

UCH-FC
Doc-EBE
084
C.I

**ESTRUCTURACION GENÉTICA, ESPECIALIZACIÓN Y AJUSTES
RECÍPROCOS ASOCIADOS EN EL HOLOPARASITO *TRISTERIX APHYLLUS***

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los de los
requerimientos para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y
Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias



Carmen Gloria Ossa Barrientos

Septiembre, 2013

Director de tesis: Dr. Rodrigo Medel

Co-Director de Tesis: Dr. Marco Méndez

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 la candidata.

Carmen Gloria Ossa Barrientos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 2 de Mayo de 2013.

Director de Tesis:
Dr. Dr. Rodrigo Medel

.....

Co-Director de Tesis
Dr.Dr. Marco Méndez

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ramiro Bustamante

.....

Dr. Elie Poulin

.....

Dr. Daniel Frías

.....

A series of handwritten signatures in blue ink, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written over dotted lines. The first signature is for Rodrigo Medel, the second for Marco Méndez, and the following three are for the members of the Evaluation Commission: Ramiro Bustamante, Elie Poulin, and Daniel Frías.



A mis amigos

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO



Soy Carmen Gloria Ossa Barrientos. Nací en Santiago de Chile, el 23 de Junio de 1973. Terminé mi educación media en el Instituto de Estudios Secundarios de la Universidad de Chile. Para luego entrar a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, para obtener el grado de Licenciado en Ciencias c/m en Biología. Posteriormente la misma Facultad me obtuvo el grado de Magíster en Ecología y Biología Evolutiva. Ahora entregó esta tesis para cumplir los requisitos conducentes al grado de Doctora en Ecología y Biología Evolutiva.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de grandes personas que me han honrado con su amistad y cariño. Se que más de uno se me olvidará, no será por que no los quiera, es el déficit atencional, ustedes saben.

Primero agradezco a mis tutores Rodrigo Medel y Marco Méndez. A Marco agradezco especialmente su tiempo para escuchar mis desgracias, por las sesiones de “sillita azul” y por prestarme su hombro para llorar, además de los mil malabares que hizo para financiar parte de esta tesis. A mi comisión (Ramiro, Elie y Daniel Frias), por los comentarios, el cariño y ayuda desinteresada, especialmente al final de este camino, muy especialmente agradezco a Ramiro que sin su apoyo yo no estaría hoy aquí.

Agradezco infinitamente a los amigos que se dejaron esclavizar en terreno: Marcela Espinoza, Antonio Rivera, Claudia Espinoza, Maureen Murúa, Irayda Salinas, Grisela Cavieres, Lye Otani, Sandra González, Nora Peña y a mi hermana Marcela. A los amigos maravillosos que cuidaron de mis semillas mientras yo estaba en el campo: Antonio Rivera, Grisela Cavieres, Paulina Salas, Alejandra González, Marcela Espinoza, Carezza Botto, Hugo Torres, gracias a todos por pelar frutitos, regar semillas y tomar fotitos.

A la familia Montero Peña, gracias por el apoyo logístico, la ayuda en terreno y la amistad durante todos estos años, gracias especialmente por aceptarme como un miembro más del clan .

Gracias mil a todos los que trataron de extraer DNA medianamente “limpio” del *Tristerix* del demonio, las decenas de protocolos facilitados y los esfuerzos desplegados. Especialmente a Alejandra Troncoso, Paola Jara y Gioconda Peralta que gracias a su generosidad mi ADN vio la luz. A Patricio Spencer, mil gracias por ayudarme con las extracciones!

A mis co-co tutores Pamela Morales y Luis Pastene, no se que hubiese hecho sin ustedes, mil gracias por instruirme en submundo del PCR, contestar todas mis preguntas y asesorarme en absolutamente todo. A los Gevolines mil gracias por el cariño, las tardes de fútbol, asados y largas conversaciones, Carola, Huguito, Pao, Moises, Pablito, Dayana, Pame, Luchito, Gonzalo, Claudio, Franco, Nachito los quiero!

A Pauli González, por estar siempre pendiente de los avances y retrocesos de esta tesis. A Paz que siempre a estado ahí para ayudarme con programas, mapas, gramática, etc. A Pauli Ossa por compartir esta etapa estresante de la vida y ayudarme en los momentos desesperados. A la Ale y la Fefita mil gracias por cuidarme, y por ser tan generosas con migo, las quiero mucho!.

A mis amigas "brujas" que lucharon para que yo mantuviese medianamente el equilibrio, a punta de yoga, flores de Bach y diversas terapias poco convencionales (Mané, Sussy, Sofi, Ale Drogett y Pacita).

A mi familia, agradezco el apoyo constante, en los momentos felices y en los más tristes. Agradezco al Negrito especialmente por haber solucionado mis problemas de transporte en terreno y por haberme dado la libertad de buscar mi felicidad a pesar de sus reparos. A todos (mamá, papá, tío, Isabel, hermanos, primis, sobrinos, cuñados), agradezco infinitamente que estén en mi vida, los amo!

Por último agradezco a CINICYT que me otorgó la beca de apoyo de estudios de Doctorado 2006-2009, a CONAF, por permitirme realizar parte del muestreo en los Parques Nacionales Llanos de Challe (III Región) y Fray Jorge (IV Región), y en la Reserva Nacional Las Chinchillas (IV Región). También agradezco Don Tavilo y su esposa en Oruro, quienes generosamente nos permitieron quedarnos en su casa. A Carabineros de Domeyco, por toda la ayuda brindada.

ÍNDICE

Agradecimientos	ii
Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción General	1
Preguntas e Hipótesis	9
Objetivos Generales	10
Objetivos Específicos	10
Referencias	11
CAPÍTULO I. PREFERENCIA Y AJUSTES ENTRE RASGOS DE DEFENSA Y CONTRA DEFENSA EN EL HOLOPARÁSITO TRISTERIX APHYLLUS Y SUS CACTUS HOSPEDEROS	17
Resumen	18
Abstract	19
Introducción	20
Materiales y Métodos	24
Resultados	28
Discusión	30
Referencias	34
Tablas	40
Leyendas de Figuras	44
Figuras	45
CAPÍTULO II. FILOGEOGRAFÍA DEL HOLOPARÁSITO TRISTERIX APHYLLUS: IMPORTANCIA DE LOS HOSPEDEROS Y DE LA HISTORIA CUATERNARIA	49
Resumen	50
Abstract	52
Introducción	53
Materiales y métodos	57
Resultados	64
Discusión	68
Bibliografía	71
Anexo 1	81
Tablas	83
Leyendas de Figuras	98
Figuras	99
CONCLUSIÓN GENERAL	105

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Ubicación geográfica y altura de las 17 localidades estudiadas.

Tabla 2. Resume las ANDEVAS de una vía realizadas en cada localidad, para determinar diferencias en el largo de espinas entre los hospedantes parasitados y no parasitados por *Tristerix aphyllus*.

Tabla 3. Resume las ANDEVAS de una vía realizadas en cada localidad, para determinar diferencias en el grosor de la epidermis entre los hospedantes parasitados y no parasitados por *Tristerix aphyllus*.

CAPÍTULO II

Tabla 1. Muestra la ubicación geográfica y altura de las 17 localidades estudiadas.

Tabla 2. Resumen de los cebadores probados en el estudio

Tabla 3.1.1. Frecuencia de los haplotipos encontrados en los hospederos más comunes de *Tristerix aphyllus* (*Ec. chilensis*, *Eu. acida* y *Ec. deserticola*).

Tabla 3.1.2. Índices de diversidad por especie hospedera más común de *T. aphyllus* (*Ec. chilensis*, *Eu. acida* y *Ec. deserticola*) y en total.

Tabla 3.1.3: Muestra la tabla de AMOVA realizada a asociando a los haplotipos con los tres hospederos más comunes de *T. aphyllus* (*Eu. acida*, *Ec. chilensis* y *Ec. deserticola*).

Tabla 3.1.4. Valores de FST por especie hospedera *aphyllus* (*Ec. chilensis*, *Eu. acida* y *Ec. deserticola*).

Tabla 3.2.1. Frecuencia de los haplotipos encontrados en los hospederos más importantes de *Tristerix aphyllus*, que se encuentran en co-existencia (*Eu. acida* y *Ec. chilensis*).

Tabla 3.2.2. Índices de diversidad forzando a los haplotipos a agruparse con respecto a las especies hospederas *Eu. acida* y *Ec. chilensis*.

Tabla 3.2.3: Muestra la tabla de AMOVA realizada a asociando a los haplotipos con los dos hospederos más comunes de *T. aphyllus* (*Eu. acida* y *Ec. chilensis*), en las poblaciones en que coexisten.

Tabla 4.1. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las poblaciones estudiadas en el rango de distribución de *Tristerix aphyllus*.

Tabla 4.2. Índices de diversidad por localidad y en total

Tabla 4.3. Valores de FST por sitio de muestreo.

Tabla 5.1. Muestra los valores de varianza obtenidos en el análisis de SAMOVA, con los distintos valores de k.

Tabla 5.2: Valores de FST entre los grupos obtenidos por SAMOVA.

Tabla 5.3. Muestra los valores de índices de neutralidad de Tajima (D) y Fu (Fs), para cada uno de los grupos de poblaciones, determinados por los análisis de SAMOVA y Geneland.

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Mapa de los sitios estudiados entre las regiones de Atacama y Metropolitana.

Figura 2. A. Frutos maduros de *Tristerix aphyllus*. B. Semillas de *T. aphyllus*, limpias de pulpas y dispuestas en papel secante. C. Semillas de *T. aphyllus* puestas a germinar en condiciones de jardín común. D. Muestra la elongación de las radículas de *T. aphyllus*.

Figura 3. Muestra las regresiones entre la prevalencia del parasito (PP) y la abundancia relativa (AR) de los hospederos más comunes cuando *T. aphyllus* esta parasitando a *Eu. acida* y *Ec. chiloensis*, cuando se encuentran en simpatría.

Figura 4. Muestra las regresiones entre la prevalencia del parásito (PP) y la adecuación biológica (AB) de los hospederos *Eu. acida* y *Ec. chiloensis*.

Figura 5. Distribución geográfica de puntos calientes, calientes/tibios, fríos/tibios y fríos, cuando *T. aphyllus* esta parasitando a *Eu. acida* y *Ec. chiloensis*.

CAPÍTULO II

Figura 1: El mapa de las localidades estudiadas.

Figura 2. Frecuencia de los haplotipos de las poblaciones estudiadas en el rango de distribución de *Tristerix aphyllus*

Figura 3: Red de haplotipos para *Tristerix aphyllus* obtenidos mediante MJ.

Figura 4.1. En el mapa se señalan los grupos formados por el análisis de SAMOVA.

Figura 4.2. Isolineas de la probabilidad a posteriori de los grupos determinados a través de análisis con Genland.

Figura 4.3. Estructuración geográfica de *T. Aphyllus* según los análisis de Geneland y de SAMOVA

RESUMEN

La calidad de los hospederos es uno de los factores importantes en moldear la evolución de los parásitos. En principio, los parásitos podrían evolucionar altos niveles de especialización sobre hospederos de mejor calidad y los hospederos, por su parte, podrían reducir la explotación ejercida por los parásitos mediante la adquisición de caracteres que permitan tolerar la infección y/o impedir el establecimiento de los parásitos. Mientras la evolución de caracteres involucrados en la interfase parásito-hospedero puede producir coevolución antagónica, cuya evaluación a escala geográfica puede revelar un mosaico coevolutivo complejo caracterizado por ajustes y desajustes fenotípicos entre parásitos y hospederos. En esta tesis se evaluó la preferencia de *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) por alguna de sus principales especies hospederas cactáceas y se estableció el grado de ajuste y desajuste entre rasgos asociados a defensa y contradefensa. Además, se determinó la estructuración genética del parásito con respecto a la identidad de los hospederos más frecuentes y con respecto a patrones filogeográficos. Los resultados revelaron que aun cuando existen hospederos que son un mejor recurso para *Tristerix aphyllus*, este los parasita de acuerdo solo a la probabilidad de encuentro. Se observó que los niveles de ajuste en el sistema de defensa y contra defensa son débiles. La estructuración genética respondió a condiciones geográficas, históricas, de rasgos de historia de vida y ecológicas, más que a la interacción con las especies hospederas, lo cual sugiere que la interacción de *T. aphyllus*, con sus hospederos es reciente y no ha tenido tiempo suficiente para evolucionar rasgos asociados a la interacción, tanto en la planta parásita como en sus hospederos. En general, se detectó un complejo patrón geográfico de interacción que se caracteriza por

infección oportunista, en la mayoría de los casos, con ajustes lábiles de caracteres y estructura genética del parásito no asociada a la identidad de los hospederos.

ABSTRACT

Host quality is one of the most important factors in molding parasite evolution. In principle, parasites may evolve high levels of specialization on hosts that provide high quality resources. Hosts, in turn, may reduce exploitation by evolving traits that permit to tolerate infection and/or prevent parasite establishment. While the evolution of characters involved in the host-parasite interface may produce local antagonistic coevolution, when examined on a geographical scale high complex coevolutionary patterns may arise such as variable levels of host-parasite trait matching and heterogeneous chances for local coevolution. In this thesis I examined the preference of the mistletoe *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) for some cactus host species. In addition, I determined the extent to which defensive and counterdefensive traits exhibit consistent matches or mismatches across localities. Finally, I examined the genetic structure of *T. aphyllus* the extent to which the resulting structure could be accounted by geographic and historical factors or contemporary patterns of host-parasite interactions. Results revealed that although some hosts are a better resource for *T. aphyllus*, this parasite only according to the encounter probability. The observed of host-parasite matching traits displayed fragile levels of matching across localities. The observed genetic structure seemed to result from geographical, historical and ecological factors rather than from contemporary ecological interactions. In general, I found a complex geographical pattern of parasite-host association that is characterized by opportunistic infection, labile trait matching and parasite genetic structure unrelated to contemporary host identity.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El éxito reproductivo de los parásitos depende en gran medida de la calidad a los hospederos que parasitan (Gandon 2004, Forbes *et al.* 2002). A diferencia de las especies de vida libre, muchos parásitos no tienen la posibilidad de abandonar su hospedero inicial para escoger un nuevo hospedero, por lo que deben satisfacer todas sus necesidades nutricionales en el primer hospedero que encuentran (Thompson 1994). En principio, los parásitos podrían desarrollarse y reproducirse en una amplia gama de hospederos, algunos de los cuales serían un recurso de baja calidad en los cuales el parásito mostraría un pobre rendimiento (Kelly 1990, 1992, Matthies 1996, 1998, Gibson y Watkinson 1991). La preferencia por uno u otro hospedero evolucionaría cuando las especies hospederas difieren en calidad (e.g., capacidad nutricional, fisiología, historia de vida), cuando los hospederos son predecibles en el espacio y en el tiempo y cuando el parásito posee mecanismos capaces de seleccionar los hospederos que le proporcionan un mayor retorno en adecuación biológica (Norton y Carpenter 1998, Sicard *et al.* 2007).

Los hospederos suelen responder al impacto en adecuación impuesto por los parásitos mediante la evolución de rasgos que permiten tolerar la infección, reduciendo o eliminando los efectos dañinos causados por el parásito o bien desarrollando caracteres que evitan la infección o establecimiento del parásito (Ehrlich y Raven 1964, Gilbert y Raven 1975, Thompson 1994, Combes 2001, Bogusch *et al.* 2006). Como los parásitos dependen de los recursos de los

hospederos, deben evolucionar estrategias contradefensivas que les permitan superar las defensas impuestas por los hospederos (Poulin 2000), produciendo un sistema coevolutivo de adquisición de defensas y contradefensas entre hospederos y parásitos (Thompson y Burdon 1992, Koskela *et al.* 2000, Webster *et al.* 2004).

La teoría de mosaico geográfico coevolutivo (Thompson 1994, 2005) nos muestra a las especies como una colección de poblaciones, genéticamente diferenciadas cuya estructuración espacial puede modular fuertemente las dinámicas poblacionales. La selección actuaría diferencialmente sobre cada población, generando distintas trayectorias coevolutivas, lo que daría como resultado una red de conjuntos de genotipos y fenotipos que varían geográfica y temporalmente (Thompson 1994, Gómez y Zamora 2000, Brodie *et al.* 2002). La teoría permite evaluar si la coevolución antagónica se expresa en patrones definidos a nivel geográfico. En este sentido, es posible diferenciar localidades con una alta tasa de selección recíproca (sitios calientes) de otras con baja tasa de selección recíproca (sitios fríos). Los sitios calientes se caracterizan por poseer finos ajustes entre los rasgos claves en la interacción recíproca donde cualquier cambio fenotípico en uno de los interactuantes sería contrareestado por un cambio paralelo en la otra especie. Por el contrario, sitios fríos se caracterizan por presentar un bajo ajuste entre los rasgos. En esta situación un cambio en el fenotipo de una especie no se traduce en un cambio concomitante en la segunda especie lo cual refleja un bajo potencial para coevolucionar (Thompson 1994, 2005). Los niveles de ajuste, sin embargo, no resultan únicamente de los efectos

recíprocos entre las especies sino que pueden ser amplificados o amortiguados por la migración de individuos y flujos genéticos variables entre las poblaciones, lo cual tendería a homogenizar las diferencias existentes entre localidades. Esta relación entre adaptación local y migración es en última instancia la que produciría el mosaico geográfico complejo, en el cual las distintas poblaciones de especies de parásitos y hospederos se encontrarían en distintos estados del proceso coevolutivo (Thompson 1994).

Algunos trabajos han examinado la estructuración genética de distintas especies de plantas parásitas (Glazner *et al.* 1988, Paran *et al.* 1997, Olivier *et al.* 1998, Schmidt y Jensen 2000, Mutikainen y Koskela 2002, Jerome y Ford 2002), encontrado diversos niveles de estructuración genética los que en algunos casos se correlacionan con las especies hospederas (Jerome y Ford 2002), y en otros son atribuidos a variaciones en distintos rasgos de historia de vida, como sistemas de cruzamiento y mecanismos de dispersión de semillas, diferencias en el rango de distribución geográfica y eventos históricos. Jerome y Ford (2002) evaluaron la estructuración genética poblacional de *Arceuthobium americanum* en toda su distribución geográfica, donde la especie explota naturalmente a 14 especies de hospederos. Los autores encontraron que la estructuración genética de *A. americanum* está determinada fuertemente por las tres especies hospederas más importantes, por el aislamiento geográfico y por los factores ambientales. En el caso del hemiparásito *Viscum album* también se encontró una alta estructuración genética, que estuvo fuertemente asociada a los géneros de los árboles hospederos,

los que generan cuatro grupos de haplotipos que se corresponden con cuatro razas del parásito previamente descritas (Zuber y Widmer 2009).

Sistema de estudio

La familia Loranthaceae es la familia más diversa de plantas parásitas, con aproximadamente 700 especies distribuidas en 22 géneros alrededor del mundo (Molau 1995), a diversificado especialmente en las regiones subtropicales y tropicales de Centro y Sud América, África, Asia y Oceanía (Barlow 1983). En Centroamérica y Sudamérica se encuentran 16 géneros, con aproximadamente 250 especies. Uno de estos géneros, *Tristerix*, incluye 11 especies, que se distribuyen a lo largo de la Cordillera de los Andes desde el norte-centro de Colombia hasta el centro-sur de Chile.

Tristerix aphyllus es un muérdago holoparásito que se distribuye en Chile semiárido y mediterráneo (27 -35°S). Este tipo de parásitos se caracteriza por carecer totalmente de clorofila y por tanto son parásitos obligados que se nutren a través del xilema y floema de los hospedadores. *Tristerix aphyllus* parasita solo especies de cactus columnares pertenecientes a los géneros *Echinopsis* y *Eulychnia*. En total parasita ocho especies: *Echinopsis deserticola*, *Echinopsis litoralis*, *Echinopsis chiloensis*, *Echinopsis skottsbergii*, *Echinopsis coquimbana*, *Eulychnia breviflora*, *Eulychnia castanea* y *Eulychnia acida*, siendo las más comunes *Echinopsis chiloensis* y *E. acida*. Distinta evidencia geológica, climática y biogeográfica sugiere que la relación *Tristerix*-cactus pudo originarse hace ca. 5 millones de años ap

(Medel *et al.* 2002), tiempo desde el cual *T. aphyllus* probablemente se ha propagado a través de parasitar nuevas especies de cactus hospederos, hasta alcanzar su distribución actual en estricta dependencia de la distribución de las cactáceas hospedantes.

A diferencia de la mayoría de las lorantáceas, *T. aphyllus* tiene las hojas reducidas a diminutas escamas (Kuijt 1969, 1988). La única porción que emerge de la columna de los cactus es su inflorescencia constituida por flores rojas. La porción vegetativa existe como un endófito dentro del tejido del hospedero, y parasita el floema de los cactus (Mauseth *et al.*, 1984, 1985, Mauseth 1990). La floración de *T. aphyllus*, ocurre entre marzo y agosto, mostrando la mayor floración entre abril y junio (Medel *et al.* 2002), presentando un alto nivel de auto-compatibilidad (50%) y es parcialmente autogámica (Smith-Ramirez 1999, Medel *et al.* 2002). El único polinizador de las flores del parásito es el ave *Sephanoides sephaniodes*, que migra hacia el norte durante los meses de invierno. La maduración de los frutos ocurre entre abril y noviembre. Los frutos son pseudo-bayas con una sola semilla y contienen 80% agua. Al madurar se tornan rosado-pálido o blanco translúcido. La dispersión del muérdago tiene un único responsable, *Mimus thenca*, ave endémica de Chile que se distribuye desde Copiapó a Valdivia (Araya y Millie, 1986). *Mimus thenca* es un ave omnívora que se alimenta de *T. aphyllus* principalmente en los meses de invierno-primavera (julio-octubre) (Martínez del Río *et al.* 1995). El ave ingiere los frutos enteros y defeca las semillas mucilaginosas intactas, las que se adhieren a las espinas o cutícula del cactus (Martínez del Río *et al.* 1995, 1996,

Medel 2000, Medel *et al.* 2002, 2004). La época de fructificación del muérdago coincide con la época reproductiva de *M. thenca*, quien al menos en este periodo, defiende territorios de forrajeo que no exceden los 150 m de radio (Rivera-Huntel 2008). El ave favorece algunos cactus como percha, principalmente individuos que ya están infectados o han muerto (Martínez del Río 1995). La deposición de las semillas ocurre en promedio a 35 m de la planta madre (Rivera-Huntel 2008). Lo que favorece una distribución agregada del parásito (Martínez del Río *et al.* 1995, Rivera-Huntel 2008).

Las semillas germinan inmediatamente después de la deposición, la radícula crece durante aproximadamente ocho semanas o hasta que hace contacto con la epidermis del cacto, después de lo cual el muérdago desarrolla una placa haustorial de la cual varios filamentos penetran los tejidos del cactus, a través de la apertura estomática (Mauseth *et al.* 1984, 1985). La placa haustorial, es una estructura temporal que da lugar al endófito de la planta (Mauseth *et al.* 1985). El muérdago se desarrolla como endófito por aproximadamente 17 meses antes de emerger de los tejidos del cacto como una inflorescencia roja (Mauseth *et al.* 1984, 1985, Botto-Mahan *et al.* 2000).

Se ha comprobado que la infección por *T. aphyllus* decrece la producción de frutos y semillas en los hospedantes (*Echinopsis chiloensis* y *Eulychnia. acida*) y en algunos casos la reproducción es suspendida (Silva y Martínez del Río 1996; Medel 2000). Los efectos reproductivos de la infección probablemente causan que las cactáceas evolucionen rasgos que evitan el parasitismo. En este contexto las

espinas de los cactus hospedantes tendrían una doble función, por un lado serían una primera barrera a la infección evitando que las aves dispersoras perchen en el ápice de los cactus, lo que disminuiría la deposición de semillas en los cactus con espinas más largas (Medel 2000) Por otro lado, una vez que las semillas ya han sido depositadas sobre los cactus, las espinas servirían como una segunda barrera a la infección, debido a que espinas más largas aumentarían la distancia entre la semilla depositada y la cutícula del cactus, esta barrera es eficiente para las semillas que no tienen la habilidad de elongar extremadamente sus radículas, durante el proceso de infección (Medel *et al.* 2010). De hecho, Gonzáles (2007) evaluaron selección mediada por *Ec. chiloensis*, sobre la longitud de la radícula de *T. aphyllus*, encontrando que es un rasgo plástico y que está sujeto a selección impuesta por el cactus hospedador *Ec. chiloensis*. En este contexto, es interesante destacar que *T. aphyllus* presenta las radículas más largas reportadas para la familia Loranthaceae (Kuijt 1969).

Una vez que la radícula alcanza la cutícula del cactus, una tercera barrera para la infección es posible. Se sabe que los tejidos que reciben mayor exposición solar del cactus presentan un tejido epidérmico más grueso, por lo que la infección y emergencia del muérdago se da preferentemente en la exposición sur de la columna del cactus (Botto-Mahan *et al.* 2000). Los haustorios deben atravesar la epidermis del cactus para poder implantarse el parásito, por lo tanto un aumento en el grosor del tejido epidérmico podría disminuir el éxito en la implantación del muérdago.

En esta tesis se estudiaron 17 localidades donde *Tristerix aphyllus* infecta a sus hospederos más importantes (*Ec. chilensis* y *Eu. acida*), determinando la prevalencia y la adecuación biológica del muérdago. Además se midieron rasgos de defensa y de contra-defensa del hospedero y del muérdago en cada población, y finalmente se caracterizaron los patrones de diversidad genética del muérdago. Con esta información se abordaron las siguientes preguntas: ¿El muérdago presenta preferencia por alguno de los hospederos? ¿ Hay ajustes recíprocos entre rasgos de defensa y contra-defensa de los hospederos y del muérdago? ¿*Tristerix aphyllus* se estructura genéticamente con respecto a la identidad de los hospederos más comunes?

PREGUNTAS E HIPÓTESIS

I. ¿El muérdago presenta preferencia por alguno de los hospederos?

Dado que *T. aphyllus* infecta a distintas especies de hospederos a lo largo de su distribución y que estos puedan diferir en su calidad como recurso, se espera que el muérdago presente una mayor prevalencia en el hospedero que le confiera una mayor adecuación biológica independientemente de su abundancia relativa.

II. ¿ Hay ajustes recíprocos entre rasgos de defensa y contradefensa del hospedero y del muérdago?

Dado que *T. aphyllus* infecta a distintas especies de hospederos a lo largo de su distribución, el nivel de ajuste entre rasgos de defensa y contra-defensa debiera variar geográficamente (con algunos puntos de alto y bajo potencial coevolutivo) en asociación a los distintos ambientes selectivos.

III.¿ *T. aphyllus* se estructura genéticamente con respecto a la identidad de los hospederos más comunes?

Si los hospederos de *T. aphyllus* ejercen fuertes presiones selectivas sobre el muérdago, se espera que la estructuración genética de *T. aphyllus* se relacione con la identidad de sus principales hospederos

OBJETIVO GENERAL

Detectar evidencias de evolución diferencia de *Tristerix aphyllus* con respecto a sus principales hospederos en las zona árida y semiárida de Chile.

Objetivos específicos

1. Determinar si existe preferencia de *T. aphyllus* por alguno de sus hospederos más comunes.
2. Determinar si la adecuación biológica *T. aphyllus* varía con la identidad del hospedero.
3. Determinar si existen diferencias en los rasgos asociados a defensa contra el parasitismo (largo de espina y grosor de la epidermis) en las porciones parasitadas y no parasitadas de los hospederos principales.
4. Determinar si hay ajuste recíprocos entre rasgos de defensa y contra-defensa (largo de espina *versus* largo máximo de la radícula), del parásito y sus hospederos más comunes.
5. Establecer si la estructuración genética de *T. aphyllus* es determinada por sus hospederos principales, o puede correlacionarse con factores históricos.

REFERENCIAS

- Araya B. and Millie G. 1986. Guía de campo de las aves de Chile. Editorial Universitaria. Santiago, Chile.
- Barlow BA. 1983. Biogeography of Loranthaceae and Viscaceae. In D. M. Calder and P. Bernhardt [eds.], The biology of mistletoes, 19-45. Academic Press, New York, New York, USA.
- Bogusch P, Kratochvíl L and Straka J. 2006. Generalist cuckoo bees (Hymenoptera: Apoidea: *Sphecodes*) are species-specialist at the individual level. Behav Ecol Sociobiol 60: 422-429.
- Botto-Mahan C, Medel R, Ginocchio R and Montenegro G. 2000. Factors affecting the circular distribution of the leafless mistletoe *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) on the cactus *Echinopsis chilensis*. Revista Chilena de Historia Natural 73: 525-531.
- Brodie ED Jr, Ridenhour BJ and Brodie ED III. 2002. The evolutionary response of predators to dangerous prey: hotspots and coldspots in the geographic mosaic of coevolution between garter snakes and newts. Evolution 56: 2067-2082.
- Combes C. 2001. Parasitism. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Ehrich PR and Raven PH. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18: 586-608.
- Forbes MR, Muma KE and Smith BP. 2002. Diffuse coevolution: constraints on a generalist parasite favour use of a dead-end host. Ecography 25: 345-351.

- Follman G and Mahú M. 1964. Las plantas huéspedes de "*Phrygilanthus aphyllus*" (Miers) Eichl. Boletín de la Universidad de Chile, Ciencias, 7: 39-41
- Gandon S. 2004. Evolution of multihost parasites. *Evolution* 58: 455-469.
- Gibson CC, Watkinson AR. 1989. The host range and selectivity of a parasitic plant: *Rhinanthus minor* L. *Oecologia* 78: 401-406.
- Gilbert LE and Raven PH. 1975. *Coevolution of Animals and Plants*. University of Texas Press, Austin, TX, USA.
- Glazner JT, Devlin B and Ellstrand NC. 1988. Biochemical and morphological evidence for host race evolution in desert mistletoe, *Phoradendron californicum* (Viscaceae). *Plant Systematics and Evolution* 161: 13-21.
- Gómez JM and Zamora R. 2000. Spatial Variation in the Selective Scenarios of *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *The American Naturalist* 155: 657-668.
- González WL. 2007. Valor adaptativo de la longitud de la radícula de la planta holoparásita *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae): Detectando causas de selección natural. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Jerome CA and Ford BA. 2002. The discovery of three genetic races of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) provides insight into the evolution of parasitic angiosperms. *Molecular Ecology* 11: 387-405.
- Kelly CK. 1990. Plant foraging: a marginal value model and coiling response in *Cuscuta subinclusa*. *Ecology* 71:1916- 1925

- Kelly CK. 1992. Resource choice in *Cuscuta europaea*. Proc Natl Acad Sci 89:12194–12197
- Koskela T, Salonen V, Mutikainen P. 2000. Local adaptation of a holoparasitic plant, *Cuscuta europaea*: variation among populations. Journal of Evolutionary Biology 13: 749–755.
- Kuijt J. 1969. The biology of parasitic flowering plants. University of California Press, Berkeley, California.
- Kuijt, J. 1988. Revision of *Tristerix* (Loranthaceae). Systematic Botany Monograph No. 19, American Society of Plant Taxonomists.
- Martínez del Río C, Hourdequin M, Silva A and Medel R. 1995. The influence of cactus size and previous infection on bird deposition of mistletoe seeds. Australian Journal of Ecology 20: 571-576.
- Martínez del Río C, Silva A, Medel R and Hourdequin M. 1996. Seed dispersers as disease vectors: bird transmission of mistletoe seeds to plant hosts. Ecology 77: 912-921.
- Matthies D. 1996. Interactions between the root hemiparasite *Melampyrum arvense* and mixtures of host plants: heterotrophic benefit and parasite-mediated competition. Oikos 75:118–124
- Matthies D. 1998. Influence of the host on growth and biomass allocation in the two facultative root hemiparasites *Odontites vulgaris* and *Euphrasia minima*. Flora 193: 187–193

- Mauseth JD. 1990. Morphogenesis in a highly reduced plant: the endophyte of *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae). *Botanical Gazette* 151: 348-353.
- Mauseth JD, Montenegro G and Walckowiak AM. 1984. Studies of the holoparasite *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) infecting *Trichocereus chilensis* (Cactaceae). *Canadian Journal of Botany* 62: 847-857.
- Mauseth JD, Montenegro G and Walckowiak AM. 1985. Host infection and flower formation by the parasite *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae). *Canadian Journal of Botany* 63: 567- 581.
- Medel R. 2000. Assessment of parasite-mediated selection in a host-parasite system in plants. *Ecology*. 81: 1554-1564.
- Medel R, Botto-Mahan C, Smith-Ramírez C, Méndez MA, Ossa CG, Caputo L and Gonzáles WL. 2002. Historia natural cuantitativa de una relación parásito-hospedero: el sistema *Tristerix*-cactáceas en Chile semiárido *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 127-140.
- Medel, R., E. Vergara, A. Silva, and M. Kalin-Arroyo. 2004. Effects of vector behavior and host resistance on mistletoe aggregation. *Ecology* 85: 120–126.
- Medel R, Méndez MA, Ossa CG. and Botto-Mahan C. 2010. Arms Race Coevolution: The Local and Geographical Structure of a Host–Parasite Interaction. *Evolution, Education & Outreach* 3:26–31 27
- Molau U. 1995. Reproductive ecology and biology. In M. C. Press and J. D. Graves (eds.), *Parasitic Plants*. Chapman & Hall, London, pp. 141–176

- Mutikainen P and Koskela T. 2002. Population structure of a parasitic plant and its perennial host. *Heredity* 89(4):318-24
- Nickrent DL, García MA, Martín MP and Mathiasen RL. 2004. A Phylogeny of All Species of *Arceuthobium* (Viscaceae) using nuclear and chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany* 91: 125-138.
- Norton DA and Carpenter MA. 1998. Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 13:101-105.
- Olivier A, Glaszmann JC, Lanaud C and Leroux GD. 1998. Population structure, genetic diversity and host specificity of the parasitic weed, *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) in Sahel. *Plant Systematics and Evolution*, 209: 33-45.
- Paran I, Gidoni D and Jacobsohn R. 1997. Variation between and within broomrape (Orobanche) species revealed by RAPD markers. *Heredity*, 78, 68-74.using AFLP markers. *Molecular Ecology*. 5: 735-745.
- Poulin R. 2000. *Evolutionary Ecology of Parasites* (second edition) 2007. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Rivera-Hutinel A. 2008. Ecología espacial y epidemiología del muérdago *Tristerix aphyllus*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ecología Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- Sicard D, Pennings PS, Grandclément C, Acosta J, Kaltz O and Shykoff JA. 2007. Specialization and local adaptation of a fungal parasite on two host plant species as revealed by two fitness traits. *Evolution* 61: 27-41.

- Silva A and Martínez del Río C. 1996. Effects of the mistletoe *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) on the reproduction of its cactus host *Echinopsis chilensis*. *Oikos* 75: 437-442.
- Schmidt K and Jensen K. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal of Botany* 87: 678-689.
- Smith-Ramírez C. 1999. Selección fenotípica secuencial sobre rasgos reproductivos del muérdago *Tristerix aphyllus*. Tesis conducente al grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Thompson, J.N. 1994. *The Coevolutionary Process*. University of Chicago Press, Chicago, IL and London, UK.
- Thompson JN. 2005. *The Geographic Mosaic of Coevolution*. University of Chicago Press.
- Thompson JN and Burdon JJ. 1992. Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature* 360: 121-125.
- Zuber D and Widmer A. 2009. Phylogeography and host race differentiation in the European mistletoe (*Viscum album* L.). *Mol Ecol* 18:1946-1962.
- Webster JP, Cogger CM and Blair L. 2004. Do hosts and parasites coevolve? Empirical support from the *Schistosoma* System. *The American Naturalist* 164: S33-S51.

CÁPITULO I

PREFERENCIA Y AJUSTES ENTRE RASGOS DE DEFENSA Y CONTRA DEFENSA EN EL HOLOPARÁSITO *TRISTERIX APHYLLUS* Y SUS CACTUS HOSPEDEROS

RESUMEN

La calidad de los hospederos es uno de los factores importantes en moldear la evolución de los parásitos. En principio, los parásitos podrían evolucionar altos niveles de preferencia sobre hospederos de mejor calidad y los hospederos, por su parte, podrían reducir la explotación ejercida por los parásitos mediante la adquisición de caracteres que permitan tolerar la infección y/o impedir el establecimiento de los parásitos. La evolución de caracteres involucrados en la interfase parásito-hospedero puede producir coevolución antagónica, cuya evaluación a escala geográfica puede revelar un mosaico coevolutivo complejo caracterizado por ajustes y desajustes fenotípicos entre parásitos y hospederos. En este trabajo se evaluó la preferencia de *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) por alguna de sus principales especies hospederas cactáceas, se estableció si existe evidencia de defensa al parasitismo en las especies hospederas y se estableció el grado de ajuste y desajuste entre rasgos asociados a defensa y contradefensa. Los resultados revelaron que *T. aphyllus*, no prefiere a ningún hospedero en particular. A pesar de que los hospederos muestran una tendencia a desarrollar caracteres tendientes a evitar la infección, no se observa un ajuste en el sistema de defensa y contra defensa, lo que podría ser causado porque las interacciones locales serían muy recientes y por tanto los interactuantes no habrían tenido tiempo para generar relaciones coevolutivas más intensas.

ABSTRACT

Host quality is an important factor in molding the evolution of the parasites. In principle, the parasites could evolve high levels of preference in hosts of higher quality. Host in turn, could reduce the exploitation made by parasites evolving traits that permit to tolerate infection and/or prevent parasite establishment. While the evolution of the characters involved in the parasite-host interface can produce local antagonistic co-evolution, when examined on a geographical scale high complex coevolutionary patterns may arise such as variable levels of host-parasite trait matching and heterogeneous chances for local coevolution. In this work the preference of the *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) for some of his main cactacea host species was evaluated, it was established if there was evidence of defense against parasitism in the host species, and it was also established the degree of matches and mismatches between the characters related to defense and counter-defense. Results revealed that *T. aphyllus* not prefer any host , in fact the fitness was not different between hosts. Nevertheless, the host seem develop trait associated with the defence to the parasitism. The observed of host-parasite matching traits displayed fragile levels of matching across localities, which could be caused because the local interactions are recent, that the participants would not have time to generate stronger co-evolutionary relations.

INTRODUCCIÓN

Comprender los factores que promueven la evolución de la especialización ha sido uno de los grandes desafíos de la Biología Evolutiva, ya que el nivel de especialización es un aspecto fundamental en las interacciones entre especies, que puede tener un profundo efecto en la ecología y evolución de los organismos, así como en el funcionamiento de las comunidades (Thompson 1994, 2005; Vásquez *et al.* 2005). En las interacciones parásitos-hospedero los niveles de especialización son particularmente altos, se ha descrito que muchas especies parásitas tienden a explotar una o pocas especies de hospederos (Gregory *et al.* 1991; Poulin 1992). A pesar de lo cual, las plantas parásitas suelen presentar un amplios rangos de hospedantes (Press y Graves, 1995), posiblemente porque muchas de ellas son dispersadas por animales (Sargent 1995, Aukema y Martínez del Río 2002), lo que limitaría fuertemente su capacidad de encuentro con los hospederos (Chuang y Heckard 1971, Watkinson y Gibson 1988, Gibson y Watkinson 1989, Musselman y Press 1995). Al mismo tiempo, muchas especies plantas parásitas parecen ser incapaces de discriminar entre los posibles hospederos, aunque algunos de ellos sean perjudiciales para su adecuación biológica (Cameron *et al.* 2006), de este modo, la dieta de las parásitas incluiría indistintamente a hospederos en los cuales tienen un crecimiento vigoroso y una alta reproducción, como a hospederos que le son apenas suficiente para mantener la vida (Atsatt y Strong 1970, Chuang y Heckard 1971, Kelly 1990; Matthies 1996, 1998, Gibson y Watkinson 1991). Sin

embargo, algunas especies de plantas parásitas, son capaces de elegir a sus hospedantes mediante la producción de semillas que rompen su latencia sólo cuando detectan ciertas señales liberadas por el o los hospederos de interés (Kuijt 1969, Atsatt 1977, 1983, Gibson y Watkinson 1989, Press et al. 1990, Kelly 1992, Pennings y Callaway 1996).

Por otro lado, los hospederos no son víctimas pasivas de sus parásitos, por el contrario, los hospederos suelen evolucionan sistemas defensivos que limitan, reducen o eliminan los efectos dañinos causados por sus parásitos (tolerancia a la infección) o bien, desarrollan estrategias que evitan la infección o implantación de los mismos (resistencia a la infección) (Ehrlich y Raven 1964, Gilbert y Raven 1975, Thompson 1994, Combes 2001, Bogusch *et al.* 2006). Los parásitos, por su parte, al depender completamente de los recursos proporcionados por los hospederos, debieran favorecer estrategias que les permitan superar los sistemas defensivos impuestos por los hospederos (Poulin *et al.* 2000). En consecuencia, es esperable detectar coevolución antagónica entre hospederos y parásitos, que se puede expresar en distintos grados de ajustes genéticos y fenotípicos entre las especies interactuantes (Thompson y Burdon 1992, Koskela *et al.* 2000, Webster *et al.* 2004).

Tristerix aphyllus es una planta holoparásita que crece en Chile árido y semiárido, donde explota ocho especies de cactáceas columnares que se presentan en diferentes combinaciones a lo largo del rango de distribución, siendo las principales especies hospedantes *Echinopsis chiloensis* y *Eulychnia acida*. Además el

muérdago posee un único dispersor el ave *Mimus thenca*, y un único polinizador el ave *Sephanoides sephaniodes*.

A una escala poblacional se ha demostrado que los individuos de *Echinopsis chilensis* y *Eulychnia acida* con espinas apicales más largas presentan una menor tasa de visitas de *Mimus thenca*, debido a que el ave preferiría a los individuos con espinas apicales cortas como percha, de este modo, los individuos con espinas más largas presentarían una menor prevalencia del parásito y consecuentemente una mayor producción de frutos y semillas (Medel 2000). El largo de las espinas podría no solo estar afectando la deposición de las semillas sobre los hospederos, si no también podrían actuar como una segunda barrera a la infección, ya que espinas más largas eventualmente alejarían a las semillas del muérdago de la epidermis del cactus, a distancias a las que la radícula no podría sortear (Medel *et al.* 2010). Otro rasgo defensivo que podría impedir la infección es el grosor de la epidermis. Botto-Mahan *et al.*, (2000) mostró que la implantación del parásito se produce generalmente por la porción suroeste de la columna del cactus, que es la zona donde la epidermis es más delgada.

A nivel geográfico se a observado que las distintas especies de hospederos presentan distintos largos de espinas, lo que se correlaciona positivamente con la prevalencia del parásito, sugiriendo que el largo de las espinas se asocia a selección mediada por el parásito (Medel *et al.* 2010). Por consiguiente la longitud de espinas de los cactus y el largo de la radícula del muérdago son rasgos clave para entender la relación adaptativa entre parásito-hospedero en este grupo de especies.

En este capítulo se indaga la interacción de *T. aphyllus* con sus principales hospederos *Eu. acida* y *Ec. chiloensis*. En particular, se examinará, a) si existe preferencia de la planta parásita por alguno de sus hospederos más comunes, b) si hospederos responden al parasitismo aumentando largo de espinas o grosor de epidermis, y c) si existen evidencias de ajuste de rasgos de defensa (largo de espinas) y contra-defensa (largo máximo de radícula) entre parásito-hospedero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se realizó en 17 localidades entre la regiones de Atacama y Metropolitana (Tabla 1, Figura 1), donde se encontraron cactáceas columnares de las especies *Eulychnia acida* y *Echinopsis chiloensis* infectadas por *T. aphyllus*. En cada una de las localidades se determinó: 1) abundancia relativa de cada hospedero, mediante transectos de 50 m, 2) prevalencia del parásito por especie de hospedero y, 3) adecuación biológica del parásito como número de frutos por infrutescencia por hospedero. Además, en cada localidad se midieron rasgos cuantitativos que presumiblemente están sujetos a selección recíproca, tales como el largo máximo de la radícula del parásito (LR), largo de espinas del hospedero (LE), y grosor de la epidermis del hospedante (GE) (ver Botto-Mahan *et al.* 2000).

El LE se midió directamente, con un pie de metro digital, eligiendo las espinas mayores de 20 areolas, en al menos 15 individuos infectados por *T. aphyllus* y 15 individuos no infectados. Esto se realizó en cada una de las especies de hospederos existentes por localidad. A los mismos individuos, se les extrajeron tres muestras de tejido con un sacabocado, para medir el grosor de la epidermis directamente usando un pie de metro digital, a distintas alturas del cactus y siempre desde la porción con exposición sur (ver Botto-Mahan *et al.* 2000). Para determinar el largo máximo de radícula, se recolectaron 10 frutos de *T. aphyllus* provenientes de 10 a 25 plantas. La recolección se realizó sobre todas las especies de hospederos presente en cada localidad estudiada. Los frutos fueron llevados al

laboratorio, donde una vez removida la pulpa, se pusieron a germinar las semillas sobre papel secante en placas Petri, las semillas se regaron dos veces al día (8:30 am y 6:30 pm) (Figura 2). Una vez que las radículas dejaron de crecer, después de aproximadamente 8 semanas, se midió el largo máximo alcanzado.

Análisis de datos. Para comparar la preferencia por uno u otro de los hospederos más comunes cuando están en simpatria, realizamos un análisis de selección frecuencia-dependiente según el modelo de Greenwood y Eaton (1979), que relaciona el consumo del recurso con la disponibilidad del mismo:

$$PP(A)/PP(H) = V * [AR(A)/AR(H)]^b$$

donde PP(A) y PP(H) son las prevalencias de *Eu. acida*(A) y *Ec. chiloensis* (H); AR(A) y AR(H) son las abundancias relativas de cada especie, V es la selectividad por un hospedero cuando abundancias relativas de estos son iguales, y b es la medida del grado de frecuencia-dependencia de la selectividad. Cuando $b < 1$ la selección es antiapostática, cuando $b = 1$ la selección es frecuencia-independiente y cuando $b > 1$ la selección es apostática (Greenwood y Elton 1979; ver aplicaciones en Celis-Diez y Bustamante 2005). Para determinar si $b=1$, se realizó una prueba de comparación de pendientes sobre regresión lineal log/log (Zar 1999).

Además comparamos la adecuación biológica de *T. aphyllus* creciendo en *E. acida* y *Ec. chiloensis* con una prueba de t de Student.

Para comprender la importancia de los caracteres defensivos de los hospederos se comparó el largo de las espinas (LE) y el grosor de la epidermis (GE), entre las fracciones parasitadas y no parasitadas de cada especie de hospedero en cada localidad estudiada, a través de ANDEVAS de una vía.

Respecto a los rasgos de la interfase de la interacción, se evaluó la correspondencia en las longitudes de espinas y radículas en las especies hospederas más comunes en cada una de las localidades estudiadas. Para esto se determinó el índice de ajuste M (Medel *et al.* 2010):

$$M = \frac{|(\text{largo espina}) - (\text{largo radícula})|}{(\text{largo espina})}$$

el cual permitió evaluar los niveles de ajuste entre LR y LE tanto a nivel de hospederos como de localidades. Las localidades y hospederos que muestran un mejor ajuste ($M = 0$), son llamados 'puntos calientes', lo que indicaría un alto potencial para la coevolución, ya que es altamente probable que cambios en el rasgo de una especie, provoquen fuertes cambios en la adecuación biológica e intensa selección sobre la otra especie. Por el contrario, altos niveles de desajuste ($M = 1$) reflejarían un bajo potencial para coevolución (puntos fríos) ya que un cambio en el fenotipo de una de las especies no necesariamente modifica la adecuación biológica de la otra especie, reduciendo la intensidad de selección. Se determinaron rangos para los niveles de ajuste y desajuste, $M = 0 - 0,25$,

correspondería un 'punto caliente', $M = 0,26 - 0,50$, indicaría un 'punto caliente/tibio', $M = 0,51 - 0,75$ mostraría un 'punto frío/tibio' y $M = 0,76 - 1,0$ indicaría un 'punto frío'. Se observó la distribución de los puntos fríos y calientes geográficamente. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa JMP versión 5.

RESULTADOS

Preferencia. La prevalencia de parasitismo varió sustantivamente entre localidades (Tabla 2), con algunas de ellas mostrando más del 50% de los individuos parasitados (HGII, CB, CL y FA). Al evaluar si el muérdago presentaba preferencia por alguno de los hospederos más comunes (*Ec. chilensis* y *Eu. acida*) en poblaciones simpátrica, no se encontró evidencias de selectividad ($V=1$) ni una relación entre esta y la abundancia relativa de cada hospedero ($b= 1,09$; $t_4= 0,28$; $p= 0,4$, ver figura 3). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la adecuación biológica de *T. aphyllus* cuando parasita a *Eu. acida* o *Ec. chilensis* ($t_{10} = 0,29$; $p= 0,77$).

Respuesta de hospederos. Se encontraron diferencias significativas en el largo de la espina y el grosor de la epidermis entre las porciones parasitadas y no parasitadas de *Eu. acida* y *Ec. chilensis*, pero solo en algunas de las localidades (Tabla 3). El 36% de las poblaciones *Eu. acida*, y el 40% de las de *Ec. chilensis* mostraron diferencias significativas en el largo de las espinas, y en casi todos los casos las espinas de los cactus infectados fueron más pequeñas que la de los cactus no parasitados. Asimismo, el 45% de las localidades de *Eu. acida* y el 40% de las de *Ec. chilensis* mostraron diferencias en el grosor de la epidermis, donde siempre la porción no parasitada presentó epidermis más gruesas que la porción parasitada. Estos resultados sugieren que las especies de hospederos más comunes generan defensas para evitar la infección por *T. aphyllus*, al menos en estas localidades.

Ajuste entre rasgos de defensa y contra-defensa. No se encontró una relación significativa entre el largo de las espinas y el largo de la radícula en *Eu acida* ($LR= 40,114 + 0,095(LE)$; $R_2= 0,052$, $F_{1,10}= 0,217$; $p= 0,665$.) ni tampoco en *Ec chiloensis* ($LR= 30,997 + 0,072(LE)$; $R_2= 0,017$, $F_{1,10}= 0,068$; $p= 0,897$) al considerar las poblaciones en su conjunto. Tampoco se observó evidencias de potencial coevolutivo al analizar las localidades individualmente a través del índice M. Ninguna poblaciones presentó valores menores a 0.25, que pudiesen asociarse a puntos calientes, y solo una localidad alcanzó un valor superior a 0.76 (Farellones). La mayoría de las localidades estudiadas presentaron valores de M intermedios ($M= 0,25-0,75$) indicando la existencia de puntos tibios/fríos y tibios/calientes que no se asocian ni con la diversidad de especies de hospederos ni con la zona geográfica (Figura 4).

DISCUSIÓN

Tristerix aphyllus presenta varias combinaciones de especies de hospederos que coexisten a lo largo de la distribución, siendo *Eu. acida* y *Ec. chiloensis* las especies hospederas más importantes, por su amplia distribución y por la fuerte prevalencia de *T. aphyllus* sobre ellas. En principio se esperara que los parásitos prefieran a hospederos de mejor calidad como recurso, ya que de esto depende en gran medida el éxito reproductivo del parásito (Gandon 2004). Sin embargo, los resultados muestran que el parásito no está seleccionando a sus hospederos y, como es de esperar, tampoco muestra diferencias en la adecuación biológica asociada a la identidad del hospedero.

Las plantas parásitas al no poder abandonar a su hospedero inicial para escoger a uno mejor, suelen satisfacer todas sus necesidades nutricionales en el primer hospedero que infectan (Thompson 1994), independientemente de la calidad de este como recurso (Kelly 1990, Matthies 1996, 1998). Es posible que la planta haya desarrollado caracteres fisiológicos más plásticos para poder maximizar su adecuación biológica independientemente de la especie de hospedero infectado. Por otro lado, *T. aphyllus* presenta una distribución altamente agregada (Medel *et al.* 2004), debido a la conducta de su dispersor, el ave *Mimus thenca* que defiende territorios estrechos durante la época de fructificación del muérdago, lo que limitaría las posibilidades dispersión de las semillas a grandes distancias (Rivera-Hutinel 2008), obligando al parásito a infectar mayoritariamente solo a los

hospederos que le es posible alcanzar, independiente de su identidad y de su calidad como recurso.

Por su parte, los cactus parecen estar generando defensas para evitar la infección por *T. aphyllus*, las que serían particularmente importantes en algunas localidades, donde los cactus sanos presentan espinas de mayor longitud que los infectados (ver González 2007, Medel 2000, Medel *et al.* 2010), sin embargo, el patrón es complejo y difícil de interpretar. El grosor de la epidermis, rasgo asociado a la limitación de la implantación del muérdago (ver Botto-Mahan *et al.* 2000), también muestra diferencias significativas entre la porción parasitada y no parasitada de los hospederos principales en algunas localidades. Aun cuando no se observa un efecto generalizado del parasitismo en este rasgo, es interesante notar que las diferencias en el grosor de la epidermis entre las porciones parasitadas y no parasitadas de *Eu. acida* se observan en el norte de la distribución, donde esta especie es el hospedero principal, mientras que en *Ec. chiloensis*, las diferencias se observan en las localidades del sur, donde *Ec. chiloensis* es el hospedero más frecuente (ver Tabla 3). Estos resultados sugieren que el grosor de la epidermis podría estar sujeto a selección mediada por el parásito, lo que debiera ser estudiado más profundamente en el futuro.

La teoría de mosaico geográfico coevolutivo (Thompson 2005), señala que la interacción parasito-hospedero debiera variar espacialmente, encontrándose ambientes donde la suma de interacciones entre parásitos y hospederos es fuerte (puntos calientes) y ambientes donde es débil (puntos fríos). Al evaluar los ajustes

y desajustes entre caracteres de defensa y contra-defensa se observa que en general estos rasgos interactúan débilmente, mostrando a lo largo del muestreo puntos mayoritariamente tibios. Modelos clásicos sugieren que un alto número de hospederos o un alto flujo génico del parásito homogeneizaría a las poblaciones a través del tiempo, lo que reduciría el nivel de adaptación local (Holt y Gomulkiewicz 1997). Mientras otros señalan que cuando el flujo génico del parásito es mayor que el de los hospederos, se esperaría adaptación local más pronunciada, causada por un aumento en la variación genética de las poblaciones de parásitos, lo que causaría el aumento de la eficacia de la selección (Gandon *et al* 1996, Lively 1999, Gandon y Michalakis 2002, ver Greischar y Koskela 2007). La mayoría de las semillas de *T. aphyllus* son dispersadas apenas a 35 metros de la planta madre (Rivera-Hutinel 2008), lamentablemente no hay información sobre la dispersión de las semillas de los cactus hospederos. Otra explicación posible que los rasgos evaluados estén respondiendo a presiones selectivas generadas por la interacción con otros organismos, que relajarían los patrones coevolutivos entre el parásito y hospederos (Thompson 2005).

Es importante señalar que la ocurrencia de coevolución antagónica entre parásitos y hospederos no depende solamente del potencial para evolucionar de los interactuantes, sino también de la historia de la interacción en cada una de las localidades (ver Nuismer y Thompson 2006). En este sentido, es probable que la escasa detección de interacciones fuertes entre parásito y hospederos se deba a que las interacciones locales son demasiado recientes (ver capítulo II), por lo que

los interactuantes no habrían tenido tiempo para generar relaciones coevolutivas más intensas.

REFERENCIAS

- Aukema JE, Martínez del Río C. 2002. Variation in mistletoe seed deposition: effects of intra- and interspecific host characteristics. *Ecography* 25:139-144
- Atsatt PR. 1977. The insect herbivore as a predictive model in parasitic seed plant biology. *Am Nat* 111:579-612
- Atsatt PR. 1983. Host-parasite interactions in higher plants. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Encyclopedia of plant physiology*, 12C new series edition. Springer, Berlin, pp 519-535
- Atsatt PR, Strong DR. 1970. The population biology of annual grassland hemiparasites. I. The host environment. *Evolution* 24:278-291
- Bogusch P, Kratochvíl L and Straka J. 2006. Generalist cuckoo bees (Hymenoptera: Apoidea: Sphecodes) are species-specialist at the individual level. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 422-429.
- Botto-Mahan C, R Medel, R Ginocchio and G Montenegro. 2000. Factors affecting the circular distribution of the leafless mistletoe *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) on the cactus *Echinopsis chilensis*. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 525-531.
- Cameron DD, Coats AM, Seel WE. 2006. Differential resistance among host and non-host species underlies the variable success of the hemiparasitic plant *Rhinanthus minor*. *Ann Bot* 98:1289-1299

- Chuang T-I, Heckard LR. 1971. Observations on root-parasitism in *Cordylanthus* (Scrophulariaceae). *Am J Bot* 58:218-228
- Combes C. 2001. Parasitism. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Celis-Diez JL and RO Bustamante. 2005. Frequency-dependent seed size selection on *Cryptocarya alba* (Mol.) Looser (Lauraceae): testing the effect of background. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 137-142.
- Ehrich PR and Raven PH. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Gandon, S., Capowiez, Y., DuBois, Y., Michalakis, Y. & Olivieri, I. 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263, 1003- 1009.
- Gandon, S, Michalakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.*, 15, 451-462.
- Gandon S.. 2004. Evolution of multihost parasites. *Evolution*. 58: 455-469.
- Gibson CC and Watkinson AR. 1989. The host range and selectivity of a parasitic plant: *Rhinanthus minor*. *Oecologia* 78: 401-406.
- Gibson CC, Watkinson AR .1991. Host selectivity and the mediation of competition by the root hemiparasite *Rhinanthus minor*. *Oecologia* 86:81-87
- Gilbert LE and Raven PH. 1975. *Coevolution of Animals and Plants*. University of Texas Press, Austin, TX, USA.

- González WL, Suárez LH, Guiñez R and Medel R. 2007. Phenotypic plasticity in the holoparasitic mistletoe *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae): consequences of trait variation for successful establishment. *Evol Ecol* 21:431-444.
- Greischar MA, Koskela B. 2007. A synthesis of experimental work on parasite local adaptation. *Ecol Lett* 10:418-434.
- Gregory RD. et al. 1991. Life history, ecology and parasite community structure in Soviet birds. *Biol. J. Linn. Soc.* 43: 249-262.
- Greenwood JJD, Elton R. 1979. Analyzing experiment on frequency-dependent selection by predators. *Journal of Animal Ecology* 48: 721-737.
- Holt, R.D. and Gomulkiewicz, R. 1997. How does immigration influence local adaptation? A reexamination of a familiar paradigm. *Am. Nat.*, 149, 563-572.
- Kelly CK .1990. Plant foraging: a marginal value model and coiling response in *Cuscuta subinclusa*. *Ecology* 71:1916- 1925
- Kelly CA. 1992. Spatial and temporal variation in selection on correlated life-history traits and plant size in *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution* 46:1658-1673.
- Koskela T, Salonen V, Mutikainen P. 2000. Local adaptation of a holoparasitic plant, *Cuscuta europaea*: variation among populations. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 749-755.
- Kuijt. 1969. The biology of parasitic flowering plants. University of California Press, Berkeley, California. 246 pp.

- Lively, C.M. 1999. Migration, virulence, and the geographic mosaic of adaptation by parasites. *Am. Nat.*, 153, S34-S47.
- Matthies D. 1996. Interactions between the root hemiparasite *Melampyrum arvense* and mixtures of host plants: heterotrophic benefit and parasite-mediated competition. *Oikos* 75:118-124
- Matthies D. 1998. Influence of the host on growth and biomass allocation in the two facultative root hemiparasites *Odontites vulgaris* and *Euphrasia minima*. *Flora* 193: 187-193
- Medel R. 2000. Assessment of parasite-mediated selection in a host-parasite system in plants. *Ecology* 81: 1554 -1564
- Medel R, Vergara E, Silva A, Kalin-Arroyo M. 2004. Effects of vector behavior and host resistance on mistletoe aggregation. *Ecology* 85:120-6.
- Medel R, Mendez MA, Ossa CG and Botto-Mahan C. 2010. Arms-race coevolution: the local and geographic structure of a host-parasite interaction. *Evolution: Education and Outreach* 3: 26
- Musselman LJ. 1986. The genus *Cuscuta* in Virginia. *Castanea* 51(3):188-196
- Nuismer SJ and Thompson JN. 2006. Coevolutionary alternation in antagonistic interactions *Evolution*, 60(11): 2207-2217.
- Pennings SC y Callaway RM. 1996. Impact of a parasitic plant on the structure and dynamics of salt marsh vegetation. *Ecology* 77: 1410-1419.
- Press MC, Graves JD, Stewart GR .1990. Physiology of the interaction of angiosperm parasites and their higher plant hosts. *Plant Cell Environ* 13:91-104

- Press MC, Graves JD. 1995. Parasitic plants. Chapman and Hall, London. Jerome CA and Ford BA. 2002. The discovery of three genetic races of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) provides insight into the evolution of parasitic angiosperms. *Molecular Ecology* 11: 387-405.
- Poulin R, Marshall LJ, Spencer HG. 2000. Genetic variation and prevalence of blood parasites do not correlate among bird species. *Journal of Zoology of London* 252:381-388.
- Poulin R. 1992. Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. *Int. Journal Parasitol.* 22: 753-758.
- Rivera-Hutinel A. 2008. Ecología espacial y epidemiología del muérdago *Tristerix aphyllus*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ecología Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- Sargent S. 1995. Seed fate in a tropical mistletoe: the importance of host twig size. *Funct Ecol* 9:197-204
- Thompson JN. 1994. *The Coevolutionary Process*. University of Chicago Press, Chicago, IL and London, UK.
- Thompson JN and Burdon JJ. 1992. Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature* 360: 121-125.
- Thompson JN. 2005. *The Geographic Mosaic of Coevolution*. University of Chicago Press.

- Vázquez DP, Poulin R, Krasnov BR, Shenbrot GI. 2005. Species abundance patterns and the distribution of specialization in host-parasite interaction networks. *Journal of Animal Ecology*: 946-955
- Watkinson AR, Gibson CC . 1988. Plant parasitism: the population dynamics of parasitic plants and their effects upon plant community structure. In: Davy AJ, Hutchings MJ, Watkinson AR (eds) *Plant population ecology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 393-411
- Webster JP, Coger CM and Blair L. 2004. Do hosts and parasites coevolve? Empirical support from the *Schistosoma* System. *The American Naturalist* 164: S33-S51.
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica y altura de las 17 localidades estudiadas. Además se señala el código con que se identificó a cada sitio

LOCALIDAD	CODIGO	LATITUD S	LONGITUD	
			W	h (mt)
Llanos de Challe	CH	28°07,575'	71° 02,051'	142,0368
Camino Pta. Choros	CC	29° 19,174'	71° 14,717'	191,1096
La Higuera II	HGII	29° 24,608'	71° 10,457'	10,3632
La Higuera I	HGI	29° 30,264'	71° 13,270'	481,2792
Quebrada Honda	QH	29° 37,183	71° 15,246'	208,1784
Los Hornos	LH	29° 38,129'	71° 17,358'	31,3944
Huampulla	HU	30° 26,722'	70° 59,445'	598,6272
Fay Jorge	FJ	30° 38,735'	71° 31,603'	243,84
Oruro	OR	30° 39,056'	71° 38,715'	98,1456
Monte Patria	MP	30° 42,319'	71° 01,385'	405,0792
Combarbala	CM	31° 09,115'	71° 01,650'	831,4944
Los Rulos	LR	31° 18,876'	71° 13,089'	596,7984
Las Chinchillas	LC	31° 30,402'	71° 07,016'	625,7544
Tilama	TL	32° 05,622'	71° 15,046'	302,9712
Cabildo	CB	32° 26,503'	71° 00,565'	244,4496
Caleu	CL	33° 01,479'	70° 57,371'	1068,324
Farellones	FA	33° 20,783'	70° 21,093'	1612,0872



Tabla 2: Muestra para cada hospedero por localidad, los valores de prevalencia del parasitismo (PP), abundancia relativa del hospedero (AR) y la adecuación biológica de *T. aphyllus* sobre cada hospedero (AB).

Localidad	Hospedero	PP	AR	AB
CH	A	0,01	0,26	28,2
CC	A	0,01	0,94	181,3
HGII	A	0,82	1	218,28
HIGI	A	0,47	1	247,55
QH	A	0,38	0,74	357,5
LH	A	0,12	0,33	141,4
HU	A	0,16	0,68	216,4
HU	H	0,04	0,32	113,1
FJ	A	0,20	0,47	317,55
OR	A	0,08	0,41	282,5
OR	H	0,28	0,59	325,65
MP	A	0,18	0,8	118,55
MP	H	0,03	0,21	74
CM	H	0,15	0,91	121,13
CM	A	0,03	0,09	48
LR	A	0,11	0,27	168,7
LR	H	0,22	0,73	183,3
LC	A	0,04	0,33	180
LC	H	0,30	0,67	289,5
TL	H	0,51	1	408,9
CB	H	0,51	1	190,5
CL	H	0,52	1	359
FA	H	0,49	1	60

La columna "Localidad" distingue con letras el lugar de muestreo (ver Tabla1). La columna "Hospedero" distingue con una letra la especie hospedera de la cual fue colectado el muérdago H= *Echinopsis chiloensis*, A= *Eulychnia acida*.

Tabla 3. Resume las ANDEVAS de una vía realizadas en cada localidad, para determinar diferencias en el largo de espinas entre los hospedantes parasitados y no parasitados por *Tristerix aphyllus*. F, corresponde al valores de Fisher, DF1= grados de libertad del tratamiento, DF2= grados de libertad del error, p= valor de p, X0= promedio de espinas en individuos no parasitados, X1= promedio de espinas en individuos parasitados. En negrita se destacan los valores significativos

LOCALIDAD	F	DF 1	DF2	Prob > t	X0	X1
SP HOSPEDERA						
CCA	0,4184	1	23	0,524	95,75	88,90
HGIIA	45,068	1	48	< 0,0001	131,80	107,62
HGIA	3,783	1	35	0,060	117,74	109,35
QHA	0,2786	1	38	0,601	88,19	85,64
LHA	28,738	1	38	< 0,0001	104,47	86,23
HUA	4,888	1	18	0,0402	124,30	138,97
HUH	26,840	1	18	< 0,0001	141,42	109,32
FJA	1,429	1	39	0,239	86,33	78,46
ORA	1,946	1	38	0,171	97,87	90,96
ORH	0,0403	1	38	0,842	70,34	69,86
MPA	3,534	1	28	0,071	113,47	96,79
MPH	3,814	1	13	0,073	88,58	68,72
CMH	7,345	1	28	0,011	136,06	110,44
LRA	14,7627	1	38	0,0004	124,91	101,82
LRH	5,090	1	38	0,030	108,88	96,69
LCA	2,160	1	38	0,150	125,73	118,74
LCH	2,5509	1	38	0,119	119,36	111,10
TLH	0,4708	1	38	0,497	56,06	53,03
CBH	2,925	1	38	0,095	72,28	61,80
CLH	11,996	1	38	0,001	67,48	48,53
FAH	2,510	1	28	2,510	90,49	80,76

La columna "Localidad" se distingue con las dos primeras letras el lugar de muestreo (ver Tabla1) y con la última letra la especie hospedera de la cual fue colectado el muérdago A= *Eulychnia acida* y H= *Echinopsis chiloensis*.

Tabla 4. Resume las ANDEVAS de una vía realizadas en cada localidad, para determinar diferencias en el grosor de la epidermis entre los hospedantes parasitados y no parasitados por *Tristerix aphyllus*. F, corresponde al valores de Fisher, DF1= grados de libertad del tratamiento, DF2= grados de libertad del error, p= valor de p, X0= promedio del grosor de la epidermis en individuos no parasitados, X1= promedio del grosor de la epidermis en individuos parasitados. En negrita se destacan los valores significativos

LOCALIDAD	F	DF 1	DF2	Prob > t	X0	X1
SP						
HOSPEDERA						
CCA	3,555	1	27	0,0702	1,700	1,551
HGIIA	0,039	1	48	0,8451	1,705	1,712
HGIA	7,626	1	33	0,0093	1,713	1,637
QHA	0,252	1	36	0,6185	1,643	1,623
LHA	5,101	1	38	0,0297	1,635	1,573
HUA	8,867	1	18	0,0081	1,607	1,496
HUH	1,559	1	18	0,228	1,446	1,365
FJA	2,278	1	39	0,1393	1,481	1,538
ORA	0,028	1	38	0,8691	1,517	1,521
ORH	0,041	1	38	0,8415	1,386	1,379
MPA	0,562	1	28	0,4598	1,530	1,503
MPH	0,851	1	13	0,373	1,332	1,282
CMH	5,932	1	28	0,0215	1,519	1,399
LRA	5,363	1	39	0,0261	1,716	1,658
LRH	0,129	1	38	0,7213	1,562	1,574
LCA	0,017	1	38	0,8982	1,679	1,674
LCH	5	1	38	0,0294	1,672	1,573
TLH	0,015	1	38	0,903	1,487	1,481
CBH	1,785	1	38	0,1895	1,482	1,444
CLH	5,826	1	38	0,0207	1,540	1,461
FAH	5,932	1	28	0,0215	1,519	1,399

La columna "Localidad" se distingue con las dos primeras letras el lugar de muestreo (ver Tabla1) y con la última letra la especie hospedera de la cual fue colectado el muérdago A= *Eulychnia acida* y H= *Echinopsis chiloensis*.

LEYENDAS DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de los sitios estudiados entre las regiones de Atacama y Metropolitana. Las abreviaturas de cada localidad se señalan en la Tabla 1.

Figura 2. A. Frutos maduros de *Tristerix aphyllus*. B. Semillas de *T. aphyllus*, limpias de pulpas y dispuestas en papel secante. C. Semillas de *T. aphyllus* puestas a germinar en condiciones de jardín común. D. Muestra la elongación de las radículas de *T. aphyllus*.

Figura 3. Muestra la prevalencia del parásito como una función de la abundancia relativa de sus hospederos más comunes *Eu. acida* (A) y *Ec. chiloensis* (H). La línea punteada nos señala como es la respuesta cuando no hay selección ($b = 1$).

Figura 4. Los círculos señalan la distribución geográfica de puntos calientes (rojo), calientes/tibios (anaranjado), fríos/tibios (celeste) y fríos (azul), cuando *T. aphyllus* esta parasitando a *Eu. acida* (A) y *Ec. chiloensis* (B).

FIGURAS

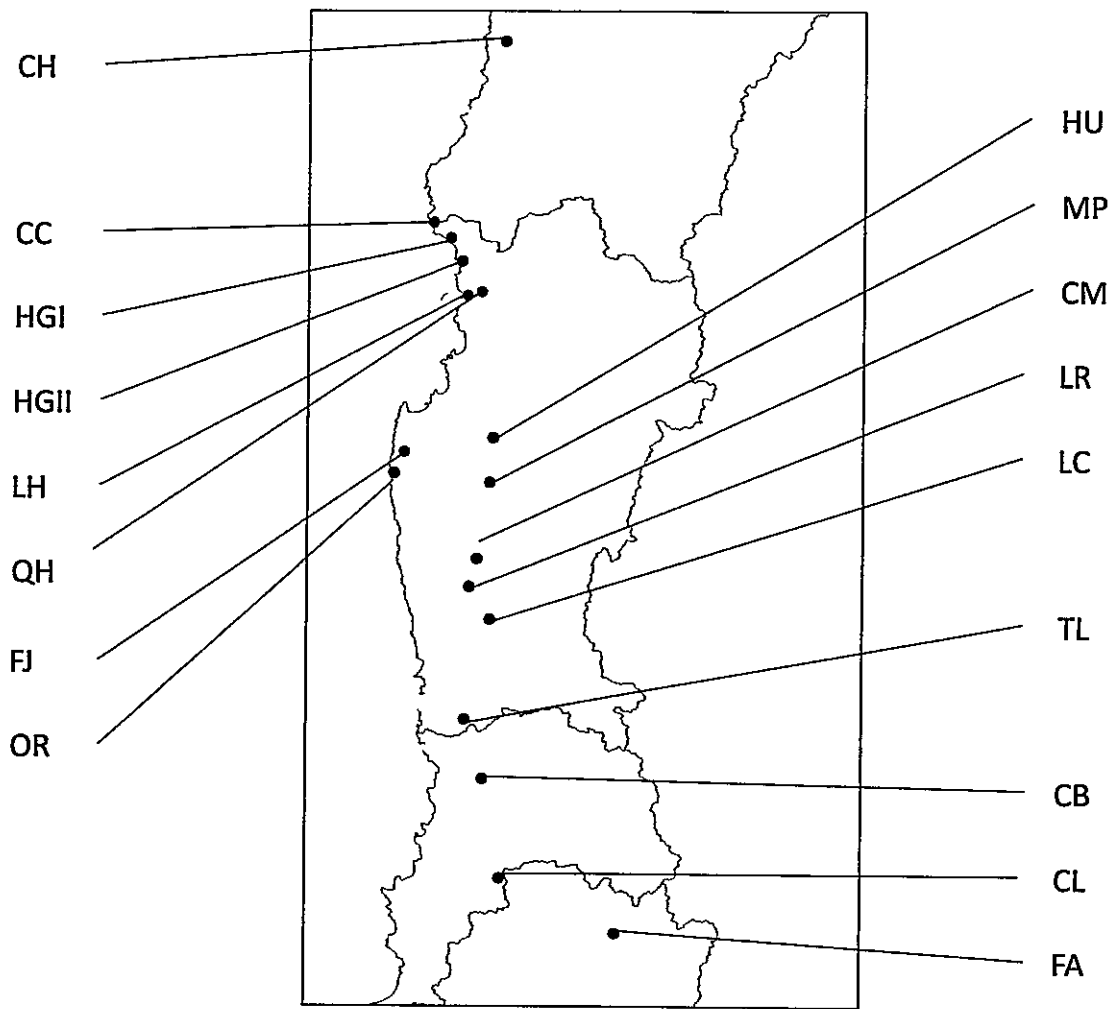


Figura 1.

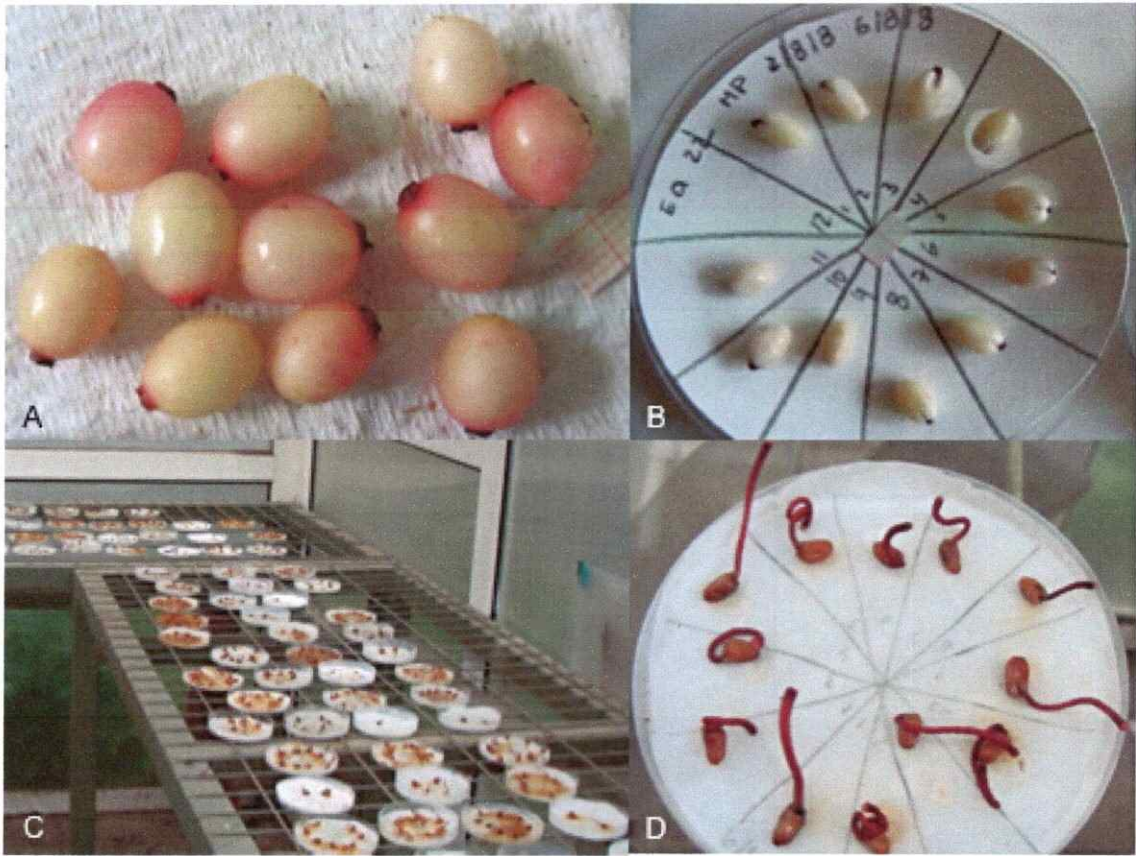


Figura 2.

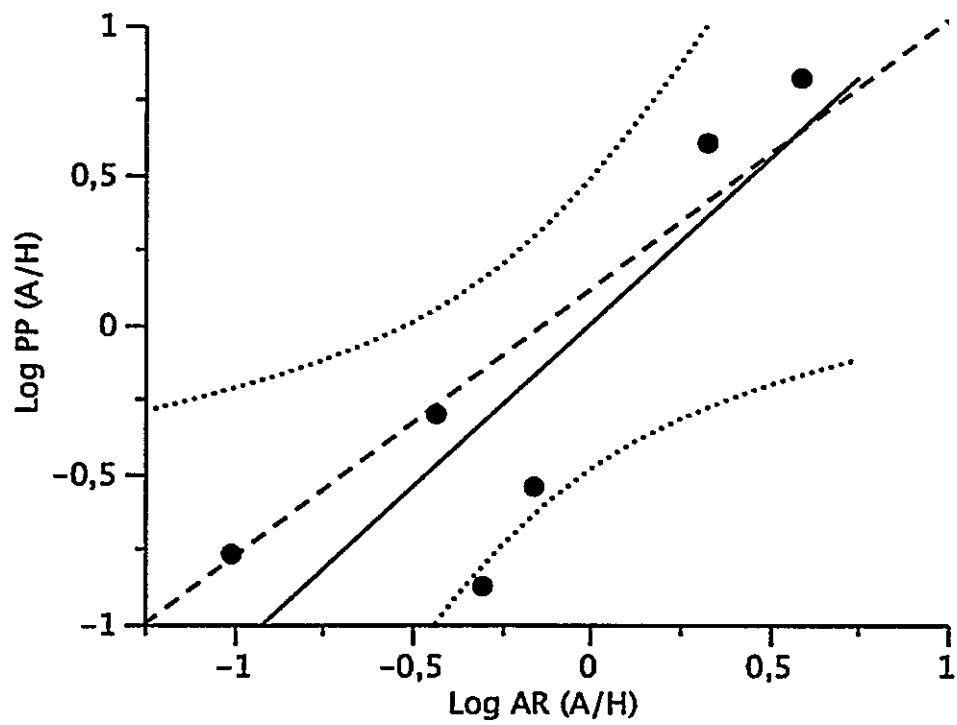


Figura 3.

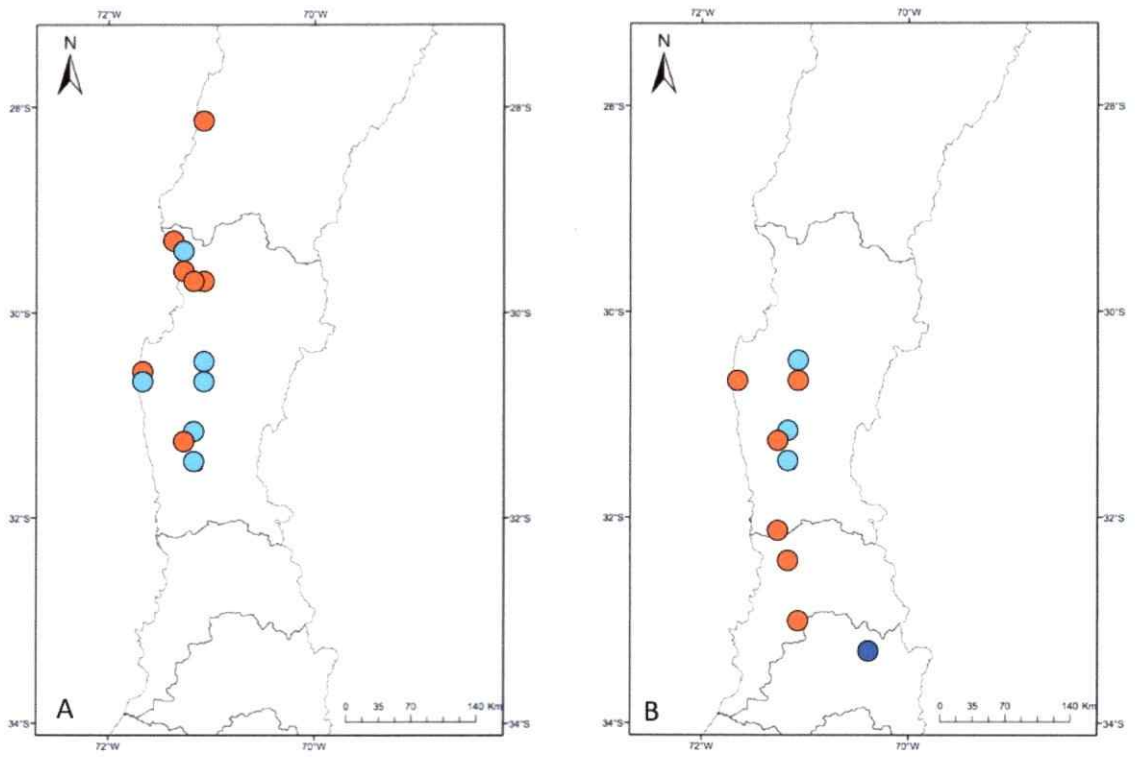


Figura 4.

CÁPITULO II

FILOGEOGRAFÍA DEL HOLOPARÁSITO *TRISTERIX APHYLLUS*: IMPORTANCIA DE LOS HOSPEDEROS Y DE LA HISTORIA CUATERNARIA

RESUMEN

Los patrones de diversidad genética de una especie y su distribución geográfica son el resultado de la interacción de factores históricos, ecológicos y de historia de vida. Los efectos de los eventos históricos han sido extensamente estudiados, considerando a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno como las principales responsables de los patrones actuales de diversidad genética. No obstante, las interacciones bióticas pueden tener también un papel importante, particularmente en plantas parásitas y sus hospederos. En efecto, se han reportado casos en que los patrones de diversidad genética de plantas parásitas se correlacionan fuertemente con la distribución moderna de sus hospederos, dando cuenta de procesos de especialización y diferenciación, pero también se han descrito patrones más complejos que se han atribuido a eventos históricos.

En este trabajo se estudiaron los patrones de distribución de la diversidad genética de *Tristerix aphyllus*, *Tristerix aphyllus*, una holoparásita que infecta cactus columnares, entre los 30 y 35°S, considerando que su estructuración genética puede estar determinada fuertemente tanto por la identidad de sus hospederos principales, como los fenómenos históricos asociados a las fluctuaciones climáticas del cuaternario. Los resultados señalan que el muérdago presenta una alta estructuración genética atribuible a factores históricos, y a la existencia de "refugios xéricos" donde habrían permanecido sus hospederos durante los ciclos glaciales que caracterizaron el Pleistoceno, lo que

probablemente se ve agudizado por la escasa movilidad actual de la planta parásita.

ABSTRACT

The patterns of genetic diversity of a species and their geographic distribution are the result of the interaction between historic, ecologic, and life history traits. The effects of the historic events considering Pleistocene climatic oscillations as the main cause of the current patterns of genetic diversity have been extensively studied. However, the biotic interactions can also have an important role, particularly in parasitic plants and their hosts, in fact, cases have been reported in which the genetic diversity patterns of parasitic plants are strongly correlated with the modern distribution of their hosts, showing processes of specialization and differentiation, but more complex patterns also have been described and attributed to historic events.

Tristerix aphyllus is a holoparasite that parasitizes columnar cacti between the 30 and 35 °S. In this work it's been studied the distribution patterns of the genetic diversity of the holoparasite *T. aphyllus*, considering that its genetic structure can be strongly determined by the identity of its main hosts, and also considering that the current genetic patterns of the *T. aphyllus* populations can respond to historic phenomena associated to the Quaternary climatic fluctuation. The results indicate that the mistletoe presents a high genetic structure attributable to historic factors and to "xeric refuges" where hosts would have stayed during the glacial cycles that characterized the Pleistocene, which it's probably intensified by the current limited mobility of the haplotypes.

INTRODUCCIÓN

Los patrones de diversidad genética de una especie, y su distribución geográfica, son el resultado de la interacción de factores históricos, ecológicos y de historia de vida (Hamrick 1996, Nybom y Bartish 2000, Nybom 2004, Thiel-Egenter *et al.* 2009). Los efectos de los eventos históricos han sido ampliamente estudiados, considerando a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno como los principales responsables de los patrones actuales de diversidad genética (Hewitt 1996 2000). Aunque, también se ha destacado la influencia de las formas de vida (Willis y Niklas 2004, Smith y Donoghue 2008), sistemas de reproducción (Nybom 2004, Pérez 2011) y modos de dispersión (Peakall y Beattie 1995, Fér y Hroudová 2009). Menos atención ha recibido el rol que las interacciones bióticas han tenido en la conformación de los patrones actuales de diversidad genética (ver Wookey *et al.* 2009, Cahoon *et al.* 2012), a pesar de que se ha enfatizado que estas podrían ser claves para entender la respuesta de las especies a los cambios climáticos (ver Araújo y Luoto 2007, Montoya y Raffaelli 2010).

La importancia de las interacciones bióticas en los patrones de diversidad genética puede ser especialmente relevante para especies vegetales cuya adecuación biológica depende fuertemente de otras especies, como en el caso de especies exógamas con sistemas de polinización especializados (Pérez *et al.* 2009, Pérez 2011) o el de plantas parásitas dependientes de una o pocas especies de hospederos (Futuyma y Moreno 1988, Via 1990, Forbes *et al.* 2002).

En el caso de las plantas parásitas se ha propuesto que la estructura genética poblacional debiese depender fuertemente de la distribución de sus hospederos (Mulvey *et al.* 1991, Nadler 1995, Jerome y Ford 2002, Zuber y Widmer 2009), y en efecto, varios estudios filogeográficos en plantas parásitas han documentado correlatos significativos entre la estructura genética poblacional de estas y la distribución moderna de sus principales hospederos, dando cuenta de procesos incipientes de especialización y diferenciación (Zuber y Widmer 2009, Jerome y Ford 2002). Otros estudios, sin embargo, dan cuenta de patrones más complejos atribuidos a otros factores (Nadler 1995, Amico 2007, Amico y Nickrent 2009), como por ejemplo, rasgos de la historia de vida tanto del parásito, como del hospedero, que jugarían un papel importante en la determinación de la estructura poblacional del parásitos (Nadler 1995).

Tristerix aphyllus es una planta holoparásita, que habita en la zonas áridas y semiáridas de Chile entre los 27 y los 35° S. A lo largo de su rango de distribución explota ocho especies de cactus columnares de los géneros *Echinopsis* (*Ec. deserticola*, *Ec. litoralis*, *Ec. chiloensis*, *Ec. skottsbergii*, *Ec. coquimbana*), y *Eulychnia* (*Eu. breviflora*, *Eu. castanea* y *Eu. acida*). Esta especie es la única del género que ha perdido las hojas, y que por tanto depende completamente de los fotosintatos producidos por el hospedero, además de competir por los nutrientes y agua. *Tristerix aphyllus* es polinizada únicamente por el ave *Sephanoides sephaniodes* y dispersada sólo por el ave *Mimus thenca* (Medel *et al.* 2000), que mueve las semillas solo a cortas distancia (Rivera-

Hutinel 2008). La agregación de las semillas del muérdago y la estrecha dependencia de los parásitos con sus hospederos, sumado a la historia cuaternaria de las zonas árida y semiáridas del norte y centro de Chile nos debiera dar cuenta de los patrones de diversidad genética del muérdago.

Las zonas áridas y semiáridas del norte y centro de Chile sufrieron fuertes fluctuaciones en el régimen de precipitaciones durante los ciclos glaciares/interglaciares que caracterizaron el Cuaternario. Las reconstrucciones climáticas sugieren condiciones secas para el desierto de Atacama y los Andes áridos durante la última glaciación (Ammann *et al.* 2001, Grosjean *et al.* 2001). Las condiciones se habrían vuelto más húmedas durante el tardiglacial (Betancourt *et al.* 2000, Rech *et al.* 2002, Latorre *et al.* 2006) y nuevamente áridas durante el Holoceno medio, periodo en que la cubierta vegetal fue muy escasa y posiblemente dominada por plantas xerófitas C3 o CAM (Kaiser *et al.* 2008). Por otra parte, registros palinológicos del Norte Chico muestran en esta zona condiciones más húmedas que las actuales con presencia de *Nothofagus* y *Prumnopitys* andina durante el último máximo glacial (Maldonado y Rozas 2008) y un máximo de aridez en el Holoceno (7.500-6.000 años AP) marcado por la expansión de la vegetación xérica y la contracción de los bosques pantanosos (Maldonado y Villagrán 2002, Maldonado y Villagrán 2006). Al igual como se ha propuesto para especies de zonas templadas y boreales, se ha sugerido que estos cambios podrían haber dejado una fuerte impronta genética en las especies xéricas, pero lamentablemente los estudios filogeográficos en especies xerófitas

del norte y centro de Chile son muy escasos, y los pocos estudios que hay muestran patrones contrastantes. Por ejemplo, el complejo *Nolana paradoxa* (Ossa *et al.* 2013), presenta un fuerte quiebre filogeográfico entre poblaciones del norte y sur de Chile, con altos niveles de diversidad en ambas zonas, sugiriendo que esta especie fue capaz de sobrevivir el UMG a lo largo de todo su rango de distribución. En cambio, el complejo *N. incana- N. crassulifolia*, presenta una concentración de la diversidad genética en el norte, y una pérdida de haplotipos hacia el sur, lo que sugiere que este complejo contrajo su rango hacia el norte durante los periodos fríos y húmedos, y que luego se expandió hacia el sur durante los periodos secos y cálidos (Ossa *et al.* 2013).

En este trabajo se estudiaron los patrones de distribución de la diversidad genética del holoparásito *Tristerix aphyllus*, para lo cual se plantearon dos hipótesis alternativas: i) la estructuración genética de *T. aphyllus* se corresponde con la identidad de sus hospederos principales, ya que estos al ser el único recurso explotado por el muérdago, podrían ejercer fuertes presiones selectivas diferenciales sobre la planta parásita. ii) Los patrones actuales de estructuración genética de las poblaciones *T. aphyllus* responden principalmente a fenómenos históricos, asociados a contracción y expansión de la flora xérica, causada por las fluctuaciones climáticas del Cuaternario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de material y amplificación de ADN

Entre julio y septiembre de los años 2008 y 2009 se recolectaron muestras de 17 poblaciones de *Tristerix aphyllus*, entre las Regiones de Atacama y Metropolitana (Figura 1). En cada población fueron muestreados hasta 15 individuos. Cada muestra consistió en pedúnculos florales, los que se almacenaron en bolsas herméticas con sílica gel. Cada muestra fue caracterizada registrando la fecha, lugar y especie de hospedero en que fue encontrado el muérdago (Tabla 1). El ADN de cada individuo fue extraído a partir de aproximadamente 20 mg del tejido seco almacenado, el que fue molido en una Mini-Beadbeater. El protocolo de extracción se detalla en el Anexo 1. Cada extracción fue verificada usando un gel de agarosa al 1% preparado con GelRed™ de Biotium, bajo luz UV, y la concentración de DNA de las muestras fue determinada usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

Con el fin de determinar cuál era el marcador que presentaba mayor variabilidad se realizaron pruebas de partidores universales para diferentes regiones del cloroplasto. Se amplificaron un total de 17 regiones cpDNA (Taberlet *et al.* 1991, Demesure *et al.* 1995, Dumolin-Lapegue *et al.* 1997, Tate y Simpson 2003, Sang *et al.* 1997, Shaw *et al.* 2005, Shaw *et al.* 2007) incluyendo un microsatélite cloroplastidial (Weising y Gardner 1999) (Tabla 2), usando al menos tres individuos provenientes de poblaciones del norte, centro y sur del

muestreo. De todas las regiones amplificadas sólo la región *rpoβ-trnC* (Shaw *et al.*, 2005) presentó variabilidad. Para mejorar la amplificación de esta región, se diseñó un par de cebadores internos (forward: 5' TATAGCTCATTTCTAGTCATA-3'; reverse: 5'- ATACGGGTTACTTAACTTT -3') con el programa Premier 5.0 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA).

Los protocolos de amplificación fueron determinados después de hacer curvas de temperatura y concentración de magnesio. Las reacciones de amplificación (PCR), para la región *rpoβ-trnC*, se prepararon en una solución final de Buffer 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTP (Invitrogen) 0,2 μM, Taq DNA polimerasa (Invitrogen) 2 UL, primarios 0,75 μM, DNA 50-100 ng (en 30 μL de volumen final). La amplificación fue realizada para 137 individuos, según el siguiente protocolo: denaturación inicial de 94°C y 40 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, unión o "annealing" de primarios a 55°C por 45 segundos, seguido de 2 minutos y medio de extensión, y de un paso de extensión final a 72°C de 10 minutos. El producto de amplificación fue verificado en gel de agarosa al 1% preparado con GelRed™ de Biotium, en electroforesis bajo el buffer 1X TAE (0.04M Tris- Acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y visualizado bajo luz UV. La purificación y secuenciación del producto de PCR se realizaron en MACROGEN Inc. Las secuencias obtenidas fueron alineadas manualmente con el programa BioEdit (Hall 1999). La región presentó extensas y múltiples zonas de inserción/delección (indel), las que fueron consistentes y de alineación no ambigua. Para disminuir el tamaño de los fragmentos con inserción/delección y

)
poder realizar análisis filogeográficos y de estructuración poblacional, las secuencias fueron editadas con el programa CLC Sequence Viewer 6. Antes de realiza los análisis se codificó manualmente cada inserción-delección como una única mutación, para esto se editaron las secuencias considerando cada inserción/delección como homóloga solo cuando el número de bases y las regiones limitantes eran iguales entre los haplotipos.

Diversidad Genética

Las secuencias editadas, se exportaron al programa DnaSP 5.1 (Librado y Rozas 2009) para calcular índices de diversidad genética, como número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad alélica (H), diversidad nucleotídica y número promedio de diferencias entre dos secuencias (Π). Los índices de diversidad también fueron determinados en dos subgrupos de secuencias, en los que se forzaron agrupamientos de los haplotipos: (a) por la identidad de los hospederos más comunes de *T. aphyllus* (*Ec. chiloensis*, *Eu. acida* y *Ec. deserticola*), y (b) por la identidad de los hospederos más importantes (*Ec. chiloensis* y *Eu. acida*) usando sólo poblaciones en las cuales estos se encuentran en simpatría.

Red de Haplotipos

Posteriormente se identificaron relaciones filogeográficas entre los haplotipos de cpDNA, construyendo una red de haplotipos "Median Joining Network" (MJ) (Bandelt *et al.* 1999) con el programa Network 4.5 (Fluxus Technology Ltd 1999-2009), apropiado para secuencias con baja tasa de sustitución (Woolley *et al.*

2009), con el propósito de visualizar abundancia y relación de haplotipos ancestrales y derivados tanto en el espacio geográfico, como asociado a los hospederos.

Diferenciación Genética.

Para determinar el grado de **diferenciación genética de *T. aphyllus* está asociada a sus hospederos más comunes**, se estimó el índice de fijación FCT (proporción de la varianza genética total debida a las diferencias entre grupos de poblaciones), a través de un Análisis de la varianza molecular (AMOVA), con el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer 2010), forzando a los haplotipos a agruparse con respecto a los tres hospederos más frecuentes (*Eu acida*, *Ec chiloensis* y *Ec deserticota*).

Posteriormente, para determinar si la **diferenciación genética de *T. aphyllus* esta realmente asociada a la identidad de los hospederos y no responde a la distribución geográfica de los mismos**, se determinó el grado diferenciación genética de *T. aphyllus* asociada a los hospederos *Eu. acida* y *Ec. chiloensis*, cuando están en simpatria, a través de un análisis de la varianza molecular (AMOVA), forzando a los haplotipos a agruparse con respecto a las dos especies de hospederos, usando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer 2010).

Para determinar si la **estructuración genética de *T. aphyllus* responde a su distribución geográfica actual**, se calcularon los estimadores de diferenciación poblacional G_{st} y N_{st} , los que dan cuenta de la relación entre la media de la diversidad genética dentro de la población y la diversidad genética total. El índice G_{st} hace uso sólo de las frecuencias alélicas, mientras el índice N_{st} también toma en cuenta las distancias genéticas entre los haplotipos. Estos

índices fueron estadísticamente comparados usando una prueba de 1.000 permutaciones con el programa PERMUTCPSSR 2.0. Valores de Nst significativamente superiores a Gst , nos indicaría que los haplotipos presentes en una misma población están más estrechamente relacionados entre sí, que con los haplotipos de otras poblaciones, lo que indicaría estructuración filogeográfica.

Se evaluó la diferenciación genética entre localidades, estimando el índice de fijación (Fst), generado en Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). La estructura genética de la población fue investigada usando dos métodos de agrupamiento, uno basado en estadística multivariada, SAMOVA v.1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) (Structure Analysis of Molecular Variance) y otro basado en estadística bayesiana, Geneland 0.3 (Guillot *et al.* 2005), ambos métodos integran las coordenadas espaciales de las muestras. El programa SAMOVA se basa en el procedimiento de acoplamiento simulado para identificar grupos de poblaciones (k), que son geográficamente homogéneas, diferenciando las al máximo, a través de la maximización del FCT. Los valores de FCT se obtuvieron corriendo el programa secuencialmente y forzando los datos a agruparse en k grupos (Dupanloup *et al.* 2002), en nuestro caso k va de dos a seis. Por su parte Geneland se basa en una inferencia bayesiana realizada mediante la simulación de la distribución *a posteriori* de los parámetros mediante la técnica Monte Carlo, vía Cadenas de Markov (MCMC) (Guillot *et al.* 2005), se usaron 10×10^6 iteraciones de MCMC, explorando un número potencial

de subpoblaciones, entre $k= 1$ y $k= 13$; se usaron 13 poblaciones y no las 17 muestreadas, ya que se considero como una única población las localidades monotipicas (LB- TL-TT y CL- CB-FA). Para corroborar las diferencias entre grupos, se estimaron los índice de fijación F_{ST} (Arlequin 3.5), entre los grupos generados por el programa SAMOVA y Geneland.

Patrones demográficos

Para identificar eventos demográficos, como eventos de cuello de botella, equilibrio y expansión poblacional, se realizó la prueba de Tajima (D; Tajima, 1989) y Fu (Fs; Fu, 1997) con el programa Arlequin 3.5, para el conjunto de poblaciones y para los grupos formados por los programas SAMOVA y Geneland. Cuando las poblaciones han experimentado tamaños poblacionales estables durante largos períodos de tiempo, se espera que la distribución "mismatch" sea multimodal, mientras que bajo expansión poblacional, se espera que la distribución "mismatch" presente una distribución unimodal y en forma de campana, sin grandes diferencias en la frecuencia entre pares dentro de la población (ie un bajo raggedness, R). La distribuciones de "mismatch" se analizaron en ARELQUIN (Rogers 1995, Excoffier 2004).

RESULTADOS

Diferenciación genética e índices de diversidad de T. aphyllus en relación a sus hospederos

Se secuenciaron un total de 137 individuos de *T. aphyllus*, con 107 de ellos parasitando a los tres hospederos más frecuentes (*Eu Acida*, *Ec chiloensis* y *Ec deserticota*). Se identificaron 9 haplotipos en total, siendo los más frecuentes los haplotipos H4 (25%) y H7 (29%) ubicados en el centro y norte de la distribución (Tabla 4.1 y Figura 2). De acuerdo a la red de haplotipos, el haplotipo H7 da origen a los haplotipos H8 y H9, ubicados también en el norte, mientras que el haplotipo H4 da origen a los haplotipos H3 y H6 ubicados en el centro de la distribución (Figura 3)

La mayoría de los haplotipos son compartidos por más de un hospedero, sin embargo, algunos tienden a ser más frecuentes en una de las especies. Por ejemplo, los individuos con el haplotipo 1 (H1) parasitan mayormente a *Eu. acida*, mientras que los individuos con el haplotipo 5 (H5) parasitan únicamente a *Ec. chiloensis* (Tabla 3.1.1). Al realizar un AMOVA forzando a los haplotipos a agruparse con respecto a los hospederos *Eulychnia acida*, *Echinoipsis chiloensis* y *Echinoipsis deserticota*, se determinó que el 65,77% (FSC= 0,77; $p < 0,0001$) de la variabilidad genética se distribuye dentro de los subgrupos, correspondiendo a la diferenciación inter-hospedero solamente el 14,62% (FCT= 0,146; $p = 0,036$). Este valor sin embargo es significativo (Tabla 3.1.3), lo que sugiere una

estructuración genética de *T. aphyllus* asociada a sus especies hospederas, a pesar del fuerte componente geográfico que sugiere el FSC.

No se observaron grandes diferencias en los índices de diversidad haplotípica entre los individuos que parasitan a *Eu. acida* con respecto a los que parasitan a *Ec. chiloensis*. Sin embargo, los individuos que parasitan a *Ec. deserticola* presentan un menor número de sitios polimórficos, menor número de haplotipos, menor diversidad haplotípica y un menor número de diferencias entre pares de secuencias que los que parasitan *Eu. acida* y *Ec. chiloensis* (ver Tabla 3.1.2).

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos en la sección anterior son o no reflejo de la distribución geográfica de los hospederos, se restringió el análisis a las poblaciones de *T. aphyllus*, donde se observa coexistencia de los hospederos más importantes, *Eu. acida* y *Ec. chiloensis*. En total se analizaron 53 secuencias, que presentan siete haplotipos diferentes. Se observó una distribución homogénea de los haplotipos con respecto a las especies hospederas (Ver Tabla 3.2.1). Al realizar un AMOVA considerando solo las localidades donde coexisten *Ec. chiloensis* y *Eu. Acida*, se determinó que 81,57% de la variabilidad genética se distribuye dentro de los grupos (FSC= 0,704; $p < 0,0001$), mientras que variabilidad genética no es distinta entre los hospederos (FCT= -0,157; $p = ns$) (Tabla 3.2.3). Tampoco se observan diferencias en los índices de diversidad haplotípica entre hospederos (Tabla 3.2.2). Estos resultados sugieren que la

estructuración genética de *T. aphyllus* esta fuertemente determinada por factores geográficos, y no por la identidad del hospedero.

Índices de diversidad y diferenciación poblacional (sin considerar identidad de hospederos).

Al analizar la diversidad intrapoblacional por sitio, es decir, considerando el total de individuos de *T. aphyllus* y sin diferenciar por hospedero, se encontró un patrón latitudinal, con concentración de la diversidad de haplotipos en el centro, y una disminución progresiva hacia los extremos de la distribución, con poblaciones monotípicas al norte (CH) y sur (TL, TT, LB, CB, CL y FA)

Los valores de los coeficientes de diferenciación poblacional GST (0,728) y NST (0,808) fueron significativamente distintos de cero ($p < 0,001$), indicando que gran parte de la diversidad genética es explicada por variabilidad interpoblacional. Además los valores de NST fueron significativamente superiores a GST ($p = 0,024$), reflejando estructuración filogeográfica.

El análisis de SAMOVA reconoce cinco grupos con un 84,09% de la varianza explicada (Tabla 5.1). El primer grupo incluye a localidades del extremo norte de la distribución (CH, FR, HG, LH), el segundo a las del centro (MP, CM, LR, LC, TL, LB, TT), el tercero a las del sur (CB, CL, FA), otro grupo queda conformado sólo por la localidad de Huampulla (HU), y un quinto corresponde a la zona de Fray Jorge (FJ, OR) (Figura 4.1, Tabla 5.2). El análisis con Geneland (Guillot *et al.* 2005) confirma las agrupaciones obtenidas con el SAMOVA (Figura

4.2 y 4.3), señalando una fuerte estructuración genética de las subpoblaciones obtenidas (Figura 4.2). Los valores de F_{ST} para los grupos formados por análisis de SAMOVA y Geneland, indican diferenciación significativa ($p \ll 0.001$) entre todos los grupos (Tabla 5.3).

Las pruebas de neutralidad de Tajima (D) y F_s (F_s), para los grupos generados por SAMOVA y Geneland, muestran expansión demográfica para el grupo Norte (NN), con un índice D negativo y significativo ($D = -1,456$; $p = 0,046$), aun cuando el índice F_s no es significativo (Tabla 5.3). La expansión del grupo NN fue corroborada por el análisis de "Mismatch", que nos muestra una distribución unimodal con un índice de Raggedness = 0,5847 ($p = 0,66$).

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que en *T. aphyllus* el componente geográfico es mucho más importante en la estructuración genética, que la identidad de los hospederos, contrario a lo que ocurre en otras especies de Lorantáceas, en las que se ha detectado una fuerte estructuración genética con respecto a los hospederos más importantes como son el caso del muérdago hemiparásito *Viscum album* que presenta una alta estructuración genética asociada a los árboles hospedantes (Zuber y Widmer 2009), o el caso es el de la planta parásita *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) que presenta tres razas que se corresponden con sus tres especies hospederas (Jerome y Ford 2002). Sin embargo, en la mayoría de los parásitos se suele encontrar una estructuración genética compleja, que responde no solo a la identidad de sus hospederos sino también a factores ecológicos, filogeográficos y de rasgos de historia de vida tanto de la especie parásita, como del hospedero (Price 1980, Mulvey *et al.* 1991, Thompson 1994, Avise 2000, Jerome y Ford 2002, Zuber y Widmer 2009)

Al indagar si los patrones de estructuración genética de las poblaciones *T. aphyllus* responden a fenómenos históricos, se detectaron altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones y una significativa estructuración filogeográfica. Posteriores análisis de SAMOVA y Genland muestran que los haplotipos se agregan en cinco grupos bien definidos. Aun cuando, la red de haplotipos muestra patrones difíciles de explicar, como por ejemplo, una

estrecha relación entre los haplotipos de los grupos de FJ y S a pesar de estar distantes geográficamente, o grandes diferencias entre los haplotipos de los grupos HU y N, a pesar de ser geográficamente muy cercanos (ver figura 3). Posiblemente estos patrones estén dando cuenta de eventos de cuello de botella y/o efecto fundador, asociados a la existencia de refugios xéricos en el centro-norte de Chile durante los periodos húmedos del Plesitoceno-Holoceno (Maldonado y Villagrán 2006, Ossa *et al.* 2013). En Europa, los movimientos migratorios de distintos linajes de plantas tras el retroceso de los glaciares están bien documentados (Petit *et al.* 2002a, Petit *et al.* 2002b, Grivet y Petit 2003, Hampe *et al.* 2003, Petit *et al.* 2005), pero se cuenta con poca información para el sur de Sudamérica. En la zona árida y semi-árida de Chile, se especula que existieron múltiples refugios xéricos, desde cuales *T. aphyllus* junto a sus hospedadores y dispersores, pudieron haber migrado, desde múltiples localidades hasta su distribución actual, estableciéndose una distribución compleja de los haplotipos de *Tristerix* (Amico 2007, Amico y Nickrent 2009).

Los análisis de demográficos muestran que el grupo del más al Norte (NN) está en expansión demográfica, a pesar de que la red de haplotipos no presenta la típica forma de estrella, y muestra una escasa variedad de haplotipos con pocos paso mutacionales entre ellos. Estos resultados sugieren que el muérdago ha tenido poco tiempo para diferenciarse genéticamente, lo que posiblemente se ve agudizado por la conducta del dispersor que deposita a las semillas a cortas distancias de la planta madre, generando una distribución

agregada del muérdago (Medel *et al.* 2004, Rivera-Hutinel 2008), y por la propia biología reproductiva de la planta parásita ya que al presentar altos niveles de autocompatibilidad (50%) y un 15 % de agamosperma (Medel *et al.* 2002), se dificulta la aparición de haplotipos nuevos.

En conclusión, la identidad de los hospederos no es especialmente relevante para la estructuración genética actual de *T. aphyllus*. Los actuales patrones de estructuración genética, se asocian más bien a la presencia de refugios xéricos durante los periodos húmedos de la última glaciación y la posterior expansión en periodos interglaciares, a esto se podrían sumar algunos efectos ecológicos asociados al comportamiento de *M. thenca* que dispersa las semillas a cortas distancias (Rivera-Hutinel 2008, Medel *et al.* 2004), y aspectos relacionados con la biología reproductiva del muérdago que podría restringir la aparición de haplotipos nuevos. Sería interesante en el futuro poder determinar el efecto de la estructura filogeográfica de los distintos hospederos sobre la estructuración genética de *T. aphyllus* para poder determinar si parásito y hospederos han compartido una historia filogeográfica común.

BIBLIOGRAFÍA

- Amico G. 2007. Tesis Doctoral: "Variación geográfica en la coloración de los frutos del muérdago *Tristerix corymbosus* (Loranthaceae): efecto de la historia evolutiva, del ambiente, de los dispersores de semillas y de los hospedadores" Centro Regional Universitario Bariloche Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina.
- Amico GC and Nickrent DL. 2009. Population structure and phylogeography of the mistletoes *Tristerix corymbosus* and *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) using chloroplast DNA sequence variation. *American Journal of Botany* 96: 1571–1580.
- Ammann C, Jenny B, Kammer K and Messerli B. 2001. Late Quaternary glacier response to humidity changes in the arid Andes of Chile (18–29°S). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 172: 313–326.
- Araújo MB and Luoto M (2007) The importance of biotic interactions for modelling species distributions under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 16: 743–753.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts.: Harvard University Press.
- Bandelt HJ, Forster P. and Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.

- Betancourt JL, Latorre C, Rech JA, Quade J, Rylander KA. 2000. A 22,000-year record of monsoonal precipitation from northern Chile's Atacama Desert. *Science* 289: 1542-1546.
- Cahoon SMP, Sullivan PF, Post E and Welker JM. (2012). Large herbivores limit CO₂ uptake and suppress carbon cycle responses to warming in West Greenland. *Glob. Change Biol.*18: 469-479.
- Demesure B, Sodzi N and Petit RJ. 1995. A set of Universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of the mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4(1): 129-131.
- Dumolin-Lapègue S, Pemonge M-H, and Petit RJ. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants, *Molecular Ecology* 6: 393-397.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11(12): 2571-81.
- Excoffier L. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Mol Ecol.* 2004;13:853-864
- Excoffier L. and Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Fér T. and Hroudová Z. 2009. Genetic diversity and dispersal of *Phragmites australis* in a small river system. *Aquatic Botany* 90: 165-171.
- Forbes MR, KE Muma and BP Smith. 2002. Diffuse coevolution: constraints on a generalist parasite favour use of a dead-end host. *Ecography* 25: 345-351.

- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Futuyma DJ and G Moreno. (1988). The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 207-233.
- Grivet, D. & Petit, R.J. 2002 Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. *Molecular Ecology*, 11, 1351-1362.
- Grivet D. and Petit RJ. 2003. Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics* 4(1): 47-56.
- Grosjean M., van Leeuwen JFN, van der Knaap WO, Geyh MA, Ammann B, Tanner W, Messerli B, Núñez LA, Valero-Garcés BL and Veit H. 2001. A 22,000 14C year BP sediment and pollen record of climate change from Laguna Miscanti (23°S), northern Chile. *Global and Planetary Change* 28: 35-51.
- Gonzalez-Gomez PL and Estades CF. 2009. Is natural selection promoting sexual dimorphism in the Green-backed Firecrown Hummingbird (*Sephanoides Sephaniodes*). *Journal of Ornithol* 150:351-356
- Guillot G, Mortier F and Estoup A. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712-715.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, version 7.0. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

- Hampe A, Arroyo J, Jordano P, and. Petit RJ. 2003. Rangewide phylogeography of a bird-dispersed Eurasian shrub: Contrasting mediterranean and temperate glacial refugia. *Molecular Ecology* 12: 3415-3426.
- Hamrick JL and Godt MJW . 1996. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Phil. Trans.R. Soc.Lond.B* 351: 1291-1298
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Hartley AJ, Chong G, Houston J and Mathers AE. 2005. 150 million years of climatic stability: Evidence from the Atacama Desert, northern Chile. *J. Geol. Soc. London* 162: 421-424.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc* 58: 247-276.
- Jerome CA and Ford BA. 2002. Comparative population structure and genetic diversity of *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) and its *Pinus* host species: insight into host-parasite evolution in parasitic angiosperms. *Molecular Ecology* 11(3):407-20.
- Kaiser J, Schefuß E, Lamyc F, Mohtadib M and Hebbeln D. 2008. Glacial to Holocene changes in sea surface temperature and coastal vegetation in north central Chile: high versus low latitude forcing. *Quaternary Science Reviews* 27: 2064-2075
- Kuijt J. 1988. Revision of *Tristerix* (Loranthaceae). *Systematic Botany Monographs* no. 19, American Society of Plant Taxonomists, Ann Arbor, Michigan, USA.

- Latorre C, Betancourt JL and Arroyo MTK. 2006. Late Quaternary vegetation and climate history of a perennial river canyon in the Río Salado basin (22°S) of northern Chile. *Quaternary Research* 65: 450–466.
- Librado P and Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Maldonado A and Villagrán C. 2002a. Paleoenvironmental changes in the semiarid coast of Chile (~32°S) during the last 6200 cal years inferred from a swamp-forest pollen record. *Quaternary Research* 58: 130-138.
- Maldonado A and Villagrán C. 2006. Variability of the northern limit of the southern Westerlies over the last 9900 cal yr BP from a swamp forest pollen record along the semiarid coast of Chile (32°05'S). *Quaternary Research* 66: 246-258.
- Maldonado A and Rozas E. 2008. Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Atacama (F.A. Squeo, G. Arancio & J.R. Gutiérrez, eds). Capítulo 16. Clima y Paleoambientes durante el Cuaternario Tardío en la Región de Atacama. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 16: 293 - 304
- Mauseth JD, Montenegro G, and Walckowiak AM. 1984. Studies on the holoparasite *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) infecting *Trichocereus chilensis* (Cactaceae). *Canadian Journal of Botany* 62: 847–857.
- Medel R, Botto-Mahan C, Smith-Ramirez C, Mendez MA, Ossa CG, Caputo LN and Gonzales WL. 2002. Historia natural cuantitativa de una relación parásito-

- hospedero: el sistema *Tristerix*-cactáceas en Chile semiárido. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 127–140.
- Medel R, Méndez MA, Ossa CG. & Botto-Mahan C. 2010. Arms Race Coevolution: The Local and Geographical Structure of a Host–Parasite Interaction. *Evolution, Education & Outreach* 3:26–31 27.
- Montoya JM and Raffaelli D (2010). Climate change, biotic interactions and ecosystem services. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 365: 2013-2018.
- Mulvey M, Aho JJ, Lybeard C, Leberg PL and Smith MH. 1991. Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution* 45: 1628 –1640.
- Nadler SA. 1995. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *Journal of Parasitology* 81: 395–403.
- Nybohm H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143–1155.
- Nybohm H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers. *Perspect. Plant Ecol.*, 3: 93–114.
- Ossa PG, Pérez F, Armesto JJ. 2013. Phylogeography of two closely related species of *Nolana* from the coastal Atacama Desert of Chile: post-glacial population expansions in response to climate fluctuations. *Journal of Biogeography*. doi: 10.1111/jbi.12152.

- Peakal R and Beattie (1995). Does ant dispersal of seeds in *Sclerolaena diacantha* (Chenopodiaceae) generate local spatial genetic structure? *Heredity* 75: 351-361
- Pérez F, Arroyo MTK and Armesto JJ (2009) Evolution of autonomous selfing accompanies increased specialization in the pollination system of *Schizanthus* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 96: 1168-1176.
- Pérez F (2011) Discordant patterns of morphological and genetic divergence in the closely related species *Schizanthus hookeri* and *S. grahamii* (Solanaceae) *Plant Systematics and Evolution* 293 (1-4): 197-205
- Petit RJ, Brewer S, Bordacs S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, et al. 2002a. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Petit RJ, U. M. Csaikl UM, S. Bordacs S, Burg K, Coart E, Cottrell J, vanDam B, et al. 2002b. Chloroplast DNA variation in European white oaks—Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Petit RJ, Hampe A, and Cheddadi R. 2005. Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *Taxon* 54: 877-885.
- Pons O and Petit RJ 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237-1245.
- Price PW. 1980. *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

- Rivera-Hutinel A. 2008. Ecología espacial y epidemiología del muérdago *Tristerix aphyllus*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Ecología Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- Rech JA, Quade J and Betancourt JL. 2002. Late Quaternary paleohydrology of the central Atacama Desert (lat 22°–24°S), Chile. *Geological Society of America Bulletin* 114, 334–348.
- Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 1992;9:552–569.
- Sang T, Crawford DJ and Stuessy TF. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84: 1120–1136.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, et al. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE and Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequence to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III." *American Journal of Botany* 94(3): 275-288.
- Smith SA and Donoghue MJ. (2008). Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants. *Science* 322: 86–89.

- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, and Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tate JA and Simpson BB. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28: 723–737.
- Thiel-Egenter C, Gugerli F, Alvarez N et al. (2009) Effects of species traits on the genetic diversity of high-mountain plants: a multi-species study across the Alps and the Carpathians. *Global Ecology and Biogeography*, 18: 78–87.
- Thompson JN. 1994. *The coevolutionary process*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Via S. 1990. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annual Review of Entomology* 35: 421– 446.
- Weising K and Gardner RC. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42, 9–19.
- Willis KJ and Niklas KJ (2004). The role of Quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 359: 159–172.

- Wookey PA, Aerts R, Bardgett RD, Baptist F, Bråthen KA, Cornelissen JHC, Gough L, Hartley IP, Hopkins DW, Lavorel S et al. (2009). Ecosystem feedbacks and cascade processes: understanding their role in the responses of arctic and alpine ecosystems to environmental change. *Global Change Biology* 15: 1153–1172.
- Woolley SM, Posada D and Crandall KA. 2008. A Comparison of Phylogenetic Network Methods Usings Computer Simulation. *PLoS ONE*, 3(4): e1913.
- Zuber D, Widmer A. 2009. Phylogeography and host race differentiation in the European mistletoe (*Viscum album* L.). *Mol Ecol* 18:1946–1962.

ANEXO 1

Extracción de DNA

Reactivos:

- dH₂O
- Polyethylene glycol 8000
- Tris-HCl pH7.5 (Sol. Stock 1M)
- NaCl (Sol. Stock 5M)
- CTAB
- EDTA (Sol. Stock 0.5M)
- Sarkosyl
- Polyvinylpolypyrrolidona (PVP)
- Acetato de amonio (Sol. 7.5 M)
- Cloroformo 100%
- Isopropanol 100%
- Etanol 95%
- - Buffer TE (10:1)

Preparar solución TVBG:

- 25 ml dH₂O
- 10 ml 10% polyethylene glycol 8000
- 10 ml 1 M Tris-HCl ph 7.5
- 28 ml 5M NaCl
- 20 ml 10% CTAB
- 4 ml 500 mM EDTA pH8.0
- 3 ml 10% Sarkosyl

Volumen total 100 ml

Protocolo:

1. Colocar ~0.1 mg de tejido seco en un mortero, moler hasta hacer un polvo fino. Pasar con ayuda de papel aluminio a un tubo limpio de 1.5 ml. Añadir PVP en polvo (1 espátula pequeña) hasta llenar 1/4 a 1/3 del tubo. Homogeneizar los polvos con vórtex.
2. Añadir ~0.3 ml de la solución TVBG, mezcle vigorosamente con ayuda del émbolo hasta formar una pasta uniforme. Añadir otros 0.3 ml de TVBG y mezcle vigorosamente con el émbolo de plástico hasta homogenizar.
3. Incubar a 65° por 30 minutos, mezclando con un vórtex cada 5 minutos.
4. Deje enfriar y añada un volumen similar de cloroformo (~ 0.7 ml), cierre bien el tubo y mezcle vigorosamente (use vortex preferentemente). Dejar que se separen las fases y volver a mezclar en vórtex. Repetir cuatro veces.

5. Centrifugar los tubos a máxima velocidad por 15 minutos (o más), y luego remover cuidadosamente la fase sobrenadante sin tocar la interface ni las paredes del tubo (200 μ l aproximadamente). Colocar el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 ml.
6. Añadir 1/10 de volumen de Acetato de amonio 7.5 M y 1 volumen de isopropanol, mezclar vigorosamente y dejar reposar por 5 minutos, luego centrifugar a máxima velocidad.
7. Debería observarse el pellet, y botar el sobrenadante. Llene el tubo con etanol al 95% y botarlo nuevamente, invertir el tubo sobre papel absorbente y luego dejar secar. El pellet podría verse oscuro.
8. Luego de 30 minutos mas o menos (no dejar que se seque completamente) disolver el pellet en 50-100 μ l de agua o TE. Medir el contenido en gel o nanodrop para estimar la concentración.

TABLAS

Tabla 1. Muestra la ubicación geográfica y altura de las 17 localidades estudiadas. Además se señala el código con que se identificó a cada sitio.

LOCALIDAD	CODIGO	LATITUD S	LONGITUD W	h (mt)
Llanos de Challe	CH	28° 34,575'	71° 08,051'	142,0368
Freirina	FR	28° 34,527'	71° 05,470'	438,6072
La Higuera	HG	29° 24,608'	71° 10,457'	10,3632
Los Hornos	LH	29° 38,129'	71° 17,358'	31,3944
Huampulla	HU	30° 26,722'	70° 59,445'	598,6272
Fay Jorge	FJ	30° 38,735'	71° 38,715'	243,84
Oruro	OR	30° 39,056'	71° 31,603'	98,1456
Monte Patria	MP	30° 42,319'	71° 01,385'	405,0792
Combarbala	CM	31° 09,115'	71° 01,650'	831,4944
Los Rulos	LR	31° 18,876'	71° 13,089'	596,7984
Las Chinchillas	LC	31° 30,402'	71° 07,016'	625,7544
Totalillo	TT	32° 01,565'	71° 30,460'	3,524
Tilama	TL	32° 05,622'	71° 15,046'	302,9712
La Ballena	LB	32° 16,585'	71° 28,183'	5,048
Cabildo	CB	32° 26,503'	71° 00,565'	244,4496
Caleu	CL	33° 01,479'	70° 57,371'	1068,324
Farellones	FA	33° 20,783'	70° 21,093'	1612,087
				2

Tabla 2. Resumen de los cebadores probados en el estudio, en negrita se muestra el único cebador variable encontrado para *T. aphyllus*.

Partidor	Secuencia 5'-3'	Referencia
trnH-trnK	CGG GAAT TGA ACC CGC G	Demesure et al., 1995
	CGT AAT GCT CAT AAC TTT CCT CTA GAC	
trnH-psbA	ACT GCC TTG ATC CAC TTG GC	Hamilton 1999
	CGAAGC TCC ATC TAC AAAT GG	
trnS-trnG	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC	Shaw et al., 2007
	GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	
rpoB-trnC	CKA CAA AAY CCY TCR AAT TG	Shaw et al., 2005
	CAC CCR GAT TYG AAC TGG GG	
trnC-trnD	TTT GTT TTC TAC TGC AAC TAT CCC G	Demesure et al., 1995
	AAA GCA GCC CAA GTG AAA CTG AC	
trnC-ycf6R	CCA GTT CRA ATC YGG GTG	Shaw et al., 2005
	GCC CAA GCR AGA CTT ACT ATA TCC AT	
psbMF-trnD	AGC AAT AAA TGC RAG AAT ATT TAC TTC CAT	Shaw et al., 2005
	GGG ATT GTA GYT CAA TTG GT	
trnD-trnT	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC	Demesure et al., 1995
	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG	
trnS-trnfM	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC	Demesure et al., 1995
	CAT AAC CTT GAG GTC ACG GG	
trnL-trnF	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberet et al. 1991
	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	
trnT-trnL	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	Taberet et al. 1991
	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	
rpl20-rps12	TTT GTT CTA CGT CTC CGA GC	Hamilton 1999
	GTC GAG GAA CAT GTA CTA GG	
psbB-psbH	GTT TAC TTT TGG GCA TGC TTC G	Hamilton 1999
	CGC AGT TCG TCT TGG ACC AG	
ccmp4	CCA AAA TAT TBG GAG GAC TC	Weising & Gardner, 1999
	GTG GTT TGA AAT CCA GAT GC	
trn T-F	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT	Taberet et al. 1991
	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	

Tabla 3.1.1. Frecuencia de los haplotipos encontrados en los hospederos más comunes de *Tristerix aphyllus* (*Ec. chilensis*, *Eu. acida* y *Ec. deserticola*). En negrita se encuentran el número absoluto de los haplotipos encontrados y abajo, en cursiva, su frecuencia relativa.

Hospedero	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
<i>Eu acida</i>	8 <i>0,075</i>	1 <i>0,009</i>	6 <i>0,056</i>	8 <i>0,075</i>	0 <i>0,000</i>	3 <i>0,084</i>	14 <i>0,131</i>	0 <i>0,000</i>	4 <i>0,037</i>
<i>Ec chilensis</i>	1 <i>0,009</i>	4 <i>0,037</i>	5 <i>0,047</i>	12 <i>0,112</i>	14 <i>0,131</i>	5 <i>0,047</i>	1 <i>0,009</i>	0 <i>0,000</i>	3 <i>0,028</i>
<i>Ec deserticola</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	1 <i>0,009</i>	1 <i>0,009</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	10 <i>0,093</i>	1 <i>0,009</i>	0 <i>0</i>
Total	9 <i>0,084</i>	5 <i>0,047</i>	12 <i>0,112</i>	21 <i>0,196</i>	14 <i>0,131</i>	14 <i>0,131</i>	25 <i>0,234</i>	1 <i>0,009</i>	7 <i>0,065</i>

Tabla 3.1.2. Índices de diversidad por especies hospederas más comunes y en total (*Eu. acida*, *Ec. chilensis* y *Ec. deserticola*): Número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), número de haplotipos (K), y número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π).

Hospedero	Nº Sec	S	K	H	Π
<i>Eu acida</i>	49	19	7	0,827	6,645
<i>Ec chilensis</i>	46	20	8	0,809	5,930
<i>Ec deserticola</i>	12	10	3	0,318	1,667
Total	107	20	9	0,855	6,845

Tabla 3.1.3: Muestra la tabla de AMOVA realizada a asociando a los haplotipos con los tres hospederos más comunes de *T. aphyllus* (*Eu. acida*, *Ec. chilensis* y *Ec. deserticota*). Con (*) se señalan los índices de fijación significativos.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	2	59,664	0,545 Va	14,62	FCT*
Entre poblaciones dentro de los grupos	18	215,301	2,453 Vb	65,77	FSC*
Dentro de poblaciones	77	56,321	0,731 Vc	19,61	
Total	97	331,286	3,76971		

Tabla 3.1.4. Bajo la diagonal se observan los valores de FST por especie hospedera. Sobre la diagonal se indica con un (+) valores significativos ($p < 0.05$) y con (-) valores no significativos ($p > 0.05$).

	<i>Eu. acida</i>	<i>Ec. chiloensis</i>	<i>Ec. deserticola</i>
<i>Eu. acida</i>		+	+
<i>Ec. chiloensis</i>	0.1173		+
<i>Ec. deserticola</i>	0.2497	0.5094	

Tabla 3.2.1. Frecuencia de los haplotipos encontrados en los hospederos más comunes de *Tristerix aphyllus*, que se encuentran en coexistencia (*Eu. acida* y *Ec. chiloensis*). En negrita se encuentran el número absoluto de los haplotipos encontrados y abajo, en cursiva, su frecuencia relativa.

Hospedero	H1	H2	H3	H4	H6	H7	H9
<i>Eu. acida</i>	3 <i>0,057</i>	1 <i>0,019</i>	6 <i>0,113</i>	7 <i>0,132</i>	2 <i>0,038</i>	3 <i>0,057</i>	4 <i>0,019</i>
<i>Ec. chiloensis</i>	1 <i>0,019</i>	4 <i>0,075</i>	5 <i>0,094</i>	8 <i>0,151</i>	5 <i>0,094</i>	1 <i>0,019</i>	3 <i>0,075</i>
Total	4 <i>0,075</i>	5 <i>0,094</i>	11 <i>0,208</i>	15 <i>0,283</i>	7 <i>0,132</i>	4 <i>0,075</i>	7 <i>0,094</i>

Tabla 3.2.2. Índices de diversidad forzando a los haplotipos a agruparse con respecto a las especies hospederas *Eu. acida* y *Ec. chilensis*: Número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), número de haplotipos (K), y número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π).

Hospedero	Nº Sec	S	K	H	Π
<i>Eu. acida</i>	26	19	7	0,849	6,898
<i>Ec. chilensis</i>	27	19	7	0,838	6,006
Total	53	19	7	0,837	6,392

Tabla 3.2.3: Muestra la tabla de AMOVA realizada asociando a los haplotipos con los dos hospederos más comunes de *T. aphyllus* (*Eu. acida* y *Ec. chilensis*), en las poblaciones en que estos coexisten.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	1	1,884	-0,498 Va	-15,71	FCT
Entre poblaciones dentro de los grupos	8	117,755	2,588 Vb	81,57	FSC*
Dentro de poblaciones	43	46,55	1,083 Vc	34,14	
Total	52	166,189	3,171		

Tabla 4.1. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las poblaciones estudiadas en el rango de distribución de *Tristerix aphyllus*. En negrita se encuentran el número absoluto de los haplotipos encontrados y abajo, en cursiva, su frecuencia relativa.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
CH	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	13 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
FR	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	1 <i>0.167</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	4 <i>0.667</i>	1 <i>0.167</i>	0 <i>0</i>
HG	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	1 <i>0.2</i>	4 <i>0.8</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
LH	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	1 <i>0.067</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	14 <i>0.933</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
FJ	9 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
OR	4 <i>0.4</i>	5 <i>0.5</i>	1 <i>0.1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
HU	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	3 <i>0.3</i>	0 <i>0</i>	7 <i>0.7</i>
MP	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	4 <i>0.8</i>	1 <i>0.2</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
CM	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	8 <i>0.8</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	2 <i>0.2</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
LR	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	2 <i>0.167</i>	9 <i>0.75</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	1 <i>0.0833</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
LC	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	6 <i>0.545</i>	0 <i>0</i>	5 <i>0.455</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
TL	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	5 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
LB	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	7 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
TT	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	5 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
CL	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	6 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
CB	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	4 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
FA	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	4 <i>1</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>	0 <i>0</i>
Total	13 <i>1.4</i>	5 <i>0.5</i>	12 <i>1.234</i>	33 <i>4.362</i>	14 <i>3</i>	12 <i>1.655</i>	40 <i>39.833</i>	1 <i>0.167</i>	7 <i>0.7</i>

Tabla 4.2. Índices de diversidad por localidad y en total: Número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H) y número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π)

Localidad	Nº Sec	S	K	H	Π
CH	13	0	1	0	0
FR	6	10	3	0,6	3,3333
HG	5	10	2	0,4	4
LH	15	9	2	0,13333	1,2
FJ	9	0	1	0	0
OR	10	4	3	0,64444	1,1556
HU	10	9	2	0,46667	4,2
MP	5	10	2	0,4	4
CM	3	3	2	0,35556	1,06667
LR	12	9	3	0,43039	1,77273
LC	11	4	2	0,54545	2,18182
TL	5	0	1	0	0
LB	7	0	1	0	0
TT	5	0	1	0	0
CL	6	0	1	0	0
CB	4	0	1	0	0
FA	4	0	1	0	0

Tabla 4.3. Bajo la diagonal se observan los valores de FST por sitio de muestreo. Sobre la diagonal se indica con un (+) valores significativos ($p < 0.05$) y con (-) valores no significativos ($p > 0.05$).

	CH	FR	HG	LH	FJ	OR	HU	MP	CM	LR	LC	TL	LB	TT	CL	CB	FA
CH	1,00	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FR	0,14	1,00	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HG	0,21	-0,17	1,00	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LH	0,01	-0,05	0,00	1,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FJ	1,00	0,82	0,81	0,90	1,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OR	0,94	0,75	0,74	0,86	0,26	1,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HU	0,70	0,50	0,49	0,64	0,85	0,68	1,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MP	0,86	0,52	0,41	0,75	0,78	0,81	0,69	1,00	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CM	0,95	0,76	0,74	0,87	0,84	0,71	0,81	0,41	1,00	+	+	+	+	+	+	+	+
LR	0,90	0,68	0,67	0,81	0,76	0,66	0,78	0,50	0,31	1,00	+	+	+	+	+	+	+
LC	0,89	0,69	0,65	0,82	0,76	0,67	0,78	0,19	0,17	0,20	1,00	+	+	+	+	+	+
TL	1,00	0,77	0,75	0,89	1,00	0,82	0,80	0,60	0,58	-0,07	0,28	1,00	+	+	+	+	+
LB	1,00	0,80	0,79	0,90	1,00	0,84	0,82	0,66	0,62	-0,02	0,33	0	1,00	+	+	+	+
TT	1,00	0,77	0,75	0,89	1,00	0,82	0,80	0,60	0,58	-0,07	0,28	0	0	1,00	+	+	+
CL	1,00	0,84	0,83	0,92	1,00	0,81	0,83	0,81	0,90	0,84	0,82	1	1	1	1,00	+	+
CB	1,00	0,80	0,79	0,91	1,00	0,78	0,81	0,76	0,88	0,81	0,80	1	1	1	0	1,00	+
FA	1,00	0,80	0,79	0,91	1,00	0,78	0,81	0,76	0,88	0,81	0,80	1	1	1	0	0	0

Tabla 5.1. Muestra los valores de varianza obtenidos con los distintos valores de k, en el análisis de SAMOVA. En negritas se muestra el valor de FCT en que se alcanza el plato de máxima varianza entre grupos de poblaciones.

Varianza	2	3	4	5	6
Entre grupos	63.00	71.01	71.91	84.09	83.78
entre poblaciones dentro de grupos	24.46	16.61	13.22	0.95	1.18
dentro de poblaciones	12.55	12.38	14.87	14.96	15.04

Tabla 5.2: Valores de FST entre los grupos obtenidos por SAMOVA. NN: Distribución Norte (CH, FR, LH, HG), HU: Huampula (HU), FJ: Fray Jorge (FJ,OR), N: Distribución Centro (MP, CM, LR, LC,TL,LB,TT), S: Distribución Sur (CB, CL, FA). Los valores de FST se muestran bajo la diagonal en negrita y los p-valores significativos con un signo + ($p << 0,05$).

Grupos	NN	HU	FJ	N	S
NN		+	+	+	+
HU	0.86531		+	+	+
FJ	0.71286	0.93148		+	+
N	0.88512	0.86826	0.85772		+
S	0.84719	0.91517	0.87527	0.74625	

Tabla 5.3. Muestra los valores de índices de neutralidad de Tajima (D) y Fu (Fs), para cada uno de los grupos de poblaciones, determinados por los análisis de SAMOVA y Geneland.

Grupo	Fs	p	D	p
NN	4,37027	ns	-1,45631	< 0.05
FJ	1,49841	ns	0,79376	ns
HU	15,43918	ns	0.00000	ns
N	5,90775	ns	7,09199	ns
S	-	-	-	-

LEYENDAS FIGURAS

Figura 1: El mapa muestra el nombre, código y ubicación de cada una de las localidades estudiadas.

Figura 2. Frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las poblaciones estudiadas en el rango de distribución de *Tristerix aphyllus*

Figura 3: Red de haplotipos para *Tristerix aphyllus* obtenidos mediante MJ. Los distintos colores identifican a los diferentes zonas a las que pertenecen los haplotipos. Los círculos negros entre haplotipos representan los pasos mutacionales que separan un haplotipo de otro. El amarillo corresponde a las poblaciones del norte del muestreo (NN), el verde corresponde a la población de Huampulla (HU), el azul a las del centro del muestreo (N), el rojo señala a la zona de Fray Jorge (FR-OR) y el anaranjado al sur del muestreo (S).

Figura 4.1. En el mapa los colores señalan los grupos formados por el análisis de SAMOVA. El amarillo corresponde a las poblaciones del Norte del muestreo (NN), el verde corresponde a la población de Huampulla (HU), el azul a las del centro del Norte Chico (N), el anaranjado señala a la zona de Fray Jorge (FR-OR) y el rojo al Sur del muestreo (S).

Figura 4.2. Isolneas de la probabilidad *a posteriori* de los grupos determinados a través de análisis con Genland. Se distinguen cinco zonas correspondientes, de izquierda a derecha corresponden a: NN= norte del muestreo (CH, FR, HG y LH), HU= Huampulla, FJ= Fray Jorge y Oruro, N= centro del muestreo (MP, CM, LR, LC, TL, LB y TT), S= sur del muestreo (CB, CL y FA). Las regiones con gran probabilidad de inclusión se indican con blanco y las áreas donde disminuye la probabilidad de inclusión se denotan con un aumento gradual de la coloración

Figura 4.3. Estructuración geográfica de *T. Aphyllus* según los análisis de Geneland (izquierda) y de SAMOVA (derecha). Los grupos corresponden a: NN= norte del muestreo (CH, FR, HG y LH), N= centro del muestreo (MP, CM, LR, LC, TL, LB y TT), S= sur del muestreo (CB, CL y FA), FJ= Fray Jorge y Oruro, HU= Huampulla

FIGURAS

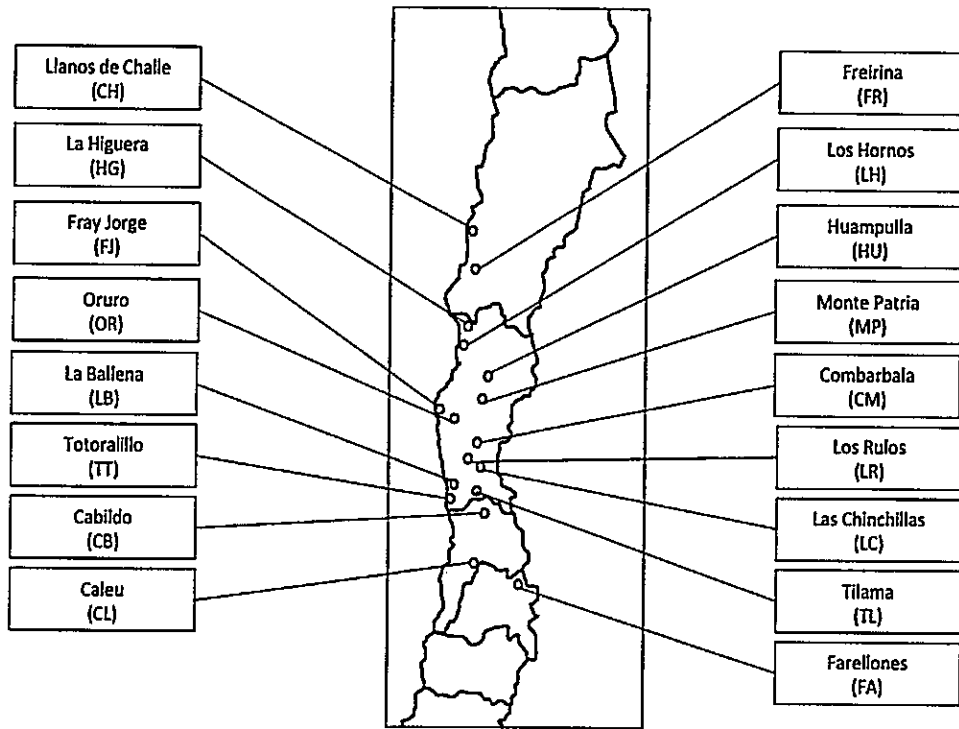


Figura 1

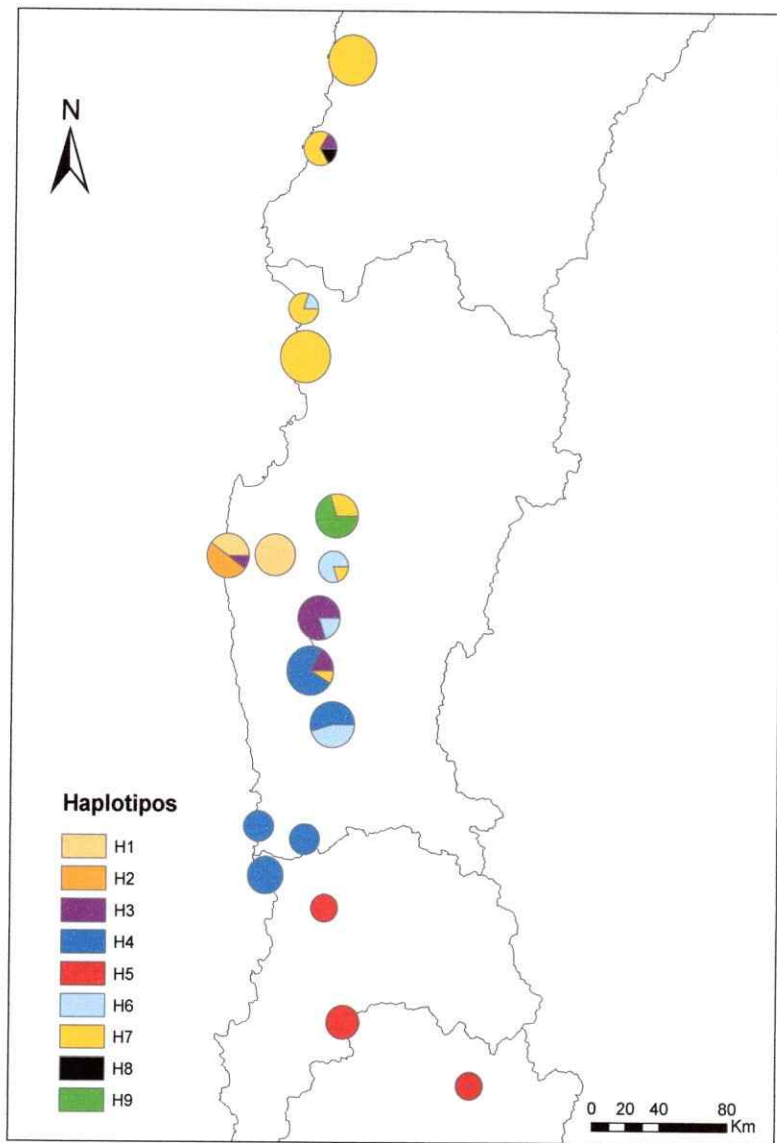


Figura 2

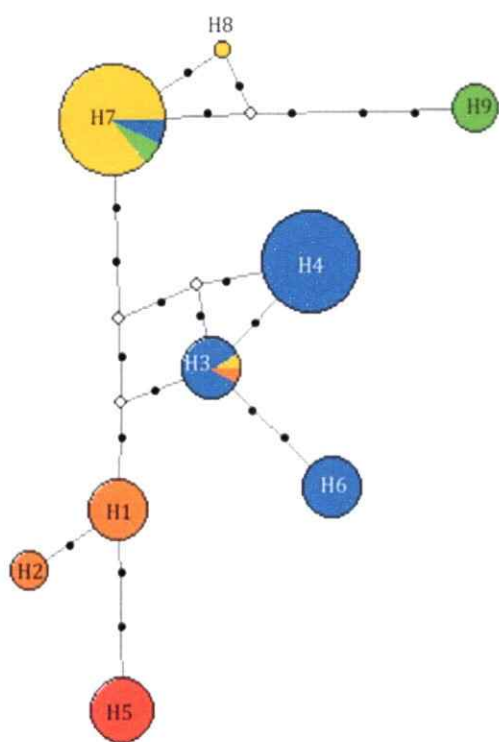


Figura 3

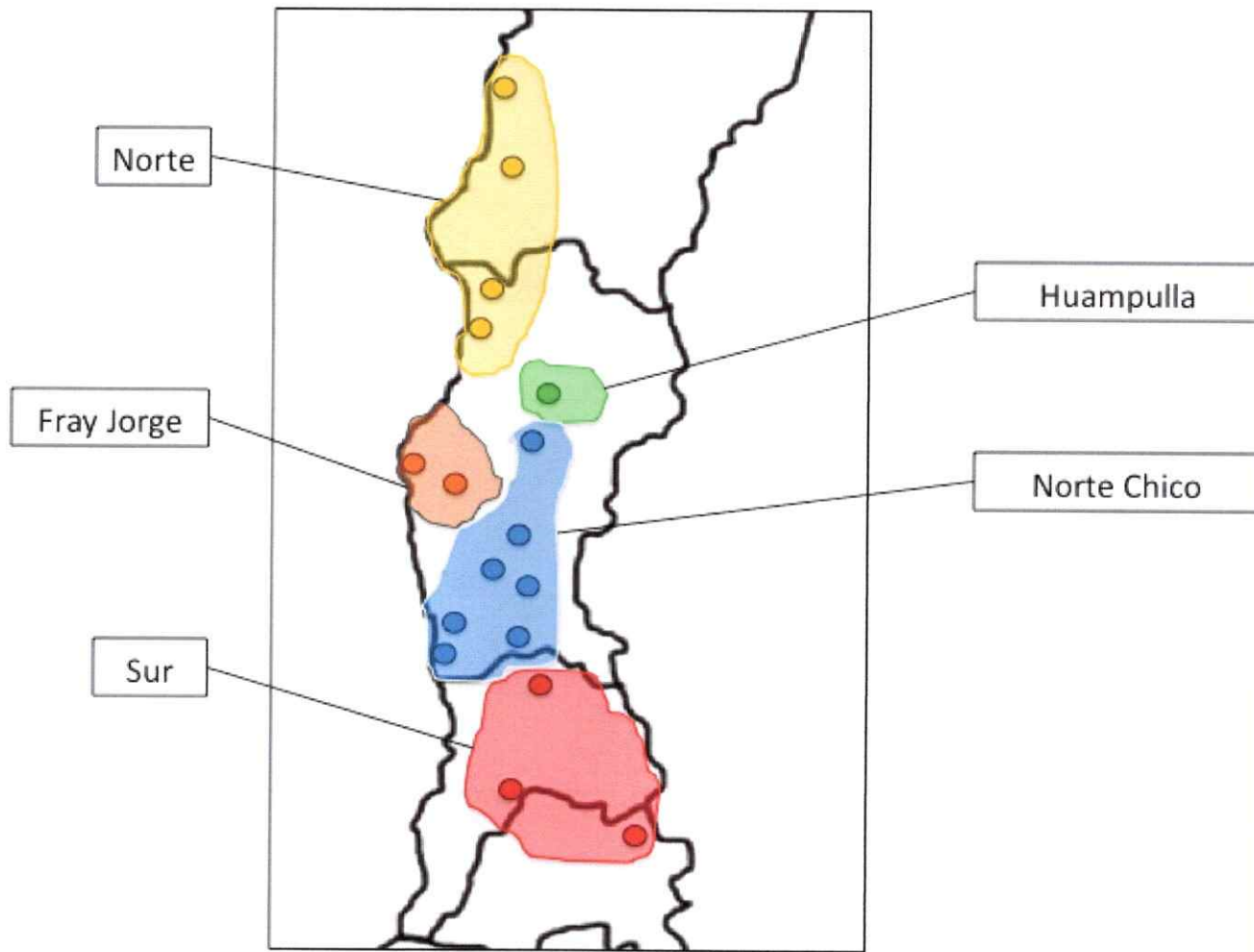


Figura 4.1

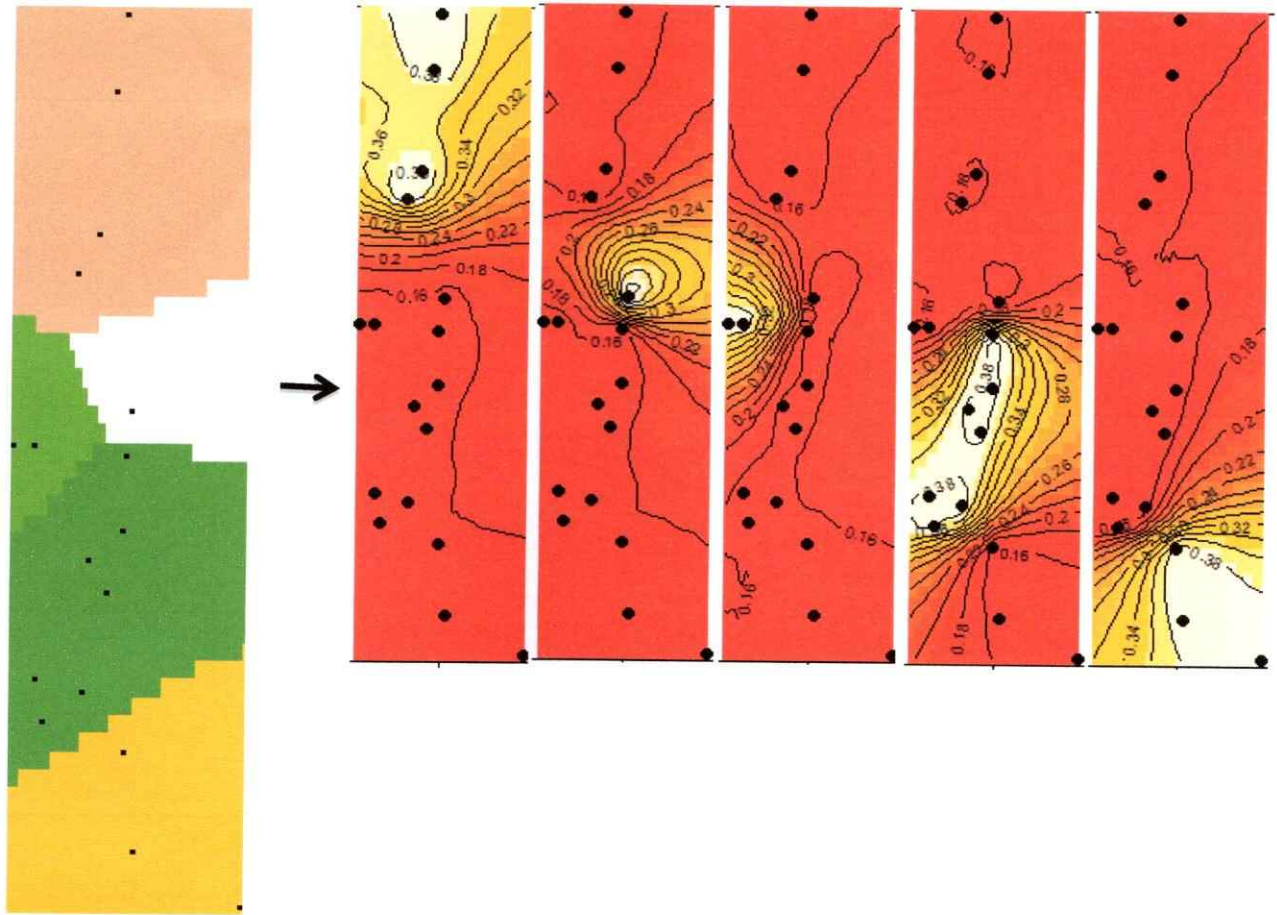


Figura 4.2

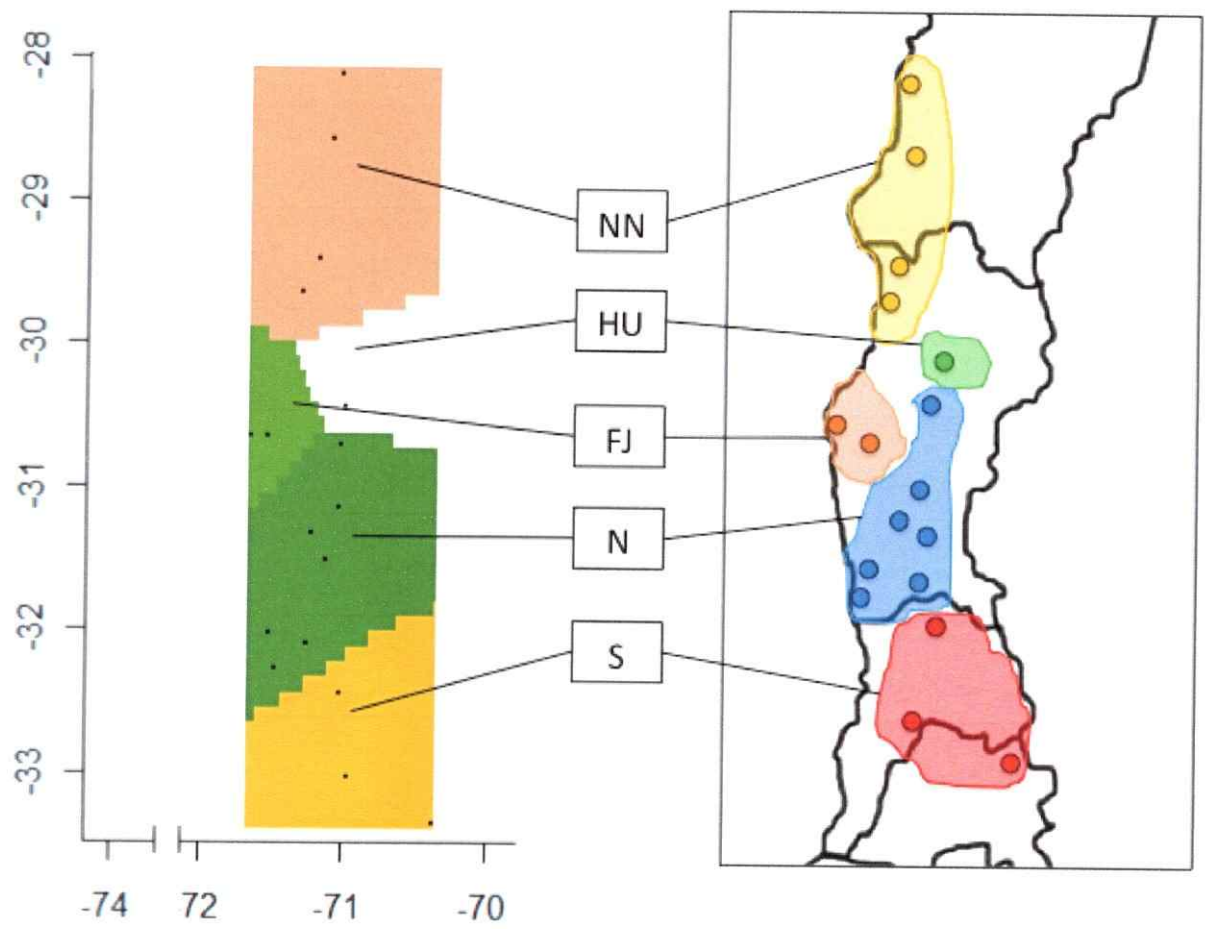


Figura 4.3

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados analizados en esta tesis permiten concluir que *Tristerix aphyllus* no muestra preferencia particulares por ninguno de sus hospederos principales, lo que tiene como consecuencia que no se observen diferencias en la adecuación biológica del muérdago cuando parásita uno u otro hospedero, y que no se observen fuertes ajustes recíprocos entre el parásito y sus hospederos en rasgos de defensa y contra defensa. Además, la falta de preferencia por uno u otro hospedero se reflejada en que la estructuración genética, no responda a la identidad de los hospederos, y que se asocian más bien a la presencia de refugios xéricos durante los periodos húmedos de la última glaciación y la posterior expansión en periodos interglaciares, a lo que podría sumarse algunos efectos ecológicos asociados al comportamiento de *M. thenca* que dispersa las semillas a cortas distancias y aspectos relacionados con la biología reproductiva del muérdago que podría restringir la aparición de haplotipos nuevos.

Se espera que las interacciones bióticas sean especialmente relevante en especies vegetales cuya adecuación biológica depende fuertemente de otras especies, sin embargo, *Tristerix aphyllus* no muestra preferencia por ninguno de sus hospederos principales, y tampoco muestra diferencia en la adecuación biológica cuando explota a *Eulychnia acida* o *Echinopsis chiloensis*, esto pudiera ser causado porque los hospederos no difieren en su calidad como recurso, y/o porque el muérdago posee caracteres fisiológicos plásticos que le permiten maximizar la

explotación de los hospederos independientemente de sus características específicas, lamentablemente no hay estudios que nos permitan señalar la real causa del patrón encontrado.

Por su parte, los hospederos responden a la infección, desarrollando caracteres que disminuirían la probabilidad de infección, a través del aumento en largo de las espinas y en el grosor de la epidermis, en algunas de las localidades estudiadas, donde posiblemente la virulencia del parásito es más intensa. A pesar de la respuesta de los hospederos, no se observan fuertes potenciales coevolutivos en los ajustes recíprocos entre los caracteres de defensa y contra defensa (largo de la radícula *versus* largo de las espinas), lo que puede ser reflejo de una interacción reciente entre *T. aphyllus* y sus hospederos, que no ha permitido el desarrollo de caracteres que respondan fuertemente a la interacción.

A diferencia de otras platas parásitas en las que la estructuración genética se relaciona estrechamente con el tipo de hospedero infectado, *T. aphyllus* no muestra una relación entre su estructuración genética y la identidad de hospederos. Los resultados muestran cinco grupos haplotípicos bien definidos, que posiblemente estén dando cuenta de efectos fundadores o de cuello de botella, asociados a la presencia de refugios xéricos durante las fluctuaciones climáticas del Plioseno-Holoceno, de este modo la estructuración genética de *Tristerix aphyllus* respondería más bien a la historia paleoclimática de Chile árido y semiárido, aunque algunos efectos ecológicos y aspectos relacionados con la biología reproductiva del

muérdago podrían ser relevantes a la hora de explicar la distribución actual de haplotipos.

En conclusión, los patrones observados nos sugieren que *T. aphyllus* no responde a la identidad de los hospederos, posiblemente como una estrategia tendiente a maximizar la adecuación biológicas en cualquiera de ellos, y así poder sortear las limitaciones en la capacidad de encuentro entre el parásito y sus distintos hospederos, causada principalmente por la conducta del dispersor que mueve las semillas a cortas distancias de la planta madre, generando un patrón agregado de dispersión, disminuyendo la probabilidad de encuentro del muérdago con hospederos de alta calidad como recurso. Lo que se vería reflejado en una estructuración genética del muérdago independiente de la identidad del hospedero. En estudios posteriores, sería interesante determinar como afecta el parasitismo a las distintas especies hospederas, ya que las plantas parásitas no solo podrían tener potencial para moldear la estructuración genética de sus hospederos, si no también podrían moldear diversas respuestas fisiológicas de las plantas hospedantes, como medida de compensación al parasitismo, lo que además podría dar cuenta de la calidad como recurso de cada especie hospedera.