

CAMBIOS QUÍMICOS EN LA FENOLOGÍA DE LAS FLORES DE MUÉRDAGO (*PSITTACANTHUS CALYCVLATUS*) Y SU POSIBLE RELACIÓN EN LA POLINIZACIÓN

Alán Gamaliel Ramírez Rodríguez (1), Elizabeth Quintana Rodríguez (2), Domancar Orona Tamayo (2*)

¹[Ingeniería Bioquímica, ITESI] | gamaghost@live.com.mx

²[Depto. Ing. Genética. CINVESTAV-Irapuato] | *domancar@ira.cinvestav.mx

Resumen

El muérdago *Psittacanthus calyculatus*, es una planta hemiparasita que infecta árboles de interés comercial y ecológico. *P. calyculatus* desarrolla inflorescencias color naranja en estadios fenológicos jóvenes hasta color rojo en estadios maduros que atraen polinizadores. Cuando la flor entra en antesis, secreta néctar rico en azúcares y aminoácidos, así como liberación de compuestos orgánicos volátiles (COVs). Previa a la entrada de antesis, el botón floral sin abrir esta cargado de néctar y cuando la antesis inicio, el néctar incrementa, magnificándose al día subsecuente disminuyendo en días posteriores. Sacarosa es el azúcar principal en néctar, manteniendo estable en los dos primeros días fenológicos, disminuyendo drásticamente al tercer día, no así la glucosa y fructosa que se mantienen estables en todos los estadios. Aminoácidos energéticos como prolina y alanina fueron más concentrados en los estadios jóvenes. Liberación de COVs fue similar en ambos estadios y prevaleció la liberación de β -ocimeno. La síntesis de carotenoides fue mayor en estadios maduros. Todos estos compuestos sintetizados y liberados por la flor de *P. calyculatus* en antesis, podrían contribuir en la atracción de polinizadores de diferente nivel trófico y contribuir en la reproducción de *P. calyculatus*.

Abstract

Mistletoe *Psittacanthus calyculatus* is hemiparasitic plant that infect commercial and ecologic interest trees. *P. calyculatus* develops yellow color inflorescences in young phenological stages and changed to red color in old stages that are very attractive to pollinators. When mistletoe flower begins anthesis, nectar rich in sugar and amino acids, and volatile organic compounds (VOCs) are released. Previously to the flower anthesis, the unopened floral bud was loaded with high amount of nectar, and anthesis begun the nectar increased in this stage, and magnified on the phenological stage two, however, in mature stages nectar decreased dramatically. Sucrose was the main sugar and was stable on the first phenological stages and decrease in old stages; by contrast, glucose and fructose were constant in all phenological stages. Energetic amino acids such as proline and alanine were concentrated in young stages than the old phenological stages. VOCs released were similar in phenological stages and β -ocimene was the volatile more concentrated in all stages. Carotenoids synthesis was highest in the old phenological stages. These chemical compounds synthesized and released by *P. calyculatus* flowers could be able to attract pollinators from different trophic level and contribute in the *P. calyculatus* reproduction.

Palabras Clave

Néctar floral, polinización, azúcares, aminoácidos, compuestos orgánicos volátiles.

INTRODUCCIÓN

El parasitismo es una simbiosis donde un organismo adquiere nutrientes de un hospedero sin retribuir ningún servicio o recompensa al huésped, ahorrando su síntesis, ocasionando generalmente daños al huésped [1]. Los organismos parásitos van desde nivel molecular hasta niveles tróficos mayores como las plantas parásitas que son un grupo taxonómicamente diverso [2]. Muérdagos comprenden un grupo especial de plantas parásitas que infectan un amplio grupo de árboles y arbustos [3], que son capaces de formar una estructura especializada llamada haustorio, la cual por penetración conectara al xilema del hospedero formando una conexión específica con el floema [4] del cual obtendrá del hospedero componentes nutrimentales como agua, sales minerales y aminoácidos [5].

Muérdagos del género *Psittacanthus* son endémicos del Nuevo Mundo, perteneciente a la familia Loranthaceae con cerca de 990 especies y 73 géneros [6] encontrándose desde México hasta Argentina [7]. *Psittacanthus* se distribuye a lo largo de México, pero es más común en el centro y sur del país [5]. La mayoría de los estudios sobre las especies de *Psittacanthus* se han enfocado en aspectos sobre el daño forestal, en México el muérdago *Psittacanthus* es considerado una plaga forestal y el segundo agente de destrucción de los bosques después del escarabajo descortezador [8], debido a que los haustorios pueden causar deformación en la madera reduciendo su calidad, y en la mayoría de los casos produce la muerte del hospedero [9,10]. Un árbol infestado por *Psittacanthus* utilizará recursos nutrimentales del hospedero sin detenerse, provocando la disminución del crecimiento meristemático y capacidad reproductiva necesaria para la producción de semillas y perpetuación del hospedero, y por consecuencia el hospedero está destinado con el tiempo a la muerte [11].

Psittacanthus calyculatus (*P. calyculatus*) DC. Don (Loranthaceae) habita áreas de entre 2000-2400 sobre el nivel del mar y parasita principalmente árboles de *Salix*, *Ulmus*, *Fraxinus*,

Annonay, *Populus*, *Acacia* y un gran número de árboles frutales, teniendo preferencia sobre todo en especies de *Prosopis laevigata* [7]. Quizá esta preferencia de *P. calyculatus* por *Prosopis* sea por el hecho de que han ocupado el mismo ambiente a lo largo de mucho tiempo y preferencia por hospederos con buen aporte de nutrientes como las leguminosas [1]. Esta capacidad multihospedera y dinámica de infección que presenta *P. calyculatus*, abre la puerta para entender la biología reproductiva que el muérdago necesita para poder atraer organismos polinizadores y posteriormente producir semillas que son dispersadas principalmente por aves. La atracción de polinizadores es muy importante para la planta ya que requiere de estos para poder reproducirse y continuar con su ciclo de vida. La planta genera estrategias de atracción de polinizadores que incluyen la formación de flores que secretan néctar floral (NF) rico en azúcares y aminoácidos esenciales para la nutrición de insectos y aves nectarívoros, liberación de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y síntesis de compuestos coloridos que pueden atraer insectos benéficos y repeler robadores de néctar sin retribuir la polinización [12,13]. Cada uno de estos rasgos es una estrategia evolutiva para formar mutualismos entre planta parásita y polinizador, beneficiando la reproducción de *P. calyculatus* [14]. El objetivo de este trabajo fue analizar la dinámica de secreción y química del NF, la emisión de COVs y cuantificación de carotenoides en el proceso previo y posterior a la anthesis de la flor del muérdago *P. calyculatus* y que relación tienen estos compuestos con la atracción de polinizadores que ayudan en la reproducción de la planta parásita.

MATERIALES Y METODOS

Sitio de estudio

Las mediciones y colectas se realizaron en los meses de junio-agosto de 2013 y 2014 en un área suburbana a las afueras de la ciudad de Irapuato, Guanajuato, la cual comprende un área densamente poblada de árboles del género *Prosopis laevigata*, las cuales estaban fuertemente infectadas por *P. calyculatus*, la cual produce inflorescencias con grupos de 10-20 flores por racimo, con seis pétalos cada una y siempre están

en grupos de tres flores que maduran de manera asincrónica.

Fenología de las flores

Antes de la medición de néctar y colección de las flores, se registro el previo e inicio de la antesis de la flor mediante el registro de los cambios fenológicos de la flor por día. Para ello, se encontraron botones que estaban semiabiertos, ya que un botón semiabierto tiende a abrir completamente al día siguiente, a partir de ahí, se registraron los días de actividad de la flor mediante la cuantificación y días de secreción de NF. Cuando un botón estaña semiabierto se le designo como día 0, y día 1 (inicio de la antesis) cuando el botón abrió completamente, subsecuentemente se registraron los días 2, 3 y 4 como diferentes estadios fenológicos florales.

Cinética de secreción de néctar floral

La medición de la secreción del NF se llevo a cabo cubriendo los botones semiabiertos con mallas de tela, que permitieron el paso del aire y la luz, estas evitaron que los polinizadores y robadores de néctar consumieran el NF. El NF fue colectado y se midió la cantidad de sólidos solubles por medio de un refractómetro graduado de 0-32 °Brix. La secreción del NF fue registrada cada dos horas comenzando a las 0700, 0900, 1100, 1300, 1500 y 1700 h y se realizo a partir del día 0 hasta el día 4. En un experimento a la par, se midió el néctar acumulado por día, esto con el fin de analizar qué día de la fenología de la flor secretaba más cantidad de NF, para ello, el NF acumulado se colecto solamente a las 1300 h a partir del día 0 hasta el día 4. En todos los casos las flores fueron cosechadas después de la última medición del NF y estas fueron colocadas en un horno precalentado a 60 °C para registrar el peso seco de la flor y relacionar la cantidad de sólidos solubles secretados en base a peso seco de la flor.

Química del NF

El análisis de la química del néctar consistió en recolectar NF acumulado por día en estadios fenológicos de la flor. A partir de 30 flores, el NF producido fue colocado en tubos de 1.5 ml y con hielo seco y fueron almacenados a -70 °C hasta su análisis. Para el análisis de azúcares y aminoácidos

se utilizo cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS) con parámetros ya establecidos [15] .

Análisis de COVs

La recolección de los COVs se realizo a cabo recolectando flores en estadios fenológicos por día. Estas fueron puestas en matraces de vidrio y se coloco una fibra de microextracción en fase sólida (SPME), pasado el tiempo de adsorción de los COVs, estos fueron analizados con un GC-MS [16].

Análisis de carotenoides

La determinación del contenido total de carotenoides florales se realizo colectando flores en estadios fenológicos descritos. Flores fueron congeladas y molidas con nitrógeno liquido, posteriormente fueron liofilizadas. Después de esto, a la materia seca se le adiciono una mezcla de etanol y hexano, que fue colocada en agitación por 5 min y centrifugadas por 15 min y el sobrenadante fue colectado. El extracto obtenido fue medido a 470 nm, el total de carotenoides fue calculado como µg/g en base a peso seco [17]. Para el análisis de la composición del tipo de carotenoides el extracto obtenido fue sometido a HPLC para analizar su composición [17].

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por medio del paquete estadístico SPSS. Se utilizaron pruebas post hoc y análisis de varianza (ANOVA). Para la medición de la secreción del NF por cinética y por día el nivel de muestras fueron de 300 flores respectivamente. Para azúcares, aminoácidos, COVs y carotenoides la muestra fue de 5 individuos respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secreción de néctar floral diurna arrojo que el botón (día 0) tiene una carga previa de NF similar a la secreción de néctar a las 0700 del día 1 y esta secreción se mantiene estable hasta las 1300 disminuyendo casi a la mitad a las 1500 y 1700 h del día 1, posteriormente la secreción de néctar al día 2, aumenta a partir de las 0700 y de manera similar se mantiene la secreción en las horas subsecuentes, no así al día 3, donde la secreción disminuye hasta la mitad en cada una de las horas de medición subsecuentes (Figura 1A), sin embargo, la secreción del néctar se abate

completamente en el día 4. Con respecto a la medición por día, se encontró que el botón tiene una secreción previa muy similar al día 1 y aumenta en mayor magnitud en el día 2, disminuyendo gradualmente al día 3 y la secreción del néctar decae drásticamente al día 4 (Figura 1B). Estudios previos han demostrado que la flor de *P. calyculatus* puede secretar NF hasta los 5 días [7]. Recientemente, se encontró que en flores de *P. auriculatus* la secreción diurna de NF sigue el mismo ritmo, mayor en horas tempranas y disminuye en horas tardías, además la secreción de néctar floral para esta planta tiene una secreción activa de néctar solo por 3 días consecutivos [18]. Estas diferencias pueden ser debidas al fondo genético y situaciones geográficas de cada especie.

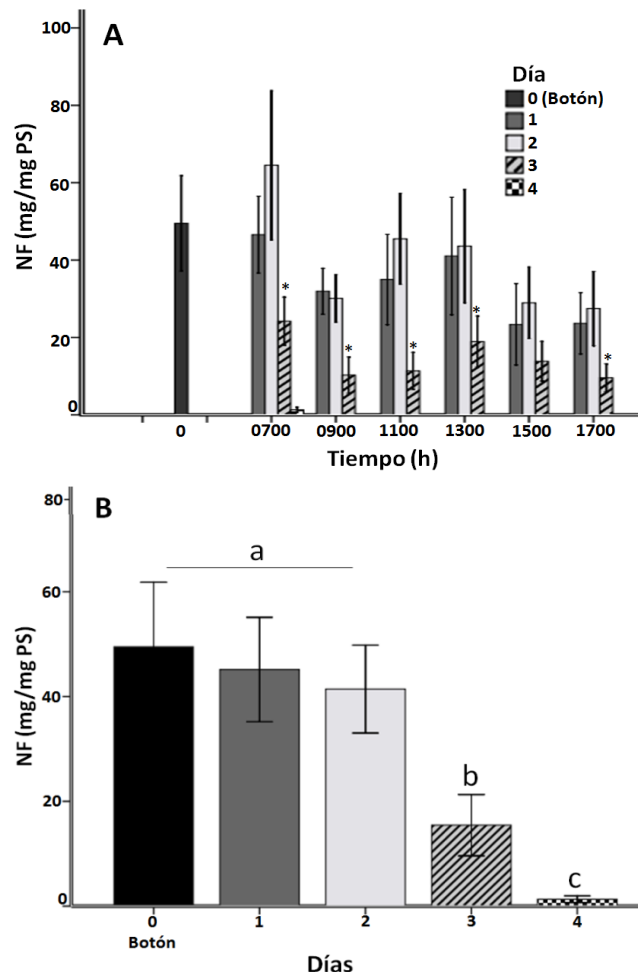


Figura 1.- Secreción de NF en estadios fenológicos de flor de muérdago. A) Cinética de secreción diurna de NF por hora; B) NF acumulado por día colectado a las 1300 h. * indican diferencias significativas entre las mediciones ($P < 0.05$). Letras indican

diferencias significativas entre los días de medición (ANOVA univariante después de las pruebas Post hoc y Tukey; $P < 0.05$).

La carga de NF cargada en el botón floral, está relacionada con una rápida actividad juvenil y marchitez de la flor, lo que significa que al estar cargado el NF un día antes de que la flor empiece su proceso de antesis, el NF esté disponible para la atracción de polinizadores especializados y que activamente puedan polinizar la flor de *P. calyculatus*. Además, una secreción activa y concentrada significa que es una estrategia de atracción temprana para los polinizadores, ya que generalmente los polinizadores se encuentran más activos por la mañana que por la tarde. Estos resultados demuestran que la secreción del néctar es más dinámica en la mañana que en la tarde y más activa en los primeros dos días de vida de la flor.

En el NF encontramos tres azúcares diferentes: Sacarosa, glucosa y fructosa. Sacarosa es el principal azúcar con mayor concentración que las otras dos hexosas en los estadios fenológicos del día 1-3, sin embargo la sacarosa disminuye en el día 3 aproximadamente a la mitad de concentración, no así las hexosas que se mantienen estables los tres días fenológicos analizados. Con respecto a los aminoácidos, estos mostraron un nivel similar en todos los estadios, sin embargo, aminoácidos altamente energéticos como alanina y prolina disminuyen en el último estadio. Concentración similar de sacarosa fue encontrada en los primeros dos días en el muérdago del desierto *Ligaria cuneifolia*, pero esta disminuye en los subsecuentes dos días, no así las hexosas que aumentaron en esos mismos días, especialmente la glucosa. Esto puede deberse a que en los estadios fenológicos más activos de síntesis de azúcares de la flor ayudan a la atracción de los polinizadores. Azúcares son de suma importancia para la atracción de polinizadores, debido a que la sacarosa es más apetitosa y atractiva que las hexosas [19]. La sacarosa tiene un importante poder calórico, que ayuda en mantener la autonomía de vuelo de los polinizadores, sin embargo los aminoácidos con alta capacidad energética como son alanina y prolina, funcionan como "chispa" energética para iniciar el vuelo de los polinizadores [20]. En conjunto ambas biomoléculas son de suma importancia para la flor de muérdago y las utiliza como una estrategia exclusiva de atracción mutualista.

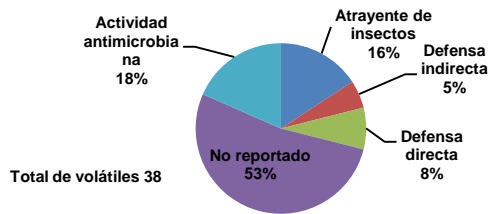


Figura 2.- Clasificación de COVs liberados por flor de muérdago.

En el análisis de COVs presentes en la flor de muérdago, se encontraron un total de 38 moléculas volátiles con diferentes funciones (Figura 2), de los cuales un 16% de estos cumplen función de atrayentes de insectos. Unos de los volátiles de más relevancia encontrados fue β -ocimeno que es atrayente de especies de avispas [21] y β -Linalool atrayente de insectos como son abejas y también avispas [22]. Compuestos con actividad microbiana y que pueden estar involucrados en mantener estéril de la carga microbiana en el NF después de que los polinizadores introducen su probóscide o lengua dentro del cáliz de la flor [23] de *P. calyculatus* fueron encontrados. Volátiles implicados en defensa indirecta involucrados en detener a insectos robadores de néctar y herbívoros fueron encontrados [24], así como volátiles relacionados a la atracción de insectos carnívoros benéficos para la flor [25].

Los carotenoides totales encontrados en la flor del muérdago fueron mayores en los estadios finales de la fenología de la flor, con menor concentración en los estadios jóvenes, identificándose dos compuestos principales que son luteína y β -caroteno. Luteína es el principal componente carotenóide no así el β -Caroteno. Se conoce que flores más claras y con bajo contenido de carotenoides atraen gran cantidad de abejas, en cambio colibríes prefieren flores con gran secreción de NF, sin importar que tan bajo o alto sea el color de la flor [26]. Colibríes son el principal polinizador de *P. calyculatus* [7] y son encontrados en gran proporción en los dos días principales de la secreción del NF [18] de *P. calyculatus*, sin embargo insectos polinizadores son encontrados en menor proporción y pueden ser más robadores de néctar que polinizadores [18]. Estos organismos encuentran una alta concentración de azúcares y aminoácidos esenciales que requieren para su nutrición y capacidad de vuelo. Sin embargo, la flor de muérdago utiliza secundariamente COVs para la atracción y deterrencia de insectos, así como

ayudan a inhibir el crecimiento microbiano dentro de la flor. Todas estas estrategias contribuyen en la evolución floral que ayudan en la biología de reproducción y diseminación de *P. calyculatus*.

CONCLUSIONES

Las características florales desarrolladas por el muérdago *P. calyculatus* están relacionadas con una estrategia de atracción de polinizadores especializados que forman un mutualismo muy estrecho y fugaz. El ciclo de vida tan corto de la flor, indica que tiene que echar mano de la producción máxima de néctar previo a la entrada de la antesis y aumentar la secreción las primeras horas en los días más activos de vida de la flor, aunado a esto, liberar compuestos secundarios que puedan minimizar la entrada de robadores de néctar para llevar a cabo estrategias exactas que ayuden en la reproducción de *P. calyculatus*.

REFERENCIAS

- [1]. Press, M. C., & Phoenix, G. K. (2005). Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist*, 166(3), 737-751.
- [2]. Kuijt, J. (1969). The biology of parasitic flowering plants. University of California Press.
- [3]. Yoder, J. I. (2001). Host-plant recognition by parasitic Scrophulariaceae. *Current opinion in plant Biology*, 4(4), 359-365.
- [4]. Westwood, J. H., Yoder, J. I., & Timko, M. P. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends in plant science*, 15(4), 227-235.
- [5]. Vázquez Collazo. Los muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán. 2006. INIFAP.
- [6]. Guerra, T. J., Galetto, L., & Silva, W. R. (2014). Nectar secretion dynamic links pollinator behavior to consequences for plant reproductive success in the ornithophilous mistletoe *Psittacanthus robustus*. *Plant Biology*, 16(5), 956-966.
- [7]. Azpeitia, F., & Lara, C. (2006). Reproductive Biology and Pollination of the Parasitic Plant *Psittacanthus Calyculatus* (loranthaceae) in Central México. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 133(3), 429-438.
- [8]. Villa, C. J. (2009). Importante contribución a la salud de los ecosistemas forestales. *CONAFOR. Programa de Sanidad forestal*, 27-28.
- [9]. Geils, B. W., & Hawksworth, F. G. (2002). Damage, effects, and importance of dwarf mistletoes. *Mistletoes of North American conifers*, 57-65.
- [10]. de Buen, L. L., Ornelas, J. F., & García-Franco, J. G. (2002). Mistletoe infection of trees located at fragmented forest edges in the

- cloud forests of Central Veracruz, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 164(1), 293-302.
- [11]. Van Ommeren, R. J., & Whitham, T. G. (2002). Changes in interactions between juniper and mistletoe mediated by shared avian frugivores: parasitism to potential mutualism. *Oecologia*, 130(2), 281-288.
- [12]. Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 375-403.
- [13]. Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N. M., Price, M. V., Watts, S., Cranmer, L., & Rotenberry, J. (2009). A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, 103(9), 1471-1480.
- [14]. Waser, N. M., Chittka, L., Price, M. V., Williams, N. M., & Ollerton, J. (1996). Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77(4), 1043-1060.
- [15]. Orona-Tamayo, D., Wielsch, N., Escalante-Pérez, M., Svatos, A., Molina-Torres, J., Muck, A., & Heil, M. (2013). Short-term proteomic dynamics reveal metabolic factory for active extrafloral nectar secretion by *Acacia cornigera* ant-plants. *The Plant Journal*, 73(4), 546-554.
- [16]. Quintana-Rodríguez, E., Morales-Vargas, A. T., Molina-Torres, J., Ádame-Alvarez, R. M., Acosta-Gallegos, J. A., & Heil, M. (2015). Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Ecology*, 103(1), 250-260.
- [17]. Li, W., & Beta, T. (2012). An evaluation of carotenoid levels and composition of glabrous canaryseed. *Food Chemistry*, 133(3), 782-786.
- [18]. Pérez-Crespo, M. J., Ornelas, J. F., Martén-Rodríguez, S., González-Rodríguez, A., & Lara, C. (2015). Reproductive biology and nectar production of the Mexican endemic *Psittacanthus auriculatus* (Loranthaceae), a hummingbird-pollinated mistletoe. *Plant Biology*.
- [19]. Heil, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16(4), 191-200.
- [20]. Carter, C., Shafir, S., Yehonatan, L., Palmer, R. G., & Thornburg, R. (2006). A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften*, 93(2), 72-79.
- [21]. Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., & Bohlmann, J. (2003). (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *The Plant Cell*, 15(5), 1227-1241.
- [22]. Parachnowitsch, A., Burdon, R. C., A. Raguso, R., & Kessler, A. (2013). Natural selection on floral volatile production in *Penstemon digitalis*: Highlighting the role of linalool. *Plant signaling & behavior*, 8(1), e22704.
- [23]. Herrera, C. M., García, I. M., & Pérez, R. (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, 89(9), 2369-2376.
- [24]. Unsicker, S. B., Kunert, G., & Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 479-485.
- [25]. Lucas-Barbosa, D., van Loon, J. J., & Dicke, M. (2011). The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. *Phytochemistry*, 72(13), 1647-1654.
- [26]. Schemske, D. W., & Bradshaw, H. D. (1999). Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkey flowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(21), 11910-11915.