mientras que plantas con bajos niveles de actividad de la enzima presentan un alto contenido de sacarosa (Lotz y Schondube 2006). Se identificaron los mismos azúcares solubles en la pulpa de los frutos de *T. verticillatus* sobre *S. montanus*, *B. montana* y sobre *F. imbricata*. La glucosa y la fructosa se identificaron durante todo el desarrollo del fruto, mientras que en estados avanzados de desarrollo de los frutos (estado 3, 4 y 5) se identificó además la arabinosa y galactosa. La sacarosa está presente mayormente cuando el fruto está

maduro (estados 4 y 5), lo cual según Nielsen y col. (1991) puede deberse a la presencia de sacarosa sintetasa en el transcurso del desarrollo, a conversión de sorbitol a sacarosa en el tejido del mesocarpo del fruto (Ishida y col. 1985).

Por otro lado, Martínez del Rio et al. (1995) y Soto-Gamboa y Bozinovic (2002) identifican a la tenca (*Mimus thenca*) como el principal dispersor de diversos muérdagos, entre ellos *T. verticillatus*. Adicionalmente, en estudios preliminares observamos una preferencia de la tenca por remover frutos en estado 5 de desarrollo que provengan de *T. verticillatus* cuando está parasitando *S. montanus*, aunque también consume frutos en estado 4 (resultados no mostrados en este estudio). La tenca no expresa la enzima sacarasa intestinal (Gatica y col. 2006, Martínez del Rio y col. 1995) encargada de degradar la sacarosa y, como ya se dijo, la mayoría de los frutos en estado de desarrollo 4 y 5 contienen sacarosa. Por tanto, son necesarios estudios adicionales para determinar con qué frecuencia son consumidos los frutos de *T. verticillatus* por la tenca, si es parte de su dieta regular (por cuanto su fisiología digestiva debe ser analizada con mayor detenimiento) o si es un recurso al cual accede sólo cuando hay escasez de otros alimentos que le resulten más digeribles.

5. CONCLUSIÓN

Al comparar los tres SHH y considerar al conjunto de variables medidas, los frutos de *T. verticillatus* no presentaron diferencias fenotípicas durante su desarrollo y por lo tanto no se podrían considerar los SHH como grupos distintos; en consecuencia, el hospedero no determina las características colorimétricas y morfológicas estudiadas de los frutos.

La pulpa de los frutos en los tres SHH está constituida por los mismos monosacáridos y el mismo disacárido de acuerdo al estado de desarrollo; así mismo, la concentración de azúcares solubles tampoco difiere entre los frutos en dos de los tres SHH (*T. verticillatus*-*S. montanus*, *T. verticillatus*-*F. imbricada*); en consecuencia, el hospedero no determina ni la composición ni la concentración de azúcares solubles en la pulpa de los frutos, aunque es necesario analizar la pulpa de los frutos del sistema *T. verticillatus*-*B. montana*.

En resumen, el hospedero no afecta el fenotipo visual (morfométrico y colorimétrico) de los frutos de *T. verticillatus* ni el fenotipo químico (contenido de azúcares solubles).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, S.L. 2003. Host species affects herbivory, pollination, and reproduction in experiments with parasitic *Castilleja*. *Ecology* 84: 2083-2091.

Amico, G.C., Vidal-Russell, R. y Nickrent, D.L. 2007. Phylogenetic relationships and ecological speciation in the mistletoe *Tristerix* (Loranthaceae): the influence of pollinators, dispersers, and hosts. *American Journal of Botany* 94: 558-567.

Aukema, J. 2003. Vectors, viscin and Viscaceae: mistletoes as parasites, mutualists and resources. *Frontiers in Ecology Environment* 1: 212-219.

Aukema, J. y Martínez del Río. 2002. Mistletoes as Parasites and Seed-dispersing Birds as Disease Vectors: Current Understanding, Challenges and Opportunities. En: Levey DJ, Silva WR y Galetti M (eds). *Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation*. Oxfordshire, UK: CAB International Press. Pp. 99-110.

Baker, H.G., Baker, I.Y. y Hodges, S.A. 1998. Sugar composition of nectars and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* 30:559-586.

Brooks, D.R. y McLennan, D.A. 1993. *Parascript. Parasites and the language of evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, 429 pp.

Cabezas, N. 2007. Efecto del hospedero sobre la composición de metabolitos secundarios de la planta hemiparásita *Tristerix verticillatus* (Loranthaceae) y sobre sus interacciones con insectos. Tesis de doctorado de la Universidad de Chile.

Cuthill, I.C. 2006. Color Perception. En: Hill, G.E. y McGraw, K.J. (eds.) Bird coloration, mechanisms and measurements. Cambridge. (MA): Harvard University Press. Pp. 3–40.

Dowling, D.K. y Mulder, R.A. 2006. Combines influence of maternal and paternal quality on sex allocation in red-capped robins. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 440-449.

Enciclopedia de la Flora Chilena. 2010. *Berberis montana*. (www.florachilena.cl)

Enciclopedia de la Flora Chilena. 2010. *Fabiana imbricata*. (www.florachilena.cl)

Enciclopedia de la Flora Chilena. 2010. *Schinus molle*. (www.florachilena.cl)

Endler, J.A. 1990. On the measurement and classification of colour in studies of animal color patterns. *Biological Journal of the Linnean Society* 41: 315-352.

Gatica, C.D., González, S.P., Vásquez, R.A. y Sabat, P. 2006. On the relationship between sugar digestion and diet preference in two Chilean avian species belonging to the Muscicapoidea superfamily. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 287-294.

Grill, C.P. y Rush, V.N. 2000. Analysing spectral data: comparison and application of two techniques. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 121-138.

Hausmann, F., Arnold, K.E., Marshall, N.J. y Owens, I.P.F. 2003. Ultraviolet signals in birds are special. *Proceedings of the Royal Society*. B270: 61-67.

Heil, M., Rattke, J. y Boland W. 2005. Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science* 308: 560-563.

Hoffman, A. 1998. *Flora Silvestre de Chile, Zona Central*. 4ª Edición. Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile. p 254.

Ishida, M., Inaba, A. y Sobajima, Y. 1985. Translocation of labelled compounds from into shoot and fruit with their conversion in peach trees. *Science Reports of the Kyoto Prefecture University* 37: 163-171.

Kuijt, J. 1988. Revision of *Tristerix* (Loranthaceae). *Systematic Botany Monographs* 19: 1-64.

Lemaitre, A.B, Troncoso, A.J. y Niemeyer, H.M. 2011. Host preference of a temperate mistletoe: Disproportional infection on three co-occurring host species influenced by differential success. *Austral Ecology* DOI: 10.1111/j.1442-9993.2011.02281.x

Lord, J.M. 2004. Frugivore gape size and the evolution of fruit size and shape in southern hemisphere floras. *Austral Ecology* 29: 430-436.

Lotz, C.N. y Schondube, J.E. 2006. Sugar preferences in nectar- and fruit-eating birds: behavioral patterns and physiological causes. *Biotropica* 38: 3-15.

Mäntylä, E., Klemola, T., Sirkiä, P. y Laaksonen, T. 2008. Low light reflectance may explain the attraction of birds to defoliated trees. *Behavioral Ecology* 19:325-330.

Martínez del Rio, C., Baker, H.G. y Baker, I. 1992. Ecological and evolutionary implication of digestive processes: bird preferences and the sugar constituents of floral nectar and fruit pulp. *Experientia* 48: 540-544.

Martínez del Rio, C., Brugger, E., Ríos, J.L., Vergara, M.E. y Witmer, M. 1995. An experimental and comparative study of dietary modulation of intestinal enzymes in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Physiological Zoology* 68: 490-511.

Mathiasen, R.L., Nickrent, D.L., Shaw, D.C. y Watson, D.M. 2008. Mistletoes: pathology, systematics, ecology and management. *Plant Disease* 92: 988-1005.

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

Mougeot, F., Martinez-Padilla, J., Perez-Rodriguez, L. y Bortolotti, G.R. 2007. Carotenoid-based colouration and ultraviolet reflectance of sexual ornaments of grouse. *Behavioral Ecology Sociobiology* 61: 741-751.

Nielsen, T.H., Skjaerbaek, H.C. y Karlsen, P. 1991. Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology* 82: 311-319.

Norton, D.A. y Carpenter, M.A. 1998. Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. *Tree* 13: 101-105.

Press, M.C. y Phoenix, G.K. 2005. Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist* 166: 737-751.

Proctor, M., Yeo, P. y Lack, A. 1996. *The Natural History of Pollination*. Timber Press, Portland.

Quested, H. 2008. Parasitic plants-impacts on nutrient cycling. *Plant Soil* 311: 269-272.

Riedemann, P. y Aldunate, G. 2001. *Flora Nativa de valor ornamental, Identificación y propagación, Chile central*. 566 pp. Editorial Andrés Bello, Santiago, Chile.

Rohde, K. 2001. Parasitism. *Encyclopedia of Biodiversity*. Pp. 463-484.

Saldías, M. 2011. Movimiento potencial de polen entre flores de la planta hemiparásita *tristerix verticillatus* parasitando tres especies de hospederos. Seminario de título para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente.

Schaefer, M.H., Schaefer, V. y Levey, D.J. 2004. How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 577-584

Schaefer, M.H., Levey, D.J., Schaefer, V. y Avery, M.L. 2006. The role of chromatic and achromatic signals for fruit detection by birds. *Behavioral Ecology* 17: 784-789.

Shaw, D.V 1991. Genetic variation for objective and subjective measures of fresh fruit color in strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 894-898.

Sorci, G. y Garnier, S. 2008. Parasitism. *Encyclopaedia of Ecology*. pp 2645-2650.

Soto-Gamboa, M. y Bozinovic, F. 2002. Fruit-disperser interaction in a mistletoe-bird system: a comparison of two mechanisms of fruit processing on seed germination. *Plant Ecology* 159: 171-174.

Troncoso, A.J., Cabezas, N.J., Faúndez, E.H., Urzúa, A. y Niemeyer, H.M. 2010. Host-mediated plant-volatile polymorphism in a parasitic plant influences its attractiveness to pollinators. *Oecologia* 162: 413-425.

Van Dongen, W.F.D. y Mulder, R.A. 2007. Relative importance of multiple plumage ornaments as status signals in golden whistlers (*Pachycephala pectoralis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 77-86.

Watson, D.M. 2001. Mistletoe-A keystone resource in forest and woodlands worldwide. *Annual Reviews in Ecology* 32: 219-49

Wheelwright, N.T. y Janson, C.H. 1985. Color of fruit displays of bird-dispersed plants in two tropical forests. *The American Naturalist* 126: 777-799.

7. ANEXOS

Anexo 1. Trabajos anteriores en el mismo sistema

En el estudio realizado por Cabezas (2007) en el mismo sistema constituido por *T. verticillatus* parasitando en simpatria tres especies de hospederos en SNYL, se demostró que las plantas hospederas y las plantas hemiparásitas sobre cada hospedero son discriminadas como poblaciones químicamente diferentes en término de los volátiles emitidos, y que los componentes principales de las abundancias relativas de compuestos volátiles permiten discriminar significativamente la composición de volátiles entre hemiparásitos parasitando distintos hospederos ($U=0,052$; $F=16$; $P<0,0001$) (Fig. 16) (Cabezas 2007).

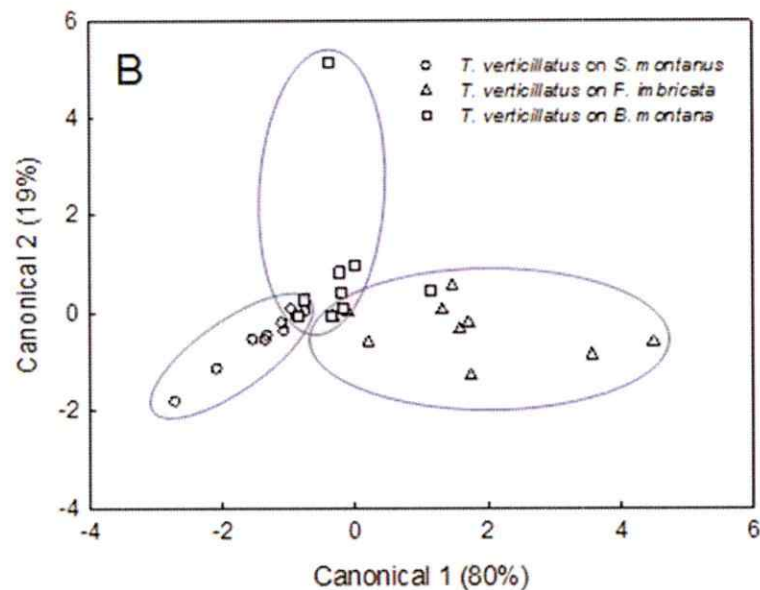


Figura 16. Análisis de discriminante de compuestos volátiles de *T. verticillatus* sobre cada planta hospedera.

El número y frecuencia de visitas totales por insectos evaluadas por hora en flores de *T. verticillatus* varió entre cada SHH ($F = 227, P < 0,001$), siendo las flores del SHH Tv/Sm las más visitadas por insectos, seguidas de Tv/Fi y Tv/Bm (Fig. 17), según las comparaciones post-hoc realizadas con la prueba de Tukey ($a > b > c, P < 0,05$).

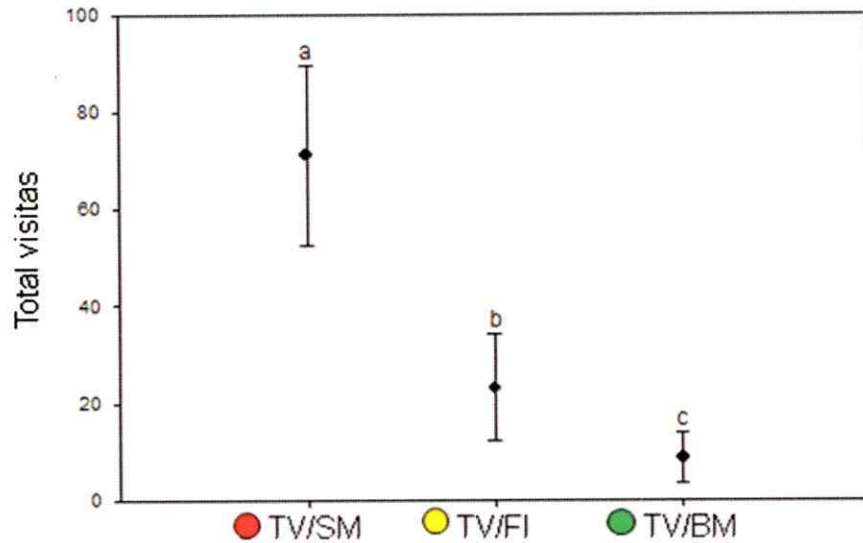
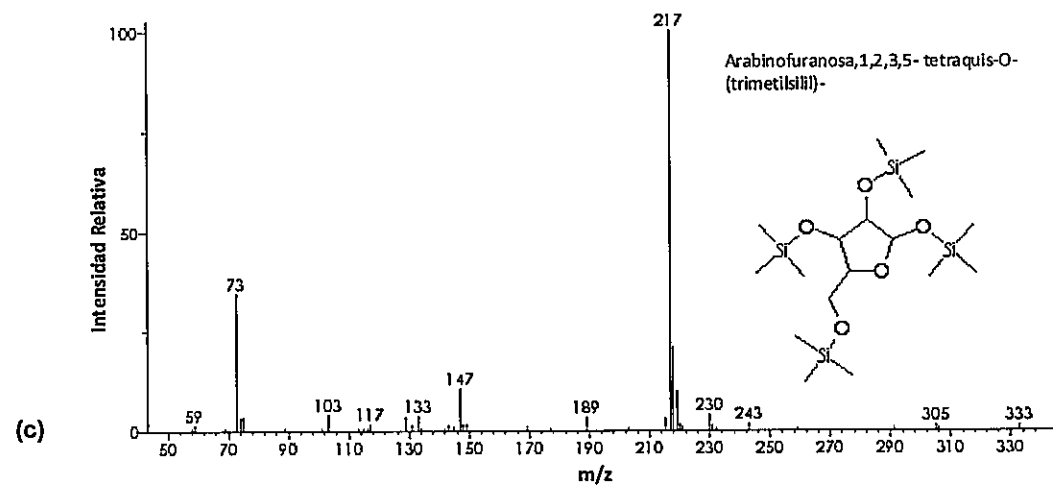
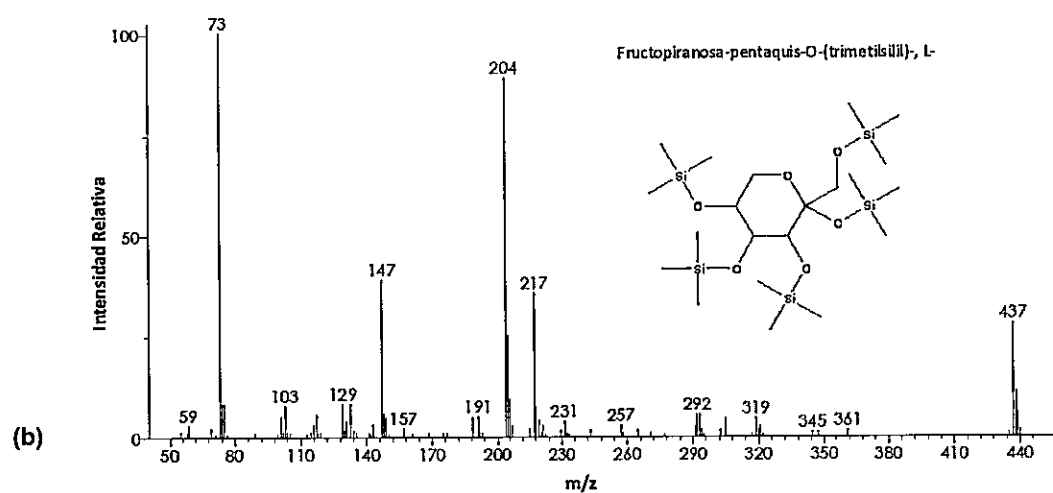
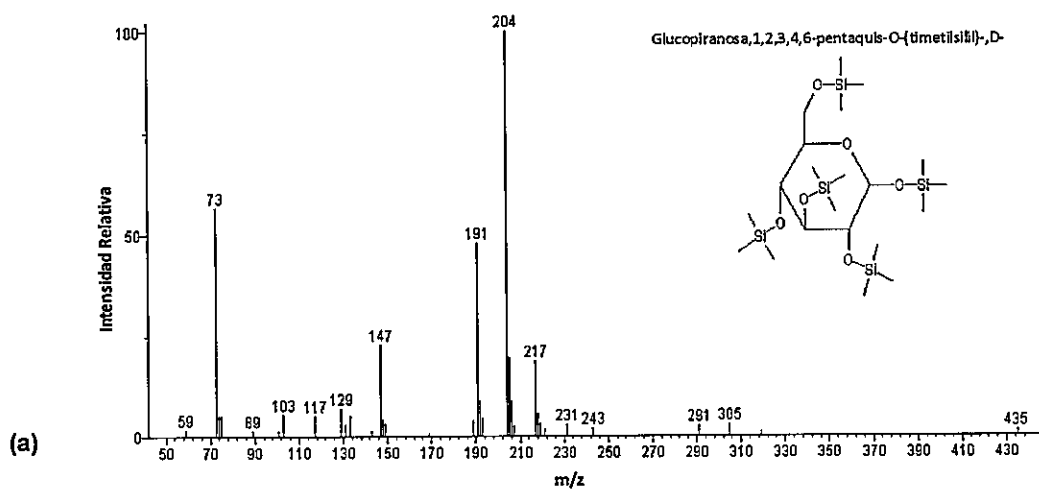
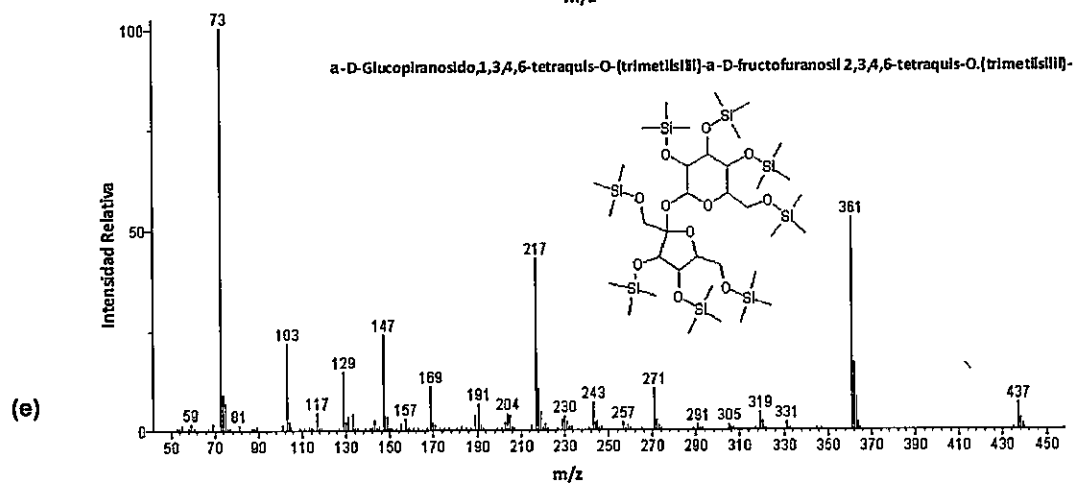
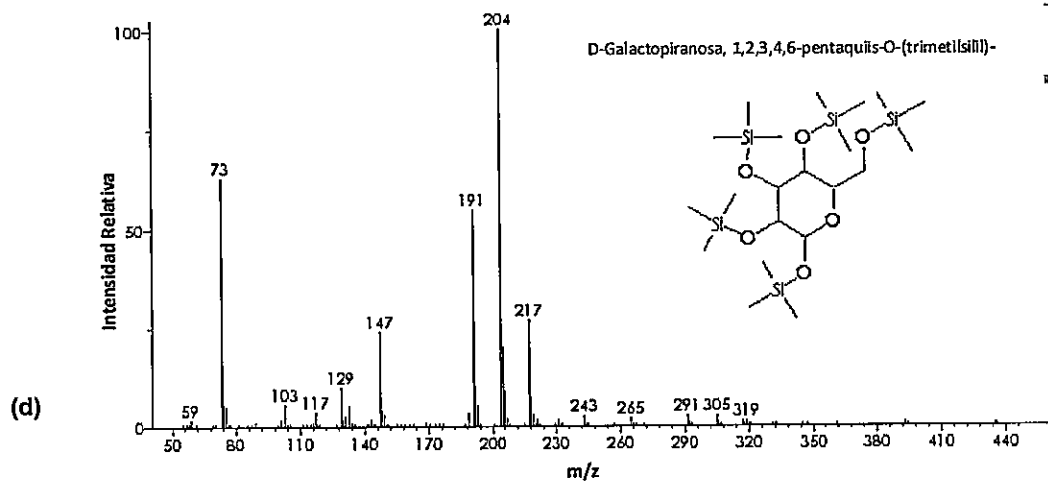


Figura 17. Visitas totales de insectos observadas por hora a flores de *T. verticillatus* en cada hospedero (promedio y error estándar). Las letras distintas sobre cada columna indican diferencias significativas (prueba de Tukey con $P < 0,05$).

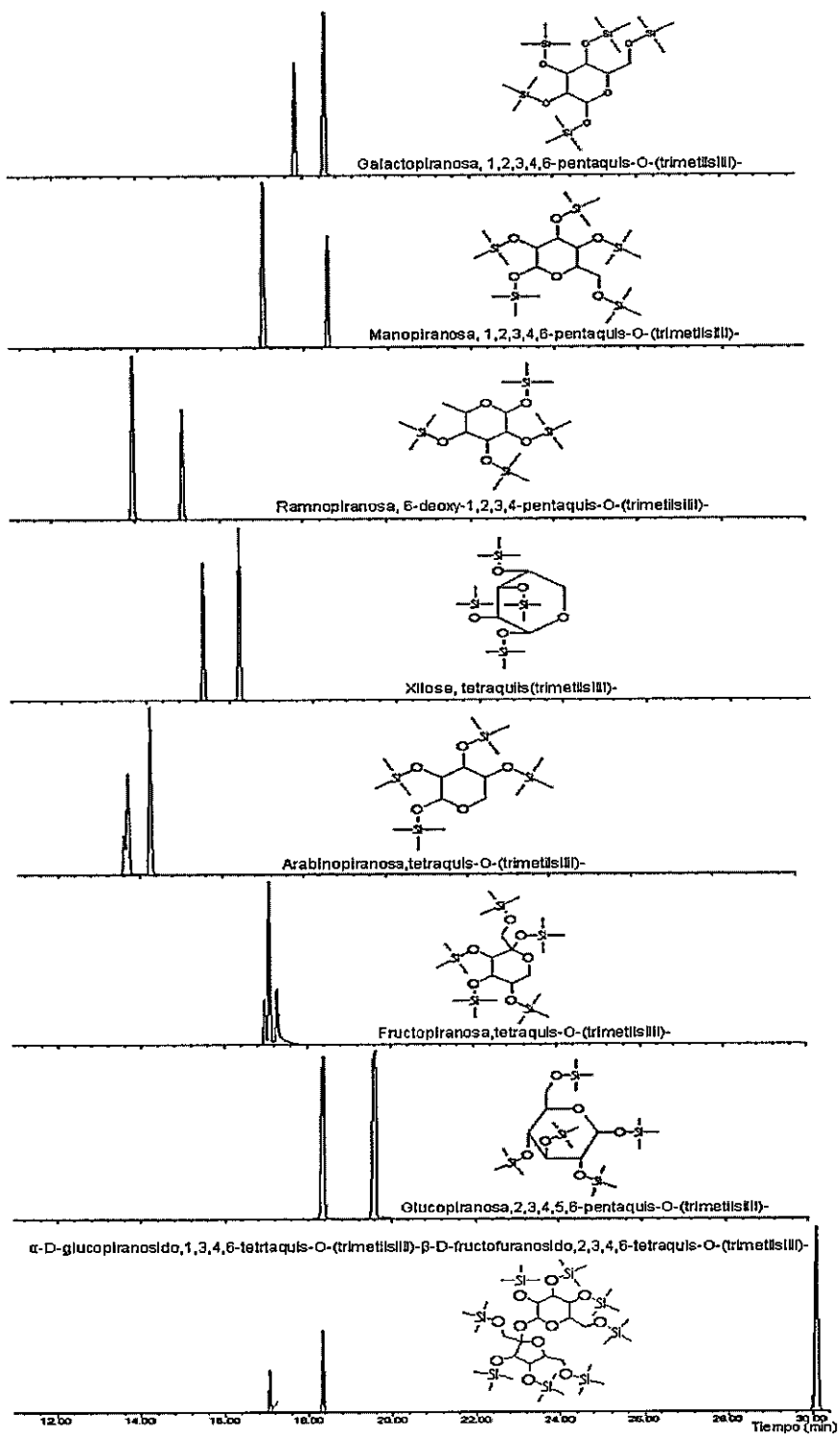
La composición de metabolitos secundarios del hemiparásito *T. verticillatus* varió entre hospederos, lo que puede relacionarse con diferencias en sus interacciones con insectos (visitantes florales y herbívoros).

Anexo 2. Espectros de masa de algunos estándares de los azúcares identificados a través de espectrometría de masas. Los azúcares fueron derivatizados previamente con MSTFA.





Anexo 3. Cromatogramas de los ocho estándares de azúcares. Los estándares fueron derivatizados con MSTFA previamente y luego analizados a través de GC-MS.



Anexo 4. Cromatogramas de los azúcares solubles identificados a través de GC-MS durante el desarrollo del fruto en los tres SHH estudiados.

