

CAPÍTULO II

FILOGENIA DEL GÉNERO *TRISTERIX*

RESUMEN

El género *Tristerix* está compuesto por once especies, distribuidas a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde Colombia a Chile. Una clasificación previa, dividió a *Tristerix* en dos subgéneros, *Tristerix* (dos especies) y *Metastachys* (nueve especies). Se construyó la filogenia molecular del género utilizando una región nuclear (ITS) y dos regiones del cloroplasto (*atpB – rbcL* y *trnL-F*) con los objetivos de poner a prueba la clasificación previa del género, examinar la evolución de caracteres morfológicos y de historia de vida, y determinar el rol de los organismos con que las especies interactúan en la diversificación del grupo. Todas las regiones examinadas mostraron árboles con topología semejante. *Tristerix* estuvo compuesto por dos clados, uno norteño (seis especies) y un clado sureño (cuatro especies). Estos clados no se corresponden a la clasificación previa y están más relacionados con la distribución geográfica de las especies. Dos especies, *T. verticillatus* y *T. penduliflorus* (*Metastachys*) están más relacionadas genéticamente con los miembros del subgénero *Tristerix* que con los del subgénero en que habían sido incluidos previamente. Dos especies con amplia distribución *T. longibracteatus* y *T. corymbosus* resultaron ser parafiléticas. En el caso de *T. corymbosus*, solamente un grupo de poblaciones del matorral chileno es hermano de *T. aphyllus*, y todas éstas a su vez hermanas a las restantes poblaciones de *T. corymbosus* ubicadas dentro del bosque templado. Estas poblaciones presentaron caracteres derivados en la forma y coloración del fruto dentro del género. Entre los factores bióticos, los hospedadores podrían haber jugado un rol en la especiación del género.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Loranthaceae es considerada de origen Gondwánico y presenta su mayor grado de diferenciación en zonas subtropicales-tropicales del hemisferio sur (Barlow 1983). Debido a su número básico de cromosomas, a su distribución restringida y a su bajo número de especies, seis de los 11 géneros que se encuentran en Sudamérica han sido considerados relictuales (Barlow 1983). Estos seis géneros (*Gaiadendron*, *Desmaria*, *Ligaria*, *Notanthera*, *Tripodanthus* y *Tristerix*) se distribuyen principalmente a lo largo de la Cordillera de los Andes, mientras que los restantes se encuentran sobre todo en zonas tropicales. Las relaciones filogenéticas entre estos géneros relictuales no están del todo resueltas, pero el género hermano a *Tristerix* es *Ligaria* (Figura 1.1). *Tristerix* y *Ligaria* pueden ser distinguidos fácilmente de los otros géneros relictuales sudamericanos por la carencia de raíces epicorticales y por presentar flores tubulares grandes de color rojo. Solamente *Tristerix*, con once especies, ha experimentado una radiación evolutiva dado que los otros cuatro géneros son monoespecíficos.

El género *Tristerix*, según la revisión realizada por Kuijt (1988), está constituido por dos subgéneros: *Tristerix* (*T. aphyllus* y *T. corymbosus*) y *Metastachys* (las nueve especies restantes) (Tabla 2.1). Esta clasificación se basó principalmente en el número de pétalos y en la presencia o ausencia de bracteolas. La distribución de este género se extiende a lo largo de la Cordillera de los Andes desde el norte-centro de Colombia hasta el sur de Chile (Figura 2.1). En la zona norte, las especies se encuentran a elevaciones mayores a 2000 m s.n.m., mientras que en la zona sur ocupa áreas de elevación más baja adyacentes a los Andes (Tabla 2.1). *Tristerix* presenta su mayor diversidad en Perú, donde se encuentran siete de las 11 especies, cuatro de las cuales solo se encuentran en este país. Otras dos especies tienen también distribuciones reducidas: *Tristerix aphyllus*, endémica del centro de Chile, y *T. secundus*, presente solamente en la Cordillera occidental colombiana. Solamente tres especies tienen distribuciones amplias: *T. longibracteatus*, en el norte de Sudamérica, *T. verticillatus*, en el noroeste-centro de Argentina y Chile y, por último, *T. corymbosus*, la especie más austral dentro del género, que presenta una distribución que abarca desde Chile central hasta la Isla de Chiloé, Sur de Chile, y el noroeste de la Patagonia Argentina. Estas tres especies están en simpatría con otras especies del género a lo largo de su distribución (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Distribución geográfica y altitudinal de las especies del género *Tristerix*.

Especies de <i>Tristerix</i>	Límite N	Límite S	Rango alt. (m)
<i>T. secundus</i> (Benth.) Kuijt	5° 30' N	2° 50' N	3000-3900
<i>T. longibracteatus</i> (Desr.) Barlow & Wiens	4° 30' N	8° 25' S	2000-4900 a, b ¹
<i>T. grandiflorus</i> (Ruiz & Pav.) Barlow &	0° 10' N	7° 30' S	2400-3600 a
<i>T. pubescens</i> Kuijt	7° 45' S	11° 25' S	3200-4200 b
<i>T. peruvianus</i> (Patschovsky) Kuijt	8° 50' S	10° 20' S	1800-3400 b
<i>T. chodatianus</i> (Patschovsky) Kuijt	8° 35' S	10° 35' S	3800-5000 b
<i>T. peytonii</i> Kuijt	13° 10' S	13° 30' S	1200-4300
<i>T. penduliflorus</i> Kuijt	13° 25' S	21° 30' S	1200-4300
<i>T. verticillatus</i> (Ruiz & Pav.) Barlow & Wiens	19° 30' S	38° 15' S	50-3000 c
<i>T. aphyllus</i> (Miers ex DC.) Barlow & Wiens	27° 00' S	34° 20' S	0-1500 c
<i>T. corymbosus</i> (L.) Kuijt	30° 30' S	42° 40' S	0-2400 c

¹ La misma letra indica especies simpátricas

A lo largo de la distribución, *Tristerix* interactúa con diferentes organismos que resultan vitales para completar su ciclo de vida. Las especies de este género -como todas las plantas de hábito parásito aéreo- dependen obligatoriamente de un hospedador, del que obtienen agua y nutrientes; de polinizadores que polinicen las flores; y de dispersores que ingieran los frutos y luego defequen las semillas en las ramas donde la planta pueda establecerse. Se ha postulado que las interacciones con los hospedadores, polinizadores y/o dispersores pueden haber tenido un importante rol en la diversificación de estas plantas (Norton & Carpenter 1998, Restrepo et al. 2002). En este capítulo se examinará el rol de estos organismos en la diversificación de las especies dentro de *Tristerix*. Los resultados de la filogenia molecular de *Tristerix* proveen por primera vez evidencia sobre las relaciones filogenéticas del género, así como datos útiles para entender la dirección evolutiva de las distintas características morfológicas y de la historia de vida de este grupo de plantas. Los resultados obtenidos en este capítulo serán utilizados a lo largo de la tesis, cada vez que se quiera proveer un contexto evolutivo al tema de cada capítulo.

Los objetivos de este capítulo son:

1. Construir la filogenia del género utilizando marcadores moleculares.
2. Examinar la clasificación de subgéneros reconstruyendo la filogenia del género usando marcadores moleculares.
3. Examinar la evolución de caracteres morfológicos y de la historia de vida a partir de la filogenia molecular del género.

Adicionalmente, en base a las relaciones filogenética entre las especies del géneros y la evolución de algunos caracteres morfológicos, se explorará el rol factores bióticos (hospedadores, polinizadores y dispersores de semillas) en la diversificación del grupo. Por otro lado se pondrá a la especie bajo estudio en un contexto evolutivo, dentro del género.

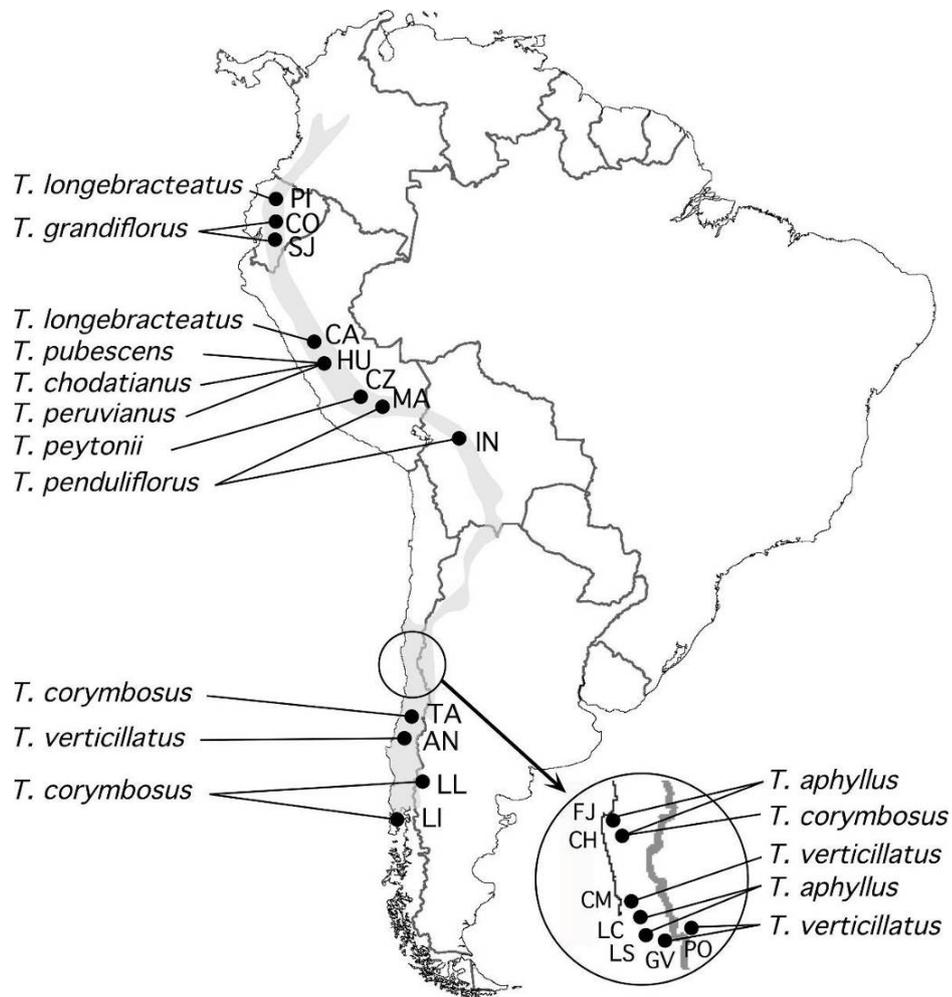


Figura 2.1. Distribución del género *Tristerix* (área en gris) y localidades de procedencia de los ejemplares de las diferentes especies utilizadas (puntos negros).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo de taxones y amplificación de ADN

La filogenia del género *Tristerix* se realizó con diez de las 11 especies que componen el género (Figura 2.1, Lámina 2.1, Apéndice 2.1). A pesar de haberse intentado extraer ADN de varios ejemplares de herbario de la especie endémica de la Cordillera occidental de Colombia *T. secundus*, no se pudo amplificar el ADN de ningún individuo de esta especie.



Lámina 2.1. Fotografías de las especies del género *Tristerix* y de otras especies de lorantáceas sudamericanas. Fotografías de R Vidal Rusell (RVR), J Kuijt (JK) y Guillermo C Amico (GCA).

El material vegetal utilizado para extraer el ADN genómico procedió de ejemplares recolectados en el campo de las especies *T. aphyllus*, *T. corymbosus* y *T. verticillatus*. Para las restantes especies, el ADN fue extraído de ejemplares del herbario Saint Louis, EEUU. Para siete especies fue amplificado más de un individuo de diferentes localidades. Dos especies de lorantáceas de Sudamérica fueron muestreadas para ser utilizadas como grupo externo en los análisis filogenéticos. Las especies seleccionadas fueron *Ligaria cuneifolia* (Ruiz & Pav.) Tiegh. y *Notanthera heterophylla* (Ruiz & Pav.) G. Don. Estas especies son especies cercanas a *Tristerix*, siendo *Ligaria* la especie hermana (Figura 1.1).

El ADN genómico se extrajo del material vegetal seco, según el protocolo de extracción C-TAB modificado para plantas con alto contenido de carbohidratos (Tel-Zur et al. 1999). En el Apéndice 2.2 se detalla el protocolo de extracción utilizado. Tres regiones fueron amplificadas para construir la filogenia del género *Tristerix*: una región nuclear ITS (del inglés, internal transcribed spacer, y 5.8S ADN ribosomal) y dos regiones no codificantes del cloroplasto. Una región del cloroplasto estaba comprendida entre los genes *atpB* y *rbcL* y la otra región entre los exones (tRNA) *trnL* y *trnF*, incluyendo el intrón *trnL*. En el Apéndice 2.2 se detalla la metodología utilizada para la amplificación, purificación y secuenciación de cada región. Para los dos ejemplares de *T. grandiflorus* no se pudo amplificar la región entre los genes *atpB* y *rbcL*, mientras que para una muestra de *T. aphyllus* y *T. penduliflorus* no se pudo obtener la región ITS. Todas las secuencias generadas en el trabajo fueron depositadas en NCBI Genbank con los siguientes números de acceso: DQ442916 a DQ442986.

2.2 Análisis filogenéticos

Las secuencias individuales fueron alineadas manualmente utilizando el programa BioEdit (Hall 1999). Las dos regiones del cloroplasto presentaron inserciones o deleciones (indel) en el alineamiento que aportaban valiosa información filogenética. Estas inserciones-deleciones fueron codificadas como presencia o ausencia para cada individuo, y se consideraron homólogas solamente cuando el número de bases y las regiones limitantes eran iguales. En las regiones *atpB-rbcL* y región *trnL-trnF* fueron codificadas un total de 27 y 11 inserciones-deleciones, respectivamente. Para la región de ITS las inserciones-deleciones no presentaron información filogenética y fueron tratadas como datos faltantes.

Tres tipos de análisis con diferentes criterios, máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) (del inglés “maximum likelihood”) e inferencia Bayesiana (IB), fueron llevados a cabo para cada una de las particiones (cloroplasto y nuclear) y para las dos regiones juntas (análisis global). Las dos regiones del cloroplasto *atpB-rbcL* y *trnL-trnF* fueron

analizadas en forma independiente usando MP y, como mostraron la misma topología, fueron analizadas en forma conjunta.

El sistema de búsqueda utilizado en el análisis de MP, para cada una de las regiones y en el análisis global, fue “branch and bound search”. Los valores de soporte para los nodos fueron determinados usando “non-parametric bootstrap” (BS) (Felsenstein 1985) con 1000 pseudo-repeticiones. El tipo de búsqueda utilizado en el análisis para obtener los valores de soporte fue heurística con intercambio de ramas del tipo “tree bisection and reconnection” En los análisis de MP las inserciones-delecciones fueron incorporadas como una substitución, la presencia codificada como T (Timina) y la ausencia como A (Adenina).

En los análisis de MV y IB, los modelos de evolución molecular para cada una de las regiones y para el análisis global fueron determinados usando MrModeltest (Nylander et al. 2004). El modelo seleccionado bajo el criterio de Akaike fue HKY85+ Γ (Hasegawa-Kishino-Yano 85 mas gama; Hasegawa et al. 1985) para la región de ITS; mientras que para la regiones del cloroplasto el modelo fue GTR+ Γ (General Time Reversible model, Tavaré 1986). En el análisis global se utilizó el modelo GTR+ Γ .

Los análisis de MV se llevaron a cabo sin la base de datos de las inserciones-delecciones codificadas. Los valores de soporte se obtuvieron usando BS con 100 pseudo-repeticiones. Los análisis MP y MV se llevaron a cado con la utilización del programa PAUP* (Swofford 2002). Los análisis de IB fueron realizados usando MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001, Ronquist & Huelsenbeck 2003). Cada análisis consistió de dos análisis independientes con cinco millones de generaciones y cuatro cadenas cada uno. Los árboles y parámetros obtenidos fueron guardados cada 100 generaciones, produciendo 50.000 árboles. Las probabilidades *a priori* para los parámetros fueron designadas a través de una distribución uniforme, excepto para las frecuencias de bases donde la distribución seleccionada fue Dirichlet. En los casos en que se consideró más de una partición en un mismo análisis, la estimación de parámetros fue independiente entre las distintas particiones. El “burn-in” fue determinado por la estacionalidad en los valores de $-\ln$ likelihood y por una varianza reducida (<0.01) entre los dos análisis independientes. Esto último asegura que el muestreo esté dentro de la distribución *a posteriori*. En este análisis los indel fueron tratados como presencia y ausencia, incorporándolos a la matriz de datos como sitios de restricción. En todos los análisis se seleccionó como grupo externo únicamente a *Notanthera heterophylla*, dejando a *Ligaria* como parte del grupo interno.

2.3 Caracteres morfológicos y de historia de vida

Doce caracteres morfológicos obtenidos de la observación directa en campo, la monografía del género (Kuijt 1988) y de ejemplares de herbario fueron optimizados usando MacClade bajo la opción ACCTRAN (Maddison & Maddison 2000) para determinar el estado ancestral. Los caracteres se optimizaron sobre el árbol de mayor verisimilitud obtenido en el análisis global Bayesiano. El árbol fue simplificado a un ejemplar por especie, salvo que la especie fuera polimórfica para algún carácter. En el Apéndice 2.3 se indica el estado de cada carácter para las diferentes especies.

3. RESULTADOS

La alineación de la región de ITS constó de 695 posiciones. Incluyendo el grupo externo, esta región tuvo 178 sitios variables informativos, de los cuales 74 fueron parsimoniosamente informativos y 44 de los 122 sitios variables fueron parsimoniosamente informativos solamente en *Tristerix* (grupo interno). El análisis de MP resultó en ocho árboles igualmente parsimoniosos con 269 pasos o cambios. En varios sitios del electrofenograma, se observaron dos picos para los ejemplares de *Tristerix aphyllus* y *T. corymbosus*. En total se encontraron 16 sitios polimórficos y éstos fueron codificados como ambigüedades. Cinco de estos sitios fueron polimórficos en todos los individuos de *T. aphyllus* y *T. corymbosus*. En cuanto al grupo externo, la región *atpB-rbcL* presentó 899 posiciones con 155 sitios variables, 70 de los cuales fueron parsimoniosamente informativos. Considerando solamente el grupo interno, el número de sitios variables fue de 93, de los cuales 46 fueron parsimoniosamente informativos. La región *trnL-F* presentó 720 posiciones con 133 sitios variables, 65 de los cuales fueron parsimoniosamente informativos. En cambio, el grupo interno tuvo 83 sitios variables, 45 de los cuales fueron parsimoniosamente informativos.

Para esta región del cloroplasto, se obtuvieron ocho árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 383 pasos. La región nuclear ITS, en general, mostró una topología similar a la región del cloroplasto, pero con una menor resolución (Figura 2.2). Debido a que las dos regiones, nuclear y del cloroplasto, mostraron una topología similar, los datos fueron combinados generándose un árbol con estas dos regiones para el análisis global (Figura 2.3). El análisis de MP resultó en tres árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 678 pasos.

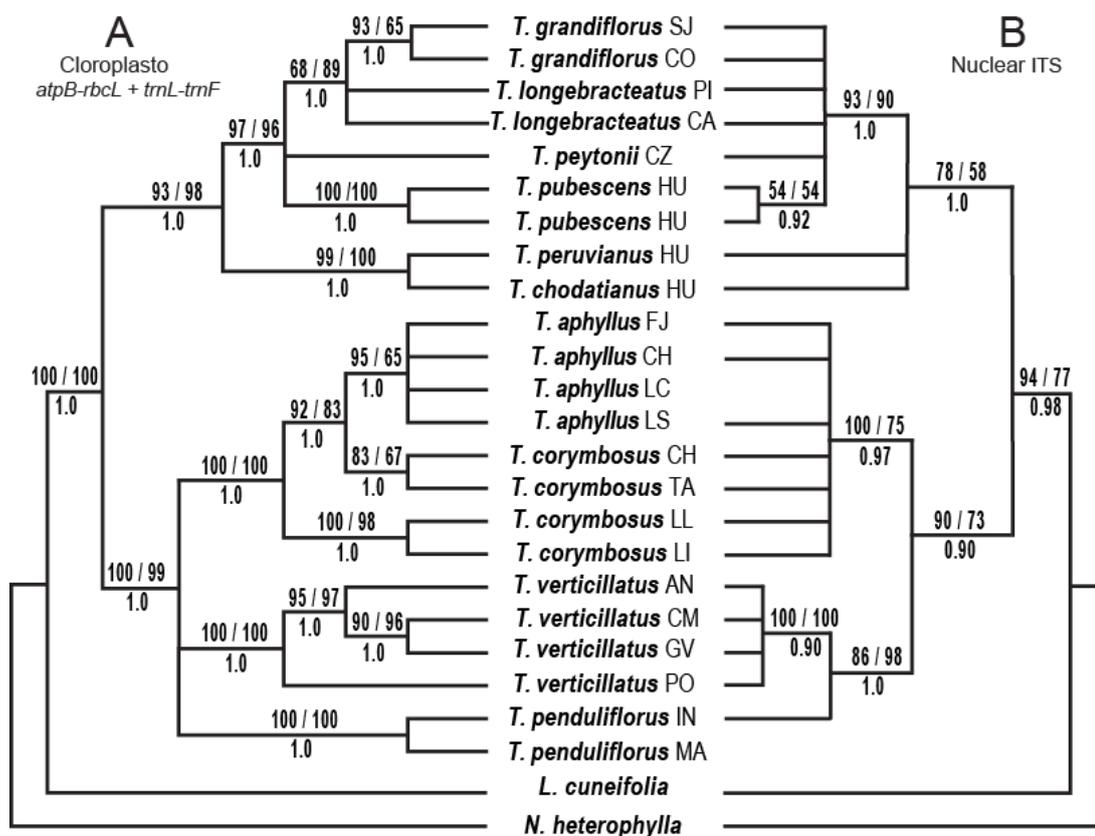


Figura 2.2. Comparación de la topología de los análisis de MP, ML y BI obtenidos para las regiones del cloroplasto (*atpB-rbcL* y *trnL-F*) y nuclear (ITS). Los números sobre las líneas corresponden a los valores de soporte de MP (1000 pseudo-repeticiones) y MV (100 pseudo-repeticiones). Debajo de la línea se indican los valores de probabilidad de IB. A) Árbol de consenso estricto de los 18 árboles igualmente parsimoniosos encontrados para la región del cloroplasto (*atpB-rbcL* y *trnL-trnF*). B) Árbol de consenso estricto de los ocho árboles igualmente parsimoniosos encontrados para la región nuclear (ITS).

Ambas regiones, nuclear y cloroplástica, demuestran que el género *Tristerix* está compuesto por dos clados. El primero, “Sur”, que está formado por cuatro especies: *T. aphyllus*, *T. corymbosus*, *T. verticillatus* y *T. penduliflorus*. El segundo clado, “Norte”, está compuesto por las seis especies restantes, *T. chodatianus*, *T. peruvianus*, *T. pubescens*, *T. grandiflorus*, *T. longibracteatus* y *T. peytonii*. Dentro del Clado Norte, dos especies endémicas de la Cordillera Blanca en Perú -*T. chodatianus* y *T. peruvianus*- forman un clado que es hermano del resto de las especies. Las relaciones entre las restantes especies, *T. pubescens*, *T. grandiflorus*, *T. longibracteatus* y *T. peytonii*, no están del todo resuelta. Mientras que la región del cloroplasto muestra a *T. longibracteatus* y *T. grandiflorus* como especies hermanas, la región nuclear no soporta esta relación.

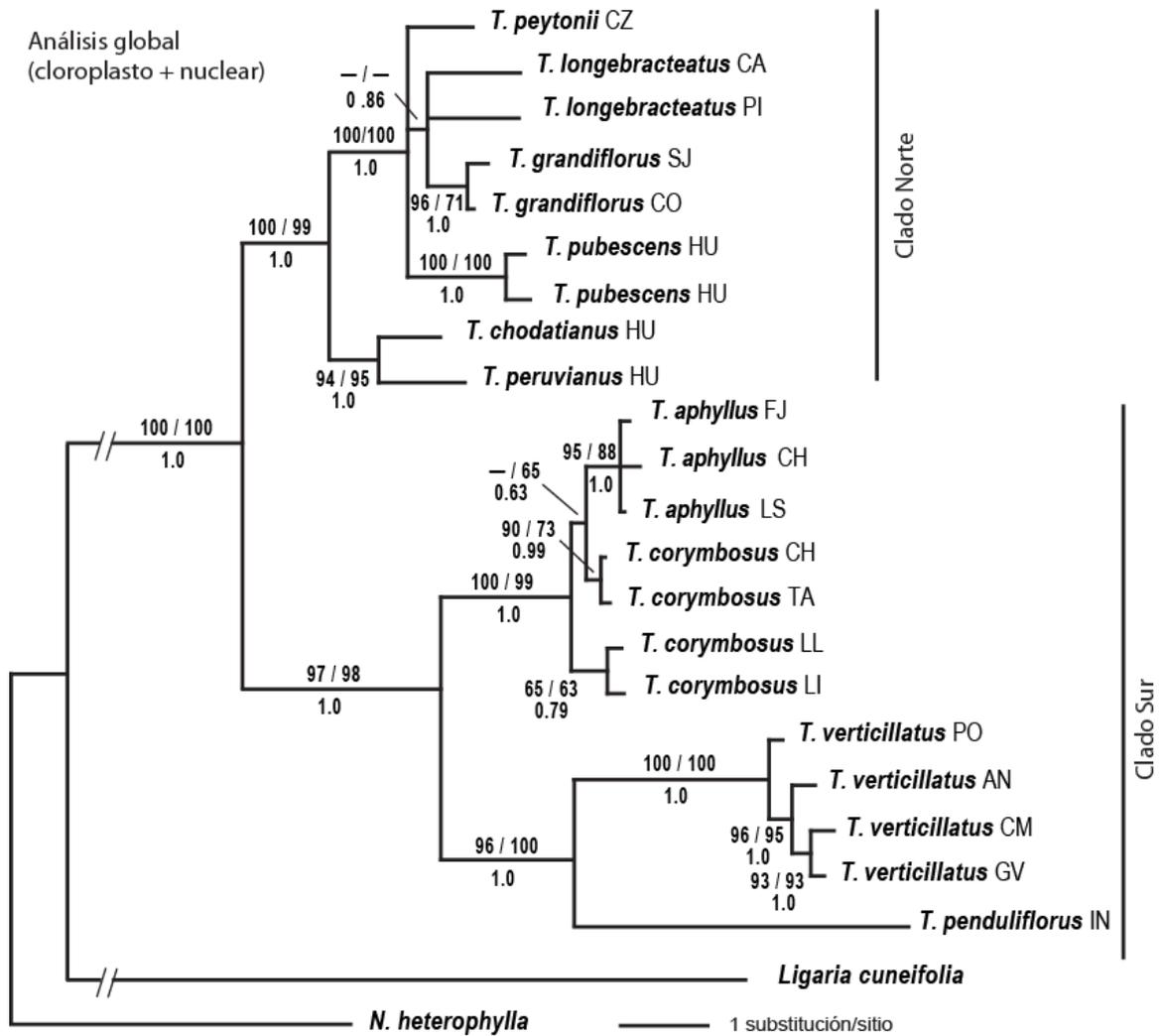


Figura 2.3. Filograma obtenido del análisis bayesiano con los datos globales (nuclear más cloroplasto). Los números sobre las líneas corresponden a los valores de soporte de MP (1000 pseudo-repeticiones) y MV (100 pseudo-repeticiones) y aquellos debajo de las líneas a valores de probabilidad de IB.

Así como el Clado Norte, el Clado Sur también está compuesto por dos clados con dos especies cada uno: *T. aphyllus* más *T. corymbosus*, y *T. verticillatus* más *T. penduliflorus*. La relación entre las últimas dos especies se observa solamente en la región nuclear (Figura 2.2). Las dos regiones, cloroplasto y nuclear, soportan la monofilia de las especies *T. verticillatus* y *T. penduliflorus*. Para *T. corymbosus*, la región del cloroplasto muestra a los individuos de las dos localidades del sur (LL y LI, Apéndice 2.1) como hermanas a las del norte (TA, CH, Apéndice 2.1) y éstas, a su vez, hermanas a los cuatro individuos muestreadas de *T. aphyllus*. La parafilia de *T. corymbosus* es solamente soportada en la región del cloroplasto (Figura 2.2) y en el análisis global (Figura 2.3). La región nuclear no resuelve la relación entre *T. aphyllus* y *T. corymbosus*, a pesar que esta región apoya el clado compuesto por estas dos especies.

La optimización de los caracteres morfológicos y de hábitat del género se indica en el Apéndice 2.4 y se resumen en la Figura 2.4. Solamente un carácter, sistema epicortical, apoya la monofilia del género. La coloración bandeada de los pimpollos caracteriza al del clado norteño (Figura 2.4). Cuatro de las seis especies del clado Norte, presentan flores con bráctea foliosa, siendo ésta una sinapomorfía para este clado. En el caso de *T. corymbosus*, que presenta un polimorfismo para la coloración y forma, la reconstrucción del estado ancestral para estos dos caracteres fue: color amarillo y de forma esférica.

4. DISCUSIÓN

4.1 Clasificación

Los resultados de este estudio distinguen claramente dos importantes clados dentro de *Tristerix*: uno integrado por seis especies con distribución norteña (Colombia, Ecuador y Perú) y otro con cuatro especies de regiones más meridionales en Sudamérica (Perú, Bolivia, Chile y Argentina). La diferenciación de estos dos clados es bien soportada por todos los métodos de análisis por la región nuclear y del cloroplasto. Estos clados no se corresponden con la clasificación de subgéneros previamente propuesta por Kuijt (1988) y parecen estar más correlacionados con la distribución geográfica (Figura 2.1, Tabla 2.1). Los análisis filogenéticos moleculares apoyan fuertemente la transferencia de dos especies, *T. verticillatus* y *T. penduliflorus* del subgénero *Metastachys* al subgénero *Tristerix*. Dadas su morfología y distribución geográfica, podemos asumir que *T. secundus* (no muestreado en este estudio) es un miembro de *Metastachys*.

4.2 Especies parafiléticas

Este trabajo no se propone cambiar circunscripciones actuales para ninguna de las especies de *Tristerix*, aunque algunos conceptos de especies conducirían a hacerlo (Coyne & Orr 2004). En dos de las siete especies, en las cuales se incluyó más de un ejemplar, se encontró ausencia de monofilia para la región del cloroplasto. La monofilia de *T. longibracteatus* se ve comprometida por falta de soporte en cualquiera de los análisis realizados. A pesar de que *T. longibracteatus* está cercanamente relacionada con *T. grandiflorus*, los ejemplares de esta primera especie no forman un clado monofilético. Es probable que esto se deba a la falta de secuencia para los ejemplares de *T. grandiflorus* de la región *atpB-rbcL*; marcador que mostró mayor variabilidad en el género. Este trabajo no muestra suficiente evidencia para poner en duda el estado de especie de *T. longibracteatus*,

pero sí es un llamado a investigar más en detalle las relaciones entre las dos especies de este clado.

Tristerix corymbosus, como se observa en la Figura 2.3 (ver también Capítulo III), es efectivamente una especie parafilética. *Tristerix aphyllus* se habría originado de un grupo de poblaciones de *T. corymbosus*, representando una “apoespecie”, mientras que *T. corymbosus* representaría una “metaespecie” (Donahue 1985, De Queiroz & Donahue 1988). Esta parafilia no se observa en el región nuclear (Figura 2.2), pero este resultado es esperable dado que, en individuos diploides, el tiempo de coalescencia ocurre cuatro veces más rápido en los genes de herencia materna (cloroplasto en plantas) que en los genes nucleares de herencia biparental (Hudson & Kaplan 1988). Los polimorfismos encontrados en la región nuclear de ITS entre estas dos especies también pueden sugerir un escenario de hibridación. Aunque *Tristerix aphyllus* y *T. corymbosus* muestran pocas diferencias genéticas, *T. aphyllus* presenta varias autopomorfías morfológicas como la ausencia de hojas, cotiledones fusionados en un tubo de color rojo, frutos blancos, pedúnculos rojos, crecimiento endofítico extenso y flores erguidas (Mauseth et al 1984, Mauseth 1990, Mauseth et al 1984, Kuijt 1988). Por estas razones, estas dos especies deben mantenerse como diferentes.

4.3 Evolución de caracteres morfológicos

La presencia de un sistema endofítico (carácter 1), parece ser la única sinapomorfía para *Tristerix*. Los dos géneros utilizados como grupo externo presentan infecciones localizadas, mientras que *Tristerix* desarrolla un sistema radicular dentro del cortex del hospedador. Esta característica ha sido observada para todas las especies del Clado Sur, mientras que para el Clado Norte solamente ha sido reportada en *T. longibracteatus*. La ocurrencia de este estado en el árbol taxonómico expuesto en la Figura 2.4, da lugar a la reconstrucción más parsimoniosa donde este carácter está presente en todos los miembros del Clado Norte, pero otras observaciones de campo son necesarias para confirmar esta hipótesis.

La coloración del pimpollo (carácter 10) proporciona la única característica morfológica que diferencia, y solo parcialmente, a los taxa de los Clados Norte y Sur. Las especies del Clado Sur tienen flores de color rojo, mientras que las especies del Clado Norte presentan flores de coloración rojo-amarillo-rojo. La excepción para el Clado Sur es *T. penduliflorus* cuyas las flores son predominante de color rojo y amarillas en la región apical, pero con un patrón distinto al de los taxa del Clado Norte. *Tristerix peruvianus* presenta flores solamente de color rojo, por lo que representa la excepción para el Clado Norte. El estado de este carácter en esta especie podría deberse a la pérdida de la banda amarilla central.

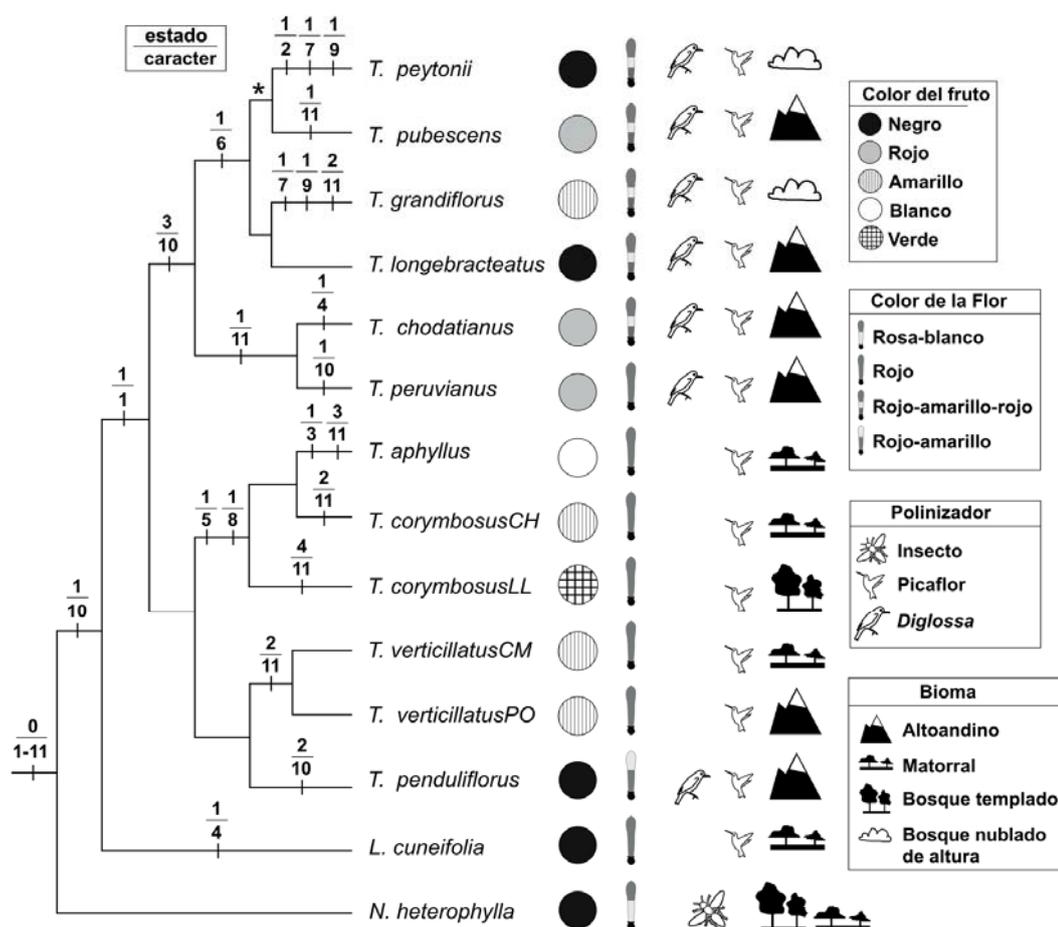


Figura 2.4. Distribución de caracteres morfológicos y forma de hábitat en el árbol filogenético. Se incluye información sobre el color del fruto, color de la flor, polinizadores y bioma. La estrella representa la ausencia de soporte para el clado. 1) Sistema epicortical (0: infección localizada; 1: raíces epicorticales). 2) Sección del tallo cuadrangular (0: no; 1: si). 3) Hojas (0: desarrolladas, 1: reducidas). 4) Hojas con punta esclerótica (0: ausente, 1: presente). 5) Bracteolas (0: ausente; 1: presente). 6) Bractea foliosa (0: ausente; 1: presente). 7) Pimpollos > 8 cm (0: no, 1: si). 8) Número de pétalos (0: cinco o seis; 1: cuatro). 9) Flor curva (0: no; 1: si). 10) Coloración del pimpollo (0 = rosa; 1 = rojo; 2 = rojo-amarillo-rojo; 3 = rojo-amarillo). 11) Coloración del fruto (0: negro; 1: rojo; 2: amarillo; 3: blanco; 4: verde). 12) Forma del fruto (0=esférico; 1=ovoide).

Como se mencionó anteriormente, el Clado Norte es apoyado por la presencia de flores de color rojo-amarillo-rojo (carácter 10). *Tristerix peruvianus* fue descrito por Kuijt (1988) como la única especie que presenta pimpollos fenestrados (pimpollos donde la separación de los pétalos ocurre en la mitad del tubo de la corola). Es posible que este carácter represente una sinapomorfía adicional para el Clado Norte, dado que esta característica también ha sido observada en otras tres especies: *T. pubescens*, *T. longibracteatus* y *T. chodatianus* (observación personal).

Los datos moleculares sustentan fuertemente el clado integrado por *Tristerix longibracteatus*, *T. grandiflorus*, *T. peytonii* y *T. pubescens*. Este grupo es apoyado por la sinapomorfia de la presencia de una bráctea foliácea debajo de cada flor (carácter 6). Estas cuatro especies se diferencian morfológicamente principalmente por el color del fruto y por el tamaño y forma de la flor (Figura 2.4). Dos especies, *T. grandiflorus* y *T. peytonii*, presentan flores largas y curvas (carácter 7 y 9), aunque la homología de estos caracteres no pudo ser determinada. Resolviendo la politomía del clado en las tres formas posibles, dos favorecen el paralelismo, mientras que en la tercera es igualmente parsimonioso invocar paralelismo u homología. Por otra parte, cuando la optimización es realizada sobre la topología más probable del análisis global, la evolución paralela para estos caracteres es la más parsimoniosa (Figura 2.4). Las flores largas que presentan estas dos especies, *T. grandiflorus* y *T. peytonii*, se podrían haber originado por un cambio de hábitat, bosque nublado de altura y/o por la interacción con los polinizadores (ver abajo).

Los datos moleculares muestran a *T. chodatianus* y *T. peruvianus* como especies hermanas que a su vez, son hermanas del resto de los taxa del Clado Norte. Estas dos especies presentan frutos de color rojo y un cálculo prominente, característica que se observa solamente en ejemplares secos (herbario). Kuijt (1988) indicó que *T. peruvianus* es similar a *T. secundus* (no muestreado en este estudio), pero éstas difieren en la forma y coloración de las hojas y de los frutos. *Tristerix chodatianus* comparte con estas dos especies la característica de inflorescencia con flores decusadas, pero otras dos especies, *T. peytonii* y *T. penduliflorus* también presentan esta característica. Cabe señalar que esto no representaría un carácter diagnóstico para este clado. Dentro del género, *Tristerix chodatianus* es la única especie que presenta hojas con una punta esclerótica (carácter 4). Curiosamente, *Ligaria cuneifolia* también posee esta característica, pero de carácter polimórfico dentro de la especie, ya que en algunos individuos es prominente y en otros es inconspicuo.

A pesar del gran soporte obtenido a partir de los datos moleculares para el Clado Sur, no se ha identificado ninguna característica morfológica única para este grupo (Figura 2.4). Según la estructura de la inflorescencia (flores decusadas), los polinizadores, la bicoloración de las flores y la distribución geográfica, *T. penduliflorus* se tendría que ubicar con los taxa del Clado Norte más que con los taxa del sur, pero los análisis moleculares muestran a esta especie como hermana de *T. verticillatus*. La relación entre *T. aphyllus* y *T. corymbosus* es apoyada por dos caracteres morfológicos que las distinguen del resto de la especies: la presencia de bracteolas florales (carácter 5) y flores con cuatro pétalos (carácter 8). Estas dos

características son las que llevaron a Kuijt (1988) a separar estas dos especies en el subgénero *Tristerix*, representando los caracteres florales más derivados dentro del grupo.

Las poblaciones de *T. corymbosus* localizadas dentro del bosque templado presentan un estado de carácter derivado en la coloración (carácter 11) y forma del fruto (carácter 12). La forma del fruto para la mayoría de las especies del género, así como también para el grupo externo, es esférica; mientras que las poblaciones del bosque templado presentan frutos de forma ovoide. La reconstrucción en el color para el ancestro de esta especie fue amarillo; siendo el color verde un estado derivado solo presente en las poblaciones del bosque templado. Estos cambios de color y forma en los frutos de *T. corymbosus* puede estar relacionados con los dispersores de semillas y/o a condiciones ambientales que determinan que los frutos alcancen la madurez dentro del bosque templado sin cambiar de color a lo largo de su desarrollo. Estas dos hipótesis van a ser discutidas en los Capítulos V y VI, donde se relacionan las características de los frutos con los dispersores de semillas, variables ambientales y historia evolutiva.

4.4 Hospedadores

La mayoría de las especies de *Tristerix* parasitan a una gran diversidad de especies de planta. Solamente dos son especialistas: *Tristerix aphyllus*, que sólo parasita a cactus de los géneros *Echinopsis* y *Eulychnia* (Mauseth et al. 1984, Kuijt 1988, Medel et al. 2002), y *T. chodatianus* del Perú, que parasita a plantas del género *Polylepis* (Rosaceae) (observación personal). La especiación de estas dos especies podría haber ocurrido por un cambio de hospedador, suponiendo que el ancestro fue generalista en cuanto a su uso de distintas especies. Esto es ejemplificado por *T. aphyllus* que se diferenció de un grupo de poblaciones de su especie hermana, *T. corymbosus*, el cual podría haber ocurrido en simpatria (Amico et al. 2007). Otras dos especies, *T. verticillatus* y *T. penduliflorus*, aunque con relación no es obligatoria con sus hospedadores, estas se encuentran con mayor frecuencia parasitando especies del género *Schinus* (Anacardiaceae) (Troncoso & Amico, en elaboración). Otras especies del género con una amplia distribución, como *T. logenbracteatus* y *T. corymbosus*, parasitan a un gran número de especies, sin presentar una relación preferente con algún grupo en particular de plantas.

4.5 Polinizadores y dispersores de semillas en *Tristerix*.

Entre los géneros de muérdagos considerados relictuales de Sudamérica, solamente *Tristerix* y *Ligaria* presentan flores tubulares grandes de color rojo que son polinizadas por

aves (Kuijt 1988, Rivera et al. 1996, Medel et al. 2002, Aizen 2003). Los otros géneros - *Notanthera*, *Desmaria* y *Gaiadendron* - tienen flores más pequeñas de color claro (rosa, anaranjado y amarillo, respectivamente) y son polinizadas principalmente por insectos (Kuijt 1963, 1985, observación personal). Aunque todos estos géneros tienen distribuciones geográficas similares y se superponen geográficamente, *Tristerix* y *Ligaria* florecen durante el otoño-invierno y los otros géneros en verano. La evolución de la floración en la estación este periodo de tiempo (otoño-invierno), puede estar relacionada con la capacidad de las aves para la termorregulación (estar activas a bajas temperaturas) y así actuar como polinizadores durante el invierno.

Los picaflores presentan una mayor diversificación en los Andes tropicales y varias especies ocurren a lo largo de la distribución de *Tristerix* (Fjeldsa & Krabbe 1990, Altshuler et al. 2004). En la parte sur de la distribución de *Tristerix* -donde las flores son rojas - las especies son polinizadas por picaflores (*Sephanoides sephanioides*, *Patagonas gigas*, *Oreotrochilus leucopleurus*). Hasta la fecha no hay información publicada sobre la polinización por picaflores en *Tristerix* de los Andes Tropicales. En dos localidades de Perú (Parque Nacional Huascarán y Cuzco) observé durante el mes de junio del 2005 al picaflor *Colibri coruscans* visitar las flores de *T. pubescens* y *T. penduliflorus*. En el sur de Perú, observé que las flores de *T. penduliflorus* también fueron visitadas por otra especie de picaflor, *Lesbia nuna*. Estas especies además fueron visitadas por *Diglossa brunneiventris*, especie de paseriforme que también ha sido documentada como el polinizador de *T. longibracteatus* en el norte de Perú (Graves 1982). El género *Diglossa* tiene 16 especies asociadas a los Andes Tropicales y su distribución geográfica es coincidente con la de *Tristerix* (Fjeldsa & Krabbe 1990). Estos paseriformes, generalmente han sido considerados como robadores de néctar, pero también pueden actuar como auténticos polinizadores en varias especies de plantas, incluyendo *Tristerix* (Graves 1982, Maloof & Inouye 2000). Ocho de las 11 especies de *Tristerix* se superponen con la distribución de *Diglossa* y todas estas especies tienen flores de dos colores (rojo-amarillo). Esto llevaría a sugerir que esta característica de flores bicolor es está actuando como guía floral, que es reconocida por *Diglossa*, pudiendo haberse originado por la interacción con este grupo de aves.

Dos especies de *Tristerix* que se encuentran en el bosque nublado de altura de Perú y Ecuador, *Tristerix peytonii* y *T. grandiflorus* (Figura 2.4, Tabla 2.1), presentan las flores más largas dentro del género. Las flores de *T. grandiflorus* pueden alcanzar hasta 16 centímetros de longitud. Kuijt (1988) sugirió que la longitud de la flor en *T. grandiflorus* es producto de la interacción con el picaflor *Ensifera ensifera*. Esta especie de picaflor se encuentra en el

bosque nublado de altura y tiene un pico de 10 cm de longitud, siendo la única especie que podría polinizar las flores largas de esta especie y posiblemente también para *T. peytonii*.

Los pocos estudios que se han realizado sobre la dispersión de las semillas en *Tristerix*, han reportado como auténticos dispersores tanto a aves como a mamíferos (Parker 1980, Hoffmann et al. 1986, Amico & Aizen 2000, Medel et al. 2004). Las semillas de dos especies del centro de Perú, *Tristerix chodatianus* y *T. peruvianus*, son dispersadas por una especie de Contingidae, *Zartornis stresemanni* (Parker 1980) mientras que las de *T. aphyllus*, *T. corymbosus* y *T. verticillatus* lo son por especies de los géneros *Mimus* (Mimidae), *Elaenia* (Tyrannidae) y *Turdus* sp. (Turdidae). Dentro del bosque templado, las semillas de *T. corymbosus* son dispersadas por el marsupial *Dromiciops gliroides* (Microbiotheriidae). Esta especie representa un viejo linaje entre los marsupiales y es de origen de Gondwánico (Amico & Aizen 2000). No hay información sobre la dispersión de las semillas de las otras seis especies de *Tristerix*; pero, de acuerdo a sus distribuciones, las familias de passeriformes Contingidae, Tyrannidae y Turdidae son los candidatos más probables. Las familias Contingidae y Tyrannidae (Suboscines), de origen Gondwánico, representan los linajes más antiguos de passeriformes en Sudamérica y están presentes desde hace más de 40 millones de años; mientras que Turdidae y Mimidae (Oscines), de origen Laurásico, aparecieron en el continente sudamericano mucho más recientemente (2 a 5 millones de años) (Ericson et al. 2003, Barker et al. 2004 y las referencias en estos). Por lo tanto, se puede sugerir que los dispersores basales en *Tristerix* serían no solamente Microbiotheriidae, como se había postulado anteriormente (Amico & Aizen 2000), sino también representantes de Contingidae, Tyrannidae, y más recientemente por Turdidae y Mimidae. La interacción con estas dos últimas familias podría haber tenido un importante rol en la diversificación de *Tristerix*, particularmente para *T. aphyllus*.

Conclusión

El género *Tristerix* está constituido por dos clados, uno de distribución norte y otro sur. Estos dos clados, con alto soporte en los análisis moleculares, poseen pocas características morfológicas que los diferencien. Para dos especies dentro del grupo, el cambio de hospedador podría ser la explicación más parsimoniosa de especiación. El rol de los polinizadores y dispersores de semillas en la diversificación de las especies no es del todo claro. Si bien se podría postular una convergencia evolutiva para las especies de flores largas con la interacción con el picaflor de pico largo, o los pimpollos con patrones de color amarillo con la polinización por *Diglossa*, no han sido encontradas en este estudio evidencias para

esto. Estas características florales pueden estar asociadas a un cambio de hábitat asociado con un grupo particular de polinizadores únicos que están presentes en ese hábitat. En cuanto a la dispersión de semillas, el género *Tristerix*, así como los otros géneros relictuales sudamericanos de Loranthaceae, han estado interactuando desde su origen con aves del subgénero Suboscines también de origen Gondwánico. La llegada de aves del subgénero Oscines de origen Laurásico, durante el Plioceno podría haber contribuido a la especiación de algunas especies dentro de *Tristerix*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizen MA. 2003. Influences of animal pollination and seed dispersal on winter flowering in a temperate mistletoe. *Ecology* 84:2613-2627.
- Altshuler DL, R Dudley & JA McGuire. 2004. Resolution of a paradox: hummingbird flight at high elevation does not come without a cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:17731-17736.
- Amico G C & MA Aizen. 2000. Mistletoe seed dispersal by a marsupial. *Nature* 408:929-930.
- Amico GC, R Vidal-Russell & D Nickrent. 2007. Phylogenetic relationships and ecological speciation in the mistletoe *Tristerix* (Loranthaceae): the influence of pollinators, dispersers, and hosts. *American Journal of Botany* 95:558-567.
- Barker FK, A Cibois, P Schikler, J Feinstein & J Cracraft. 2004. Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11040-11045.
- Barlow BA. 1983. Biogeography of Loranthaceae and Viscaceae. En: Calder DM & P Bernhardt, editores. *The Biology of Mistletoes*, pp 19-45. Academic Press, New York.
- Coyne JA & HA Orr. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA.
- De Queiroz K & MJ Donahue. 1988. Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics* 4:317-338.
- Donahue MJ. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist* 88:172-181.
- Ericson PGP, M Irestedt & US Johansson. 2003. Evolution, biogeography, and patterns of diversification in passerine birds. *Journal of Avian Biology* 34:3-15.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fjeldsa J & N Krabbe. 1990. *Birds of the high Andes*. Apollo Books, Svendborg, Dinamarca.
- Graves GR. 1982. Pollination of a *Tristerix* mistletoe (Loranthaceae) by *Diglossa* (Aves, Thraupidae). *Biotropica* 14:316-317.

- Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. ser.* 41:95-98.
- Hasegawa M, H Kishino & T Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 21: 160-174.
- Hoffmann AJ, ER Fuentes, I Cortes, F Liberona & V Costa. 1986. *Tristerix tetrandrus* (Loranthaceae) and its host-plants in the Chilean matorral: patterns and mechanisms. *Oecologia* 69:202-206.
- Hudson RR & NL Kaplan. 1988. The Coalescent process in models with selection and recombination. *Genetics* 120:831-840.
- Huelsenbeck JP & F Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Kuijt J. 1963. On the ecology and parasitism of the Costa Rican tree mistletoe, *Gaiadendron punctatum* (Ruiz and Pavón) G. Don. *Canadian Journal of Botany*. 41:927-938.
- Kuijt J. 1985. Morphology, biology and systematic relationships of *Desmaria* (Loranthaceae). *Plant Systematics and Evolution* 151:121-130.
- Kuijt J. 1988. Revision of *Tristerix* (Loranthaceae). *Systematic Botany Monographs* 19:61 pp.
- Maddison DR & WP Maddison. 2000. MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Maloof JE & DW Inouye. 2000. Are nectar robbers cheaters or mutualists? *Ecology* 81:2651-2661.
- Mauseth JD, G Montenegro & AM Walckowiak. 1984. Studies on the holoparasite *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae) infecting *Trichocereus chilensis* (Cactaceae) *Canadian Journal of Botany* 62:847-857.
- Mauseth, JD. 1990. Morphogenesis in a highly reduced plant - the endophyte of *Tristerix aphyllus* (Loranthaceae). *Botanical Gazette* 151: 348-53.
- Medel R, C Botto-Mahan, C Smith-Ramirez, MA Mendez, CG Ossa, LN Caputo & WL Gonzales. 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 & M Kalin-Arroyo. 2004. Effects of vector behavior and host resistance on mistletoe aggregation. *Ecology* 85:120-126.
- Norton DA & MA Carpenter. 1998. Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 13:101-105.
- Nylander JAA, F Ronquist, JP Huelsenbeck & JL Nieves-Aldrey. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53:47-67.
- Parker TA. 1980. Distribution and biology of the white-cheeked cotinga *Zaratornis stresemanni*, a high Andean frugivore. *Bull. British Ornithologists' Club* 101:156-265.
- Restrepo C, S Sargent, DJ Levey & DM Watson. 2002. The role of vertebrates in the diversification of New World mistletoes. En: Levey DJ, WR Silva & M Galetti, editores. *Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation* Pages 83-98. CAB International, Wallingford, UK.

- Rivera GL, L Galetto & L Bernardello. 1996. Nectar secretion pattern, removal effects, and breeding system of *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae). *Canadian Journal of Botany* 74:1996-2001.
- Ronquist F & JP Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tavaré S. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57-86.
- Tel-Zur N, S Abbo, D Myslabodski & Y Mizrahi. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17:249-254.
- Vidal-Russell R. 2007. The first aerial parasites in the sandalwood order (Santalales): molecular phylogenetic and biogeographic investigations. PhD tesis. Southern Illinois University, EEUU.

APÉNDICE 2.1 INFORMACIÓN DE EJEMPLARES UTILIZADOS

Especies y número de acceso de los ejemplares utilizados en este estudio (PN = parques nacionales)

Espece	Localidad	Cod	Número de colección	Herbario
<i>Tristerix aphyllus</i>	PN Fray Jorge, IV Región, Chile	FJ	G. Amico 97	BCRU
<i>Tristerix aphyllus</i>	PN Chincillas, IV Región, Chile	CH	L Suarez S/N	BCRU
<i>Tristerix aphyllus</i>	Los Andes, V Región, Chile	LS	G. Amico 162	BCRU
<i>Tristerix aphyllus</i>	PN La Campana, V Región, Chile	LC	G. Amico 166	BCRU
<i>Tristerix corymbosus</i>	PN Chincillas, IV Región, Chile	CH	G. Amico 80	BCRU
<i>Tristerix corymbosus</i>	Talca, VII Región, Chile	TA	G. Amico 83	BCRU
<i>Tristerix corymbosus</i>	Llao Llao, Río Negro, Argentina	LL	G. Amico 84	BCRU
<i>Tristerix corymbosus</i>	Linao, Chiloé, X Región, Chile	LI	G. Amico 96	BCRU
<i>Tristerix chodatianus</i>	PN Huascarán, Ancash, Perú	HU	D. N. Smith et al. 9536	MO 3337838
<i>Tristerix grandiflorus</i>	Sto. Domingo de los Colorados, Ecuador	SJ	V. Zar 1368	MO 3907304
<i>Tristerix grandiflorus</i>	Cotopaxi, Ecuador	CO	Palacios et al. 2547	MO 3672311
<i>Tristerix longebracteatus</i>	Quito, Pichinca, Ecuador	PI	D. Fernández et al. 371	MO 5889268
<i>Tristerix longebracteatus</i>	PN Huascan, Ancash, Perú	CA	D. N. Smith 8288	MO 722877
<i>Tristerix penduliflorus</i>	La Paz, Inquisivi, Bolivia	IN	M. Lewis 35236	MO 4661844
<i>Tristerix penduliflorus</i>	Urubamba, Cusco, Perú	MA	P. Nuñez 8288	MO 720879
<i>Tristerix peruvianus</i>	Cochabamba, Huaraz, Perú	HU	D. N. Smith y M. Buddensiek 10858	MO 3307944
<i>Tristerix peytonii</i>	Urubamba, Cusco, Perú	CZ	P. Nuñez y J. Arque 8287	MO 3632650
<i>Tristerix pubescens</i>	PN Huascarán, Ancash, Perú	HU	D. N. Smith y M. Buddensiek 11090	MO 3303268
<i>Tristerix pubescens</i>	PN Ancash, Ancash, Perú	HU2	D. N. Smith 11388	MO 3337809
<i>Trisetrix verticillatus</i>	La Calera, V Región, Chile	CM	G. Amico 158	BCRU
<i>Trisetrix verticillatus</i>	Guardia Vieja, V Región, Chile	GV	G. Amico 159	BCRU
<i>Trisetrix verticillatus</i>	Polvaredas, Mendoza, Argentina	PO	G. Amico 156	BCRU
<i>Trisetrix verticillatus</i>	Antuco, VII Región, Chile	AN	G. Amico 154	BCRU
<i>Notanthera heterophylla</i>	PN Los Queles, VIII Región, Chile		G. Amico 151	BCRU
<i>Ligaria cuneifolia</i>	Cerca de Santiago, V Región, Chile		G. Amico 145	BCRU

APÉNDICE 2.2 PROTOCOLOS

Protocolo Extracción de ADN genómico

Individualmente se molió cada muestra en un pistilo con la utilización de un mortero de mano. Al material molido, se le adicionó 1,5 ml de buffer de extracción C-TAB HC modificado para plantas con alto contenido de carbohidratos C-TAB HC (Tel-Zur et al. 1999) (100 mM tris HCl, 0.35 M Sorbitol, 5 mM EDTA, 1% de 2-mercaptoetanol) y se continuó moliendo por unos segundos. El producto obtenido se colocó en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 10.000 r.p.m por 10 minutos a 4° C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pelet en 1,5 ml de C-TBA (100 mM tris HCl, 5 mM EDTA), se centrifugó a 10.000 r.p.m por 10 minutos a 4° C. Este procedimiento se repitió dos veces. El pelet obtenido se resuspendió en 500µL de CTBA, 350 µL de CTBA alto en sales (50 mM tris-HCl pH 8, 4 M NaCl, 1,8% CTBA, 25 mM EDTA pH 8) y 30µL de Sarkosyl 30%. Las muestras fueron extraídas con Cloroformo:isopropanol (24:1) y se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 15 minutos a 4° C. La fase acuosa fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1,7 mL y se le agregó 90µL de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 600 µL de Isopropanol a -20° C, se mezcló bien y se guardó en a -20° C al menos 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 20 minutos a 4° C, se descartó el sobrenadante y se enjuagó el pelet obtenido con etanol frío al 75%. Se secaron las muestras y se resuspendieron en 200 µL de TE Buffer (1 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA, RNAsa 1 unidad por µL) y se incubaron por 40 minutos a 37°C. Se agregó 20 µL de Acetato de sodio y 440 µL de Etanol 100 %, se mezcló bien y se guardó a -20°C por al menos 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 20 minutos a 4° C, se tiró el sobrenadante y se enjuagó el pelet con etanol frío al 75%. Las mismas fueron secadas y resuspendidas en 100 µL de TE Buffer. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa por 30 minutos a 110 V y se verificó la presencia de ADN para cada muestra. Con la utilización de un fluorómetro se determinó la concentración ADN genómico para cada muestra. El ADN genómico fue diluido a la concentración de trabajo de 20 ng/µL.

Amplificación, purificación y secuenciación de ADN

Las amplificación de ADN (PCR reacción en cadena de la polimerasa) se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 960. La reacción de amplificación típica fue realizada en tubos de microcentrífuga de 25 µL y contenían 1X buffer (Promega, Madison, Wisconsin; 10mM Tris HCl, 50mM KCl, pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 µM dNTP's, 1 unidad de Taq polimerasa, 0.4 µM de cebador y 20 ng de ADN genómico.

La región ITS fue amplificada y secuenciadas con el par de cebadores 18S 1830 f (5'-AAC AAG GTT TCC GTA GGT GA-3') y 26S 40 r (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). En la región *atbB-rbcL*, tanto para la amplificación como para la reacción de secuencia, se utilizaron el par de cebadores *atpB* 1 r (5'GAA GTA GTA GGA TTG ATT CTC AT 3') y *rbcL* 60 r (5'CAG GAG

TAT AAT AAG TCA TTG 3'). Estos cebadores fueron diseñados especialmente para este estudio. La región *trnL-F* fue amplificada con los cebadores descritos en Taberlet et al. (1991)

Para la región ITS, el termociclador fue programado con los siguientes parámetros: 94° C por 5 min iniciales, seguidos por 35 ciclos a 94° C por 1 min, 52° C por 1 minuto y 1 min a 72° C, con una incubación final a 72° C por 10 minutos. Para las regiones del cloroplasto, el programa del termociclado fue en una escalera descendiente de temperatura “touch down” que consistió en 5 min a 95°C, 5 ciclos de 30 sec a 94°C, 30 sec a 52°C, y 1 min a 72°C, seguidos por 33 ciclos a 30 sec a 94°C, 30 sec a 48°C y 1 min a 72°C, con una incubación final por 10 min a 72°C. En la amplificación de la región de ITS a cada reacción se le adicionó DMSO al 5% (concentración final).

En todas las reacciones de amplificación, se colocó un control negativo, donde el ADN genómico se reemplazó por agua nanopura. Los productos amplificados fueron corridos en un gel de agarosa al 1% TBE (0,089 M Tris Hcl, 0,089 M Acido Bórico y 0,002 M de EDTA) para comprobar si el producto amplificado era el correcto.

Para la amplificación de muestras problemáticas se utilizó Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA).

Algunas muestras, principalmente las precedentes de herbario, tuvieron que ser re-amplificadas o clonadas. La re-amplificación se realizó utilizando el producto del PCR obtenido en la amplificación normal como ADN genómico. En la re amplificación se utilizaron cebadores internos a los utilizados en la primer amplificación y el volumen de ADN genómico utilizado fue de 0,5 uL en un volumen final de 25uL.

Los productos amplificados fueron purificados usando el kit de purificación Omega bio-tek (EZNA). La reacción de secuencia se realizó siguiendo los protocolos estándares usando BigDye (terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) que contenía AmpliTaq DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA) y better buffer (The Gel Company, San Francisco, CA). Las secuencias fueron obtenidas en un autosecuenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

Referencias bibliográficas

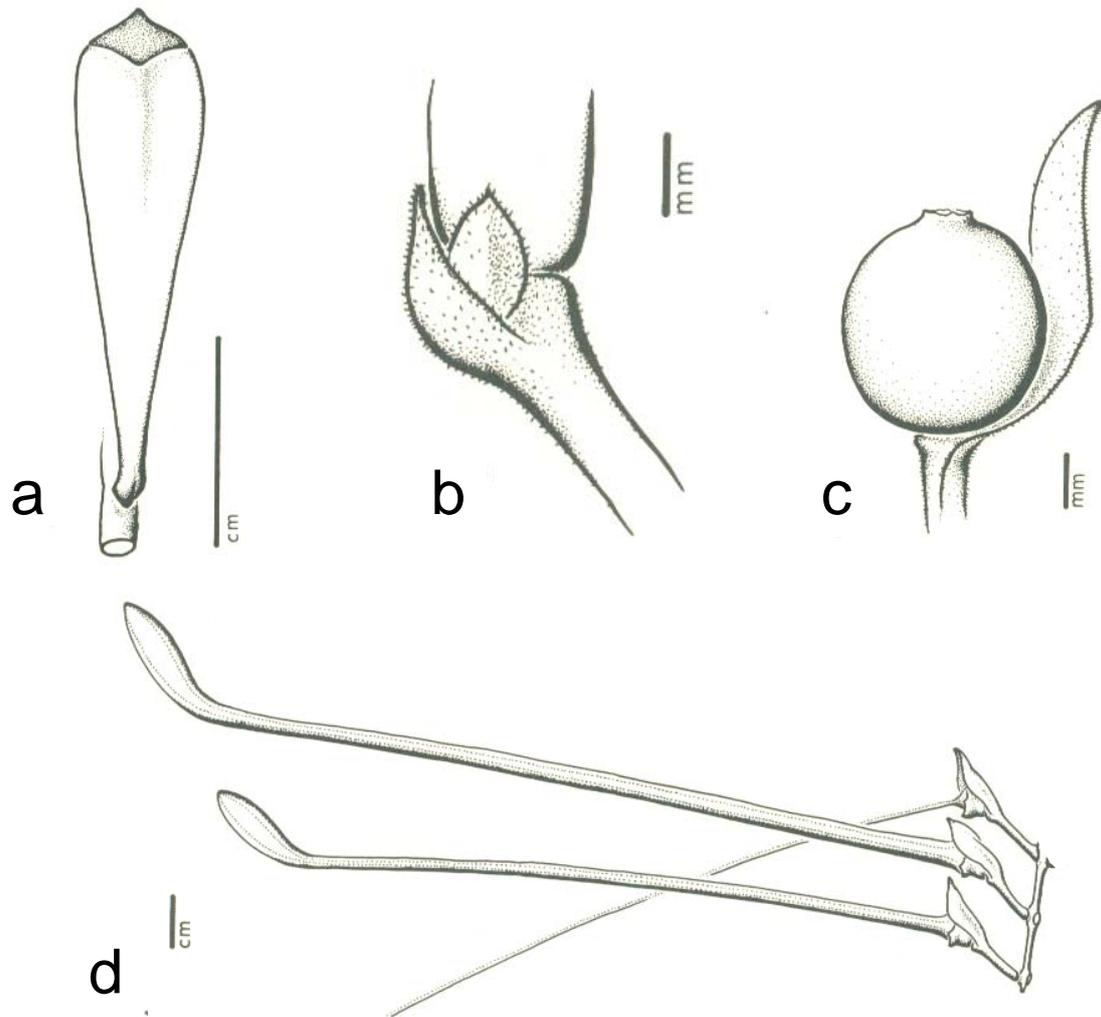
- Tel-Zur N, S Abbo, D Myslabodski & Y Mizrahi. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17:249-254.
- Taberlet P, L Gielly, G.Pautou & J Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.

APÉNDICE 2.3 CARACTERES MORFOLÓGICOS

Caracteres morfológicos y de hábitat del género *Tristerix* y del grupo externo. Representaciones gráficas en la página siguiente.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>T. aphyllus</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	3	0	1	1
<i>T. chodatianus</i>	?	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1	1	2	0
<i>T. corymbosus</i> CH	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	1	1
<i>T. corymbosus</i> LL	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4	1	1	2
<i>T. grandiflorus</i>	?	0	0	0	1	1	1	0	1	2	2	?	2	3
<i>T. longebracteatus</i>	1	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	2	0
<i>T. penduliflorus</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	1	2	0
<i>T. peruvianus</i>	?	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	?	2	0
<i>T. peytonii</i>	?	1	0	0	1	1	1	0	1	3	0	0	2	3
<i>T. pubescens</i>	?	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	2	0
<i>T. verticillatus</i> CM	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	1	1
<i>T. verticillatus</i> PO	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0	1	0
<i>Ligaria cuneifolia</i>	0	0	0	0,1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
<i>Notanthera heterophylla</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1,2

1) Sistema epicortical, 0: infección localizada, 1: raíces epicorticales. 2) Sección del tallo cuadrangular, 0: no, 1: si. 3) Hojas, 0: desarrolladas, 1: reducidas a escamas. 4) Hojas con punta esclerótica, 0: ausente, 1: presente. 5) Bracteolas, 0: ausente, 1: presente. 6) Bráctea foliácea, 0: ausente, 1: presente. 7) Pimpollos > 8 cm, 0: no, 1: si. 8) Número de pétalos, 0: cinco o seis, 1: cuatro. 9) Flor curva, 0: no, 1: si. 10) Coloración del pimpollo, 0 = rosa, 1 = rojo, 2 = rojo-amarillo-rojo, 3 = rojo-amarillo. 11) Coloración del fruto maduro, 0: negro, 1: rojo, 2: amarillo, 3: blanco, 4: verde. 12) Forma del fruto, 0: esférico; 1: ovoide), 13) Polinizador, 0: insecto, 1: *Diglossa* ausente (por picaflores), 2: *Diglossa* presente. 14) Bioma, 0: altoandino, 1: matorral, 2: bosque templado, 3: bosque nublado de altura. En Apéndice 2.1 se indican las localidades de los ejemplares utilizados.



Representaciones gráficas de algunos de los caracteres morfológicos (modificados de Kuijt 1988). **a)** Hojas con punta esclerótica de *T. chodatianus*. **b)** Presencia de bracteolas en *T. corymbosus*. **c)** Bráctea foliácea en un fruto de *T. pubescens*. **d)** Pimpollos mayor a 8 cm y curvo de *T. grandiflorus*

APÉNDICE 2.4 RECONSTRUCCIÓN DE LOS CARACTERES ANCESTRALES

Reconstrucción de los caracteres ancestrales para las especies del género *Tristerix*.

