

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Características fitoquímicas que determinan la herbivoría en
Epidendrum exasperatum Rchb. f y *Encyclia vespa* Vell (Dressler)
(Orchidaceae), Fortuna, Panamá, 2011-2012**

Diana Carolina Morales

Asesores:

Dra. Viviana Morales

MSc. Rafael Rincón

Dra. Katia Silvera

**Trabajo de graduación presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
como requisito parcial para obtener el
título de Maestría en Biología con
especialización en Biología Vegetal**

2013

DEDICATORIA

A mi hijo, César Damián, por ser mi inspiración y fortaleza para continuar siempre hacia adelante, y no dejarme vencer por las dificultades en el camino.

A mi madre, Angela Morales, por su dedicación y esfuerzo para ayudarme en mi formación personal y profesional.

A Cesar De Gracia por su apoyo y comprensión durante estos años.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le doy gracias a Dios, nuestro padre celestial, por permitirme culminar con éxito este trabajo, ya que sin él nada es posible.

A mi familia por su apoyo incondicional en momentos difíciles, su amor y su cariño sincero.

A Cesar De Gracia y Edgar Juárez por ser mis compañeros en mis trabajos de campo.

A la Dra Viviana Morales por apoyarme para llevar a cabo esta investigación, por sus enseñanzas y su guía constante.

Al Profesor Rafael Rincón por su valiosa guía durante la realización de este trabajo y por la motivación brindada para seguir en esta línea de investigación.

A Katia Silvera por su dedicación, apoyo y buenos consejos en el análisis y desarrollo de esta tesis.

A la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) y la Universidad Autónoma de Chiriquí por brindarme la oportunidad de alcanzar un paso más en mi perfeccionamiento profesional.

Un especial agradecimiento a todos los profesores de la Maestría en Biología Vegetal que formaron parte de nuestra formación y brindaron pequeños y grandes aportes a nuestras tesis.

A todos mis compañeros de la Maestría en Biología Vegetal, por brindarme consejos y apoyo para la realización de esta tesis.

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento al personal del Herbario de la Universidad Autónoma de Chiriquí, por su colaboración, en especial a Eyvar Rodríguez y Rosa Villarreal por su valiosa ayuda en el análisis de los datos y sus sugerencias.

Al Centro de Investigaciones de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) en especial a Johana Olmos, Raúl Méndez y Nicómedes Jaramillo, por su colaboración en la realización de pruebas químicas y espectroscópicas.

Un profundo agradecimiento a la empresa ENEL FORTUNA por permitirme realizar este trabajo dentro de la reserva; en especial quisiera agradecerle al señor Carlos Espinoza por la orientación y guía dentro de esta área.

A la Dirección de Investigación Judicial de Santiago (DIJ) y al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), por su apoyo en la realización de pruebas especializadas.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice General.....	v
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras.....	x
I. RESUMEN.....	14
II. INTRODUCCIÓN.....	15
III. OBJETIVOS.....	17
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
4.1 Generalidades de las orquídeas.....	18
4.1.1 Descripción.....	18
4.1.1.1 Tipo de crecimiento.....	18
4.1.1.2 Estructuras vegetativas y reproductivas.....	18
4.1.2 Diversidad y distribución.....	20
4.1.3 Amenazas y estado de conservación de las orquídeas.....	22
4.1.4 Importancia de la familia Orchidaceae.....	23
4.1.4.1 Relaciones ecológicas de orquídeas con otros organismos.....	23
4.1.4.2 Importancia económica de las orquídeas.....	26

4.1.4.3 Usos tradicionales de las orquídeas en fitoquímica y farmacología.....	26
4.2 Herbivoría y Florivoría.....	31
4.2.1 Efectos de la herbivoría y florivoría en las plantas.....	34
4.2.2 Teorías que tratan de explicar la herbivoría y florivoría.....	35
4.2.2.1 Teoría clásica de la defensa vegetal.....	35
4.2.2.2 Teoría de la apariencia vegetal.....	36
4.2.2.3 Teoría de la asignación de recursos.....	37
4.2.3 Defensas en las plantas.....	40
4.2.3.1 Defensas físicas.....	40
4.2.3.2 Defensas químicas (metabolitos secundarios).....	41
4.2.4 Importancia de los estudios de herbivoría.....	47
4.2.5 Estudios de herbivoría en orquídeas.....	48
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
5.1 Área de estudio.....	53
5.2 Especies seleccionadas.....	53
5.3 Medición de la herbivoría en hojas y flores.....	58
5.3.1 Herbivoría en hojas.....	58
5.3.2 Herbivoría en flores.....	59
5.4 Caracterización química de las hojas y flores.....	61

5.4.1 Selección y colección del material vegetal	61
5.4.2 Extracción de muestras	61
5.4.3 Determinación de porcentajes de rendimiento y porcentaje de humedad.....	62
5.4.4 Determinación de porcentaje de cenizas.....	63
5.4.5 Análisis de nutrientes.....	63
5.4.6 Análisis de pH.....	64
5.4.7 Determinación de metabolitos secundarios	64
5.5 Evaluación de la preferencia de herbívoros por hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	69
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
6.1 Herbivoría en hojas flores.....	73
6.1.1 Herbivoría en hojas	73
6.1.2 Herbivoría en flores	77
6.2 Características fitoquímicas identificadas en las hojas y flores.....	81
6.2.1 Coloración de extractos.....	81
6.2.2 Porcentajes de rendimiento y de humedad de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	83
6.2.3 Porcentaje de cenizas de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	87
6.2.4 Macronutrientes y micronutrientes en hojas y flores.....	89
6.2.5 Medidas de pH en hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	94

6.2.6 Metabolitos secundarios en hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	95
6.2.6.1 Factores de retención.....	95
6.2.6.2 Resultados del tamizaje fitoquímico.....	99
6.2.6.3 Análisis e interpretación de pruebas espectroscópicas.....	101
6.3 Resultados de las pruebas de preferencia con extractos de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	116
CONCLUSIONES	121
RECOMENDACIONES.....	124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Usos etnobotánicos de algunas especies de orquídeas	28
Cuadro II. Categorías de daño y las características establecidos para la medición de la florivoría en <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	59
Cuadro III. Factores de retención (RF) en extractos etanólicos de hojas y flores.	98
Cuadro IV. Resultados del tamizaje fitoquímico realizados en extractos de hojas.....	102
Cuadro V. Resultados del tamizaje fitoquímico realizados en extractos de flores.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Tipos de crecimiento en orquídeas: a. Crecimiento simpodial; b. Crecimiento monopodial	18
Fig. 2. Estructura de orquídeas: a) Partes vegetativas; b) Detalle de la estructura de las flores; c) Corte transversal de cápsula con las semillas.	20
Fig. 3. Distribución global de la familia Orchidaceae	21
Fig. 4. Metabolitos secundarios identificados en la familia Orchidaceae.	30
Fig. 5. Interacciones dinámicas de herbivoría entre el algondocillo (<i>Asclepias</i> spp.) y la oruga monarca.....	32
Fig. 6. Perfil metabólico de <i>Nicotiana attenuata</i> y las funciones que realizan en la planta.....	42
Fig. 7. Ruta biosintética de compuestos fenólicos.....	44
Fig 8. Ruta biosintética de compuestos terpénicos.....	46
Fig. 9. Estructura química del habenariol, compuesto químico de <i>Habenaria repens</i> contra la herbivoría de cangrejos.	51
Fig. 10. Mapa de las áreas seleccionadas para el estudio	54
Fig. 11. Características morfológicas de <i>E. exasperatum</i> en la Reserva Forestal Fortuna.	56
Fig. 12. Características morfológicas de <i>E. vespa</i> en la Reserva Forestal Fortuna.	57
Fig. 13. Identificación de las categorías de daño en las flores de <i>E. vespa</i>	60
Fig. 14. Imagen de la especie <i>A. coronatus</i> , hormiga de la tribu Attini.	71

Fig 15. Porcentaje total de herbivoría en las hojas de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> durante seis meses de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012.	73
Fig. 16. Variaciones en los porcentajes de herbivoría en las hojas de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> durante cada mes de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012.....	76
Fig 17. Variaciones en el número de flores con daño por herbivoría en <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> durante cada mes de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012.....	78
Fig 18. Promedio total de flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> en cada categoría de daño, durante dos meses de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012.....	80
Fig. 19. Coloración de extractos etanólicos de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	82
Fig. 20. Porcentaje de rendimiento de muestras de extractos etanólicos, metanólicos y hexánico de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	85
Fig. 21. Porcentaje de humedad en hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	86
Fig. 22. Porcentaje de cenizas en hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	88
Fig. 23. Macronutrientes encontrados en hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	90
Fig. 24. Micronutrientes encontrados en hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> ..	93
Fig. 25. Medidas de pH de muestras de extractos etanólicos de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	95
Fig. 26. Manchas de glúcidos observadas en los extractos etanólicos de hojas de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> durante la cromatografía en placa fina.....	96

Fig. 27. Resultados de cromatografía en placa fina de extractos etanólicos de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i> , con eluyente acetato de etilo/ hexano 2:8.....	97
Fig. 28. Resultados cualitativos de algunas pruebas realizadas durante el tamizaje fitoquímico de hojas y flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	100
Fig. 29. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de hojas de <i>E. exasperatum</i>	109
Fig. 30. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de hojas de <i>E. exasperatum</i>	109
Fig. 31. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de hojas de <i>E. vespa</i>	110
Fig. 32. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de hojas de <i>E. vespa</i>)	110
Fig. 33. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de flores de <i>E. exasperatum</i>	111
Fig. 34. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de flores de <i>E. exasperatum</i>	111
Fig. 35. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de flores de <i>E. vespa</i>	112
Fig. 36. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de flores de <i>E. vespa</i>	112
Fig. 37. Resultados de pruebas de preferencia de <i>A. coronatus</i> para muestras de hojas de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	117
Fig. 38. Resultados de pruebas de preferencia de <i>A. coronatus</i> para muestras de flores de <i>E. exasperatum</i> y <i>E. vespa</i>	119

I. RESUMEN

Estudios de herbivoría en la familia Orchidaceae muestran que estas especies presentan bajos porcentajes de herbivoría, sin embargo estos estudios son escasos. Las investigaciones sobre las defensas fitoquímicas en orquídeas y sus efectos en la herbivoría y florivoría permitirán determinar los mecanismos que influyen en las diferencias entre especies y la identificación de compuestos con actividad promisorio en la medicina y control biológico. Se determinó la herbivoría y florivoría de *E. exasperatum* y *E. vespa* en la Reserva Forestal Fortuna durante seis meses. Se realizaron análisis fisicoquímicos e identificación de metabolitos secundarios en extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Los porcentajes de herbivoría en las hojas no mostraron diferencias significativas entre *E. exasperatum* y *E. vespa*, sin embargo fueron relativamente bajos. Los bajos porcentajes de herbivoría en las hojas, podría estar relacionados con contenido de agua, nutrientes y la presencia de metabolitos secundarios que reducen la digestibilidad. Se observaron diferencias en la herbivoría de las hojas por estacionalidad, siendo mayor en los meses de estación seca. Algunos metabolitos secundarios identificados en extractos de hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* fueron flavonoides, pigmentos carotenoides, alcaloides y terpenos. Se encontraron diferencias significativas en la florivoría de ambas especies, relacionadas con el contenido de metabolitos secundarios implicados en la disuasión de herbívoros. El mayor número de flores con daño se observó en *E. vespa*. En los extractos de flores de ambas especies fueron identificados flavonoides (flavonas, dihidroflavonoles, lignanos y taninos hidrolizables), pigmento antocianinas y alcaloides. En las flores de ambas especies se observaron mayores daños en los pétalos. Se observó una mayor preferencia de *A. coronatus* hacia muestras frescas de hojas de ambas especies, mientras que los extractos de flores de *E. vespa* fueron más visitadas por *A. coronatus*.

II. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son un grupo de especies de plantas vasculares que presentan una amplia diversidad y especialización, lo que les ha permitido desarrollarse en diversos hábitats y establecer interacciones complejas con otros organismos (Silvera 1993; Dressler 1990; Rasmussen et al. 1998; Alvarado 2000). Una de estas interacciones es la herbivoría por diversos insectos como las hormigas defoliadoras de la tribu Attini. Para defenderse de estos insectos herbívoros las orquídeas pueden utilizar defensas físicas como hojas gruesas y químicas como taninos y otros metabolitos secundarios (Tiffin 2000; Coley *et al.* 2007). Sin embargo, uno de los mayores retos para el estudio de la herbivoría en plantas como las orquídeas, es tratar de entender cómo algunas especies de orquídeas e individuos son poco atacados, y por qué algunos individuos sobreviven sin daños, mientras sus vecinos sufren herbivoría (Granados- Sánchez *et al.*, 2008).

La diversidad fitoquímica de las plantas puede tener efectos diversos en los herbívoros, desde sustancias insecticidas hasta repelentes o incluso atrayentes o distractores; esto es muy interesante desde el punto de vista biológico y acarrea consecuencias económicas importantes (Vivanco *et al.*, 2004). En el contexto ecológico, el estudio de la herbivoría nos permite entender las interrelaciones que existen entre los seres vivos, desde un punto de vista evolutivo y fisiológico; además, nos permite observar la importancia de los metabolitos secundarios en los procesos de adaptación de las plantas, en la competencia con herbívoros y otras plantas, en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, en la resistencia frente al estrés por factores abióticos, en

la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas y frutos (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003).

Estudios de herbivoría realizados en el grupo de las orquídeas han mostrado que estas especies presentan bajos porcentajes de herbivoría, sin embargo, estos estudios son escasos en comparación con estudios realizados en otras familias de plantas (Whigham, 1990; Sterck *et al.*, 1992; Lowman *et al.*, 1996; Vallius & Salonen, 2000; Malo *et al.*, 2001; Schmidt & Zotz, 2002; Pellegrino & Musacchio, 2006). Los estudios sobre las defensas físicas y químicas en orquídeas y sus efectos en la herbivoría de hojas y flores, permitirán determinar cuáles son los mecanismos que influyen en las diferencias de daño entre especies e individuos. En particular, es de importancia la identificación de algunos compuestos de defensas, como los metabolitos secundarios, que podrían tener actividad promisoría en la medicina y como control de plagas.

Estudios previos de la herbivoría en orquídeas, han demostrado que existen compuestos que sirven de defensa como algunos alcaloides y terpenos (Wilson *et al.*, 1999). Sin embargo existe poca información sobre la mayoría de los compuestos presentes en estas especies, sobre todo las de zonas tropicales, y que podrían tener importancia farmacológica y biotecnológica.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Determinar la herbivoría en las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* y la relación con sus características fitoquímicas.

Objetivos específicos

- ❖ Cuantificar la herbivoría en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* durante distintas épocas del año en la Reserva Forestal Fortuna.
- ❖ Identificar algunas características fitoquímicas presentes en las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*.
- ❖ Evaluar el efecto de los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* sobre la preferencia de la hormiga *Acromyrmex coronatus*.

IV. REVISION DE LITERATURA

4.1 GENERALIDADES DE LAS ORQUÍDEAS

4.1.1 Descripción

4.1.1.1 Tipo de crecimiento

De acuerdo a Garbey (2009), las orquídeas son plantas herbáceas y perennes que presentan dos tipos básicos de crecimiento: el tipo simpodial, que origina tallos múltiples (Fig. 1a) y el tipo monopodial que origina un solo tallo (Fig. 1b).

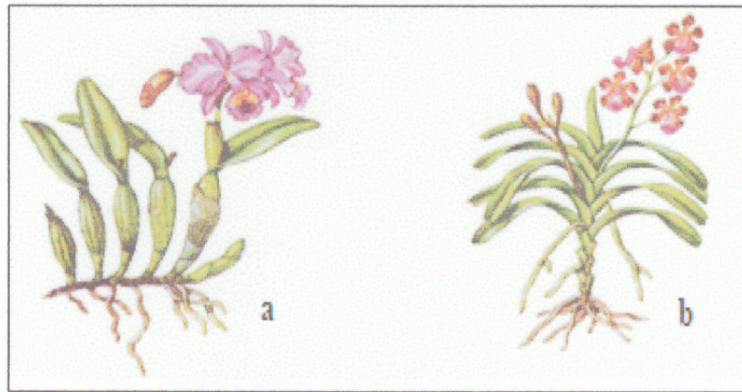


Fig 1. Tipos de crecimiento en orquídeas: a. Crecimiento simpodial; b. Crecimiento monopodial (modificado de Garbey, 2009).

4.1.1.2 Estructuras vegetativas y reproductivas

a) Sistema radical

El sistema radical de las orquídeas, tiene notables modificaciones del tipo normal de raíz. Sin embargo, al igual que en el resto de las plantas es un órgano vital para el anclaje de la planta y la absorción de nutrientes. En las orquídeas terrestres, las raíces son

estructuras alargadas y ramificadas, cubiertas de pelillos absorbentes. Las raíces de las epífitas son aún más especializadas que las orquídeas terrestres. En ellas, muchos pelillos radicales se han sustituido por una funda de células muertas, esponjosas, que se llama velamen (Dressler, 1993) (Fig. 2a).

b) Hojas

De acuerdo a Dressler (1990), las hojas nacen del rizoma o de los tallos aéreos, las cuales son simples y de margen entero, generalmente alternas, espiraladas, dísticas o verticiladas, muchas veces plegadas, basales o a lo largo del tallo (Fig. 2a).

c) Flores

La flor de las orquídeas está constituida en verticilos o series de tres partes cada uno (Fig. 2b): tres sépalos, tres pétalos (de los que uno se modifica para formar el labelo), además la columna (que resulta de la fusión de estambres y estilo). En la columna encontramos la antera (parte receptiva), que puede ser dorsal, apical o ventral, respecto a la columna. En la parte superior de la columna, se encuentran los polinios (masa de polen compactadas en número de dos, cuatro u ocho) y debajo el estigma, separado por un pequeño tabique llamado rostelo. Cuando se trata de inflorescencias, éstas pueden ser terminales o laterales, subtendidas por un pedúnculo largo o abreviado, de una o más flores, comúnmente una espiga, un racimo simple o una panícula (Dressler, 1993).

d) Frutos y semillas

Luego de la polinización, los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y los tubos polínicos se extienden hasta el ovario. Si la fertilización no ocurre la cápsula o el fruto detiene su desarrollo y muere; de lo contrario, se desarrollan los

embriones. El embrión está rodeado por una cubierta o testa, por lo que necesitan fuentes de nutrición externas hasta desarrollarse lo suficiente como para sobrevivir de una forma autótrofa (Fig. 2c). En condiciones naturales, estas fuentes de alimento las obtienen de la asociación con hongos (Kuan & González, 1993).

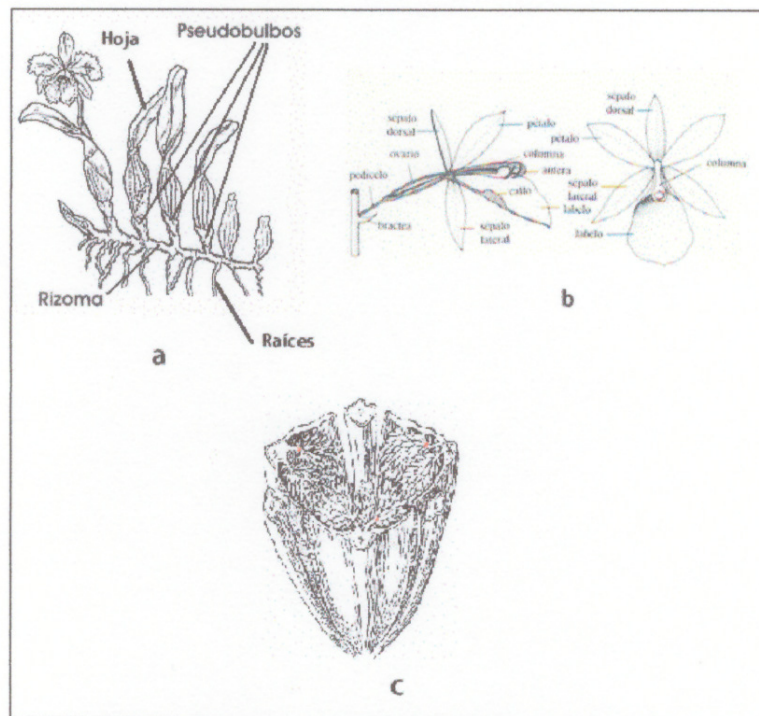


Fig. 2. Estructura de orquídeas: a) Partes vegetativas; b) Detalle de la estructura de las flores; c) Corte transversal de cápsula con las semillas (modificado de Dressler, 1990 y Garbey, 2009).

4.1.2 Diversidad y distribución

Datos actualizados muestran que la familia Orchidaceae es la familia más grande de plantas con flores, con aproximadamente 26,567 especies agrupadas en cerca de 800

géneros (Kew Royal Botanic Garden). De acuerdo a Dressler (1990), se encuentran en los cinco continentes y únicamente las regiones polares y los grandes desiertos no presentan condiciones para su sobrevivencia (Fig. 3).



Fig. 3. Distribución global de la familia Orchidaceae (tomado de Arditti, 1992).

El ámbito de distribución de esta familia va desde 72° norte hasta 52° sur; sin embargo, el mayor número de orquídeas se encuentra en las zonas tropicales, donde las especies de epífitas constituyen hasta el 73 % de la flora (González, 1995). La mayoría de éstas plantas se localizan entre el sureste de Asia hasta Indonesia y Australia. En segundo lugar está la zona comprendida entre África y Madagascar y una tercera zona que va desde México hasta Brasil (Kuan & González, 1993).

Las orquídeas presentan varios hábitos de crecimiento debido a su gran variabilidad morfológica. Crecen sobre los árboles (epífitas), o sobre las rocas (litofíticas) y en el suelo, pero una gran parte de la familia es epífita. Las orquídeas son más diversas y abundantes en bosques húmedos pero se encuentran algunas especies en bosques secos y estacionales (Dressler, 1993).

En América, los países con mayor diversidad de orquídeas son Colombia con 3,000 especies, Ecuador con 3,800 especies y Brasil con 2,500. En Panamá encontramos unas 1,150 especies distribuidas en 184 géneros (Correa *et al.*, 2004). Esta diversidad puede ser mayor y una característica importante, es que en nuestro país podemos encontrar especies representativas de Centro y Sur América (Dressler, 1993; Silvera, 2010).

4.1.3 Amenazas y estado de conservación de las orquídeas

El gran valor comercial que poseen ciertas especies de orquídeas ha provocado el saqueo indiscriminado de individuos silvestres, y la falta de conocimientos en el cultivo de estas plantas provoca grandes pérdidas de material valioso, con la consecuente erosión genética (Silvera, 2010).

Otro problema que enfrentan estas especies es la deforestación que ha provocado serios daños especialmente en las poblaciones de orquídeas nativas y endémicas. Además de lo anterior, poseen limitaciones en su germinación y desarrollo, ya sea por falta de polinizadores o por las características de sus semillas de no presentar endospermo. La sumatoria de estos factores hace que el número de semillas que germinan en condiciones

naturales sea muy bajo (menos del 5%) en comparación con el número de semillas producido (Abdelnour & Muñoz, 1997).

Las orquídeas están consideradas por la Convención sobre Comercio Internacional de Especies de Fauna y Flora Silvestre (CITES por sus siglas en inglés), como amenazadas y en peligro de extinción. En Panamá, se encuentran protegidas por la Autoridad Nacional del Ambiente, y contempla sanciones y multas para quienes vendas estas plantas sin autorización (Silvera, 1993).

Debido al peligro que enfrentan estas especies, es necesario aumentar el conocimiento que se tiene sobre la ecología y diversidad de estas especies. Además, una forma de contribuir a la conservación de las orquídeas es la identificación de los organismos o factores que las afectan. El reconocimiento de los daños reales o potenciales permite que estos se puedan controlar evitando la pérdida de valiosas especies (Rivera, 1998; Rivera & Corrales, 2007).

4.1.4 Importancia de la familia Orchidaceae

4.1.4.1 Relaciones ecológicas de las orquídeas con otros organismos

Las interacciones ecológicas entre las orquídeas y otros organismos constituyen un sistema de estudio que permite poner de manifiesto la complejidad del proceso evolutivo en la naturaleza (Dressler, 1990; Paccini & Franchi., 2008). Aspectos como la biología de la polinización, la germinación de las semillas y las relaciones con hongos para realizar sus procesos vitales son puntos de interés en el estudio de la familia Orchidaceae (Dressler, 1993).

Uno de los aspectos más sobresalientes en la ecología de las orquídeas es la biología de su polinización, ya que algunas especies de orquídeas recompensan a los polinizadores con alimento (como néctar, pelos alimenticios o aceites) y con otros compuestos como ceras, resinas y fragancias. Sin embargo, muchas orquídeas han recurrido a la táctica de seducir a los polinizadores ofreciendo aromas, formas, colores o movimientos que imitan algo que a éstos les interesa sin ofrecer nada a cambio (engaños) (Jersáková *et al.* 2006). Además, se conoce que el 97 % de las orquídeas necesitan de una especie de polinizador para que se lleve a cabo la transferencia de los granos de polen y, por ende, para que se produzca la fecundación y la formación de las semillas (Cingel, 2001). Se debe tener en cuenta que el polen de las orquídeas se halla agrupado en masas compactas llamadas polinias, de tal modo que por sí solo, o por acción del viento, el polen no se puede dispersar de una flor a otra, por lo que los polinizadores son imprescindibles para asegurar su reproducción sexual. Algunas atraen visitantes generalistas, pero muchas están bastante especializadas, atrayendo sólo a una o unas pocas especies como polinizadores. No obstante, la especialización en un solo tipo de polinizador para asegurar una transferencia más eficiente de polen, determinó una creciente especialización morfológica y estructural en las flores de las orquídeas para garantizar la atracción de una sola especie de insecto (Darwin, 1862; Neiland & Wilcock, 1998).

En la mayoría de las especies de orquídeas, las semillas son muy pequeñas y requieren nutrientes provistos por un hongo micorrícico para poder germinar, estableciendo así una relación simbiótica. El hongo suministra azúcares al protocormo

(especialmente a aquellos que no poseen clorofila) y obtiene el azúcar de secciones del substrato de la orquídea, es decir, la corteza de un árbol o del suelo. El protocormo, a su vez, provee al hongo con ciertas vitaminas y un hábitat donde vivir. Con el tiempo, el joven retoño comenzará a producir sus propios nutrientes y la simbiosis no será más necesaria (Dressler, 1993).

Un gran número de orquídeas son verdes por tener clorofila y capaces por esa misma razón de producir sus propios alimentos (autótrofas). Sin embargo, algunas carecen de esos pigmentos y son incapaces del autotrofismo, dependiendo de una relación simbiótica con ciertos tipos de hongos (la mayoría del género *Rhizoctonia*), para absorber nutrientes derivados de la descomposición de la materia orgánica. A estas plantas se les llama saprófitas (Walter, 1979).

En sus ecosistemas naturales, las orquídeas viven en un delicado balance con los otros organismos del ambiente, por lo que pequeños cambios ambientales tiene efectos adversos sobre ellas y pueden resultar en disminuciones en las poblaciones, o en último caso pueden llevar a su extinción (Dressler, 1993; Ulloa, 2000). Sin embargo, existe poca información sobre la biología y ecología de muchas especies de orquídeas y los factores (bióticos y abióticos) que pueden tener influencia en su supervivencia y reproducción (Rasmussen & Whigham, 1998). Además, los factores abióticos han sido mucho más estudiados que las interacciones bióticas, tales como la herbivoría y la competencia. La herbivoría en particular ha sido un aspecto desestimado en muchos estudios poblacionales (Zotz & Hietz, 2001).

4.1.4.2 Importancia económica de las orquídeas

Tradicionalmente las orquídeas han sido utilizadas por distintos pueblos con fines ornamentales y alimenticios como la vainilla de la *Vanilla planifolia* Andrews, y también algunas especies son comercializadas como aromatizantes de té. A nivel mundial, Tailandia es el país con mayor producción de orquídeas, con un monto anual de 40 millones de dólares; mientras que en América Latina, los países Colombia, Venezuela y Costa Rica producen cantidades millonarias por las exportaciones de orquídeas producidas en laboratorio. Además se estima que nueve millones de plantas son exportadas a Estados Unidos, Europa y Asia provenientes de países centroamericanos (Sahavacharin, 1998; Revelo & Cisneros, 2008).

En Panamá, se estima que entre el año 2009-2010, alrededor de 2,337 plantas fueron extraídas vivas por permisos comerciales (Dirección de Áreas Protegidas y Vida Silvestre. Autoridad Nacional del Ambiente ANAM).

4.1.4.3 Usos tradicionales de las orquídeas en fitoquímica y farmacología

Algunas especies de orquídeas han sido utilizadas desde hace mucho tiempo en la medicina tradicional de diversas culturas alrededor del mundo para el tratamiento de enfermedades de la piel, problemas digestivos, respiratorios, de circulación, en tratamientos antitumorales y antidiabéticos, entre otros (Cuadro 1).

Los estudios de los compuestos químicos de las orquídeas son muy escasos y en su mayoría, se han realizado en los últimos 15 años. Los primeros registros del uso de las orquídeas en la medicina, data del año 1233 en la antigua cultura china donde se

describen las propiedades curativas de 20 especies. Los sumerios hace 4,000 años describen dentro de sus registros algunas orquídeas como medicinales. Más tarde, en la obra de Dioscorides, *De Materia Medica*, se describen dos especies de orquídeas terrestres con propiedades afrodisiacas (Kong *et al.*, 2003). En 1568, William Turner, en su libro *English Herbal* menciona el uso de orquídeas para el tratamiento de la gastritis.

Desde hace siglos, numerosas especies del género *Anaectochilus* y *Epidendrum* han sido utilizadas en la medicina tradicional en América Latina por culturas indígenas, mientras que especies de *Dendrobium* son utilizadas en países asiáticos. Sin embargo existe una limitada información científica sobre la bioactividad, funciones fisiológicas y eficacia clínica de estas especies, en especial de las especies tropicales (Zhong *et al.*, 2000).

De acuerdo a Pérez Gutiérrez (2010), los estudios farmacológicos recientes en la familia Orchidaceae, han demostrado que presentan un amplio rango de compuestos químicos, particularmente en flores y hojas; actualmente solo se han identificado alrededor de 300 metabolitos secundarios en esta familia que pertenecen principalmente pertenecen al grupo de los alcaloides, flavonoides, terpenos y fenantrenos (Fig. 4).

Actualmente, los géneros *Epidendrum*, *Dendrobium*, *Maxillaria*, *Spiranthes* y *Encyclia* son algunos de los más destacados en estudios de bioprospección, por encontrarse en ellos varios metabolitos secundarios de interés para la fitoquímica y la farmacología.

Cuadro I. USOS ETNOBOTÁNICOS DE ALGUNAS ESPECIES DE ORQUÍDEAS (MODIFICADO DE PÉREZ GUTIÉRREZ, 2010).

Especie	Países donde se utiliza	Partes utilizadas	Usos etnobotánicos	Referencias
<i>Anaectochilus formosanus</i>	Taiwán	Toda planta	Fiebres, tratamientos diabéticos, antiinflamatorio, para la hipertensión	Satish <i>et al.</i> , (2003)
<i>Bletilla striata</i>	Taiwán, Nepal, China, Tíbet	Pseudo bulbos	Úlceras, regeneración de tejidos. Tratamiento de tuberculosis	Luo <i>et al.</i> , (2007)
<i>Catasetum barbatum</i>	Guianas, Japón	Toda planta	Antiinflamatorio. Tratamiento para calmar la fiebre	Shimizu <i>et al.</i> , (1988)
<i>Cypripedium macranthos</i>	México, Guatemala, Colombia	Rizoma	Infecciones de la piel	Shimura <i>et al.</i> , (2007)
<i>Dendrobium aurantiacum</i>	Australia	Hojas	Diabetes	Yang <i>et al.</i> , (2006)
<i>Epidendrum rigidum</i>	México, Norte y Suramérica y en Las Antillas	Tallo	Reponer fluidos corporales	Hernández-Romero <i>et al.</i> , (2005)
<i>Habenaria repens</i>	China	Pseudo bulbos	Afrodisíaco	Johnson <i>et al.</i> , (1999)
<i>Maxillaria densa</i>	México	Toda planta	Relajante	Déciga-Campos <i>et al.</i> , (2007a)
<i>Prosthechea michuacana</i>	México	Hojas y flores	Tratamiento de diabetes. Antioxidante. Antitumoral	Cervantes Reyes, (2008)
<i>Scaphyglottis livida</i>	México	Toda planta	Agente analgésico y antiinflamatorio	Déciga-Campos <i>et al.</i> , (2007b)
<i>Spiranthes australis</i>	China, Trinidad y Tobago	Toda planta	Problemas urinales. Tratamiento de diabetes mellitus. Enfermedades infecciosas, Tratamiento del cáncer	Lans (2006), Peng <i>et al.</i> , (2007)

Especie	Países donde se utiliza	Partes utilizadas	Usos etnobotánicos	Referencias
<i>Spiranthes mauritianum</i>	Trinidad y Tobago	Toda la planta	Usos en heridas de serpientes y picadas de escorpión	Lans <i>et al.</i> , (2001)
<i>Vanda tessellate</i>	India	Raíces y hojas	Hojas y flores para condiciones inflamatorias de oído y remedio contra otitis. Raíces usadas para reumatismo, fiebres y problemas respiratorios	Chopra <i>et al.</i> , (1956), Basu <i>et al.</i> , (1971), Suresh <i>et al.</i> , (2000)
<i>Vanilla planifolia</i>	México	Hojas	Tratamiento de fiebres, reumatismo. Usado para incrementar la energía.	Martin de la Cruz, (1552)

En especies del género *Dendrobium* se han identificado alrededor de 60 compuestos, principalmente fenantrenos y fenoles, con actividad antioxidante y contra el cáncer (Pérez Gutiérrez, 2010). Diversas especies de *Epidendrum* han sido estudiadas para determinar sus propiedades como analgésicos, sin embargo uno de los más recientes estudios señala la importancia de los fenantrenos y bibenzyl de *Epidendrum rigidum* Jacq., para inhibir el crecimiento de *Amaranthus hypocondriacus* L., lo que podría tener aplicaciones para el control biológico (Hernández-Romero *et al.*, 2005).

En los géneros *Maxillaria* y *Spiranthes* se han identificado principalmente fenantrenos con actividad antiinflamatoria y espasmolítica (Déciga-Campos *et al.*, 2007a), mientras que en especies del género *Encyclia* y *Prostechea* se han detectado compuestos fenólicos, terpenos y fenantrenos con actividad para el tratamiento de la diabetes y el cáncer (Reyes, 2008).

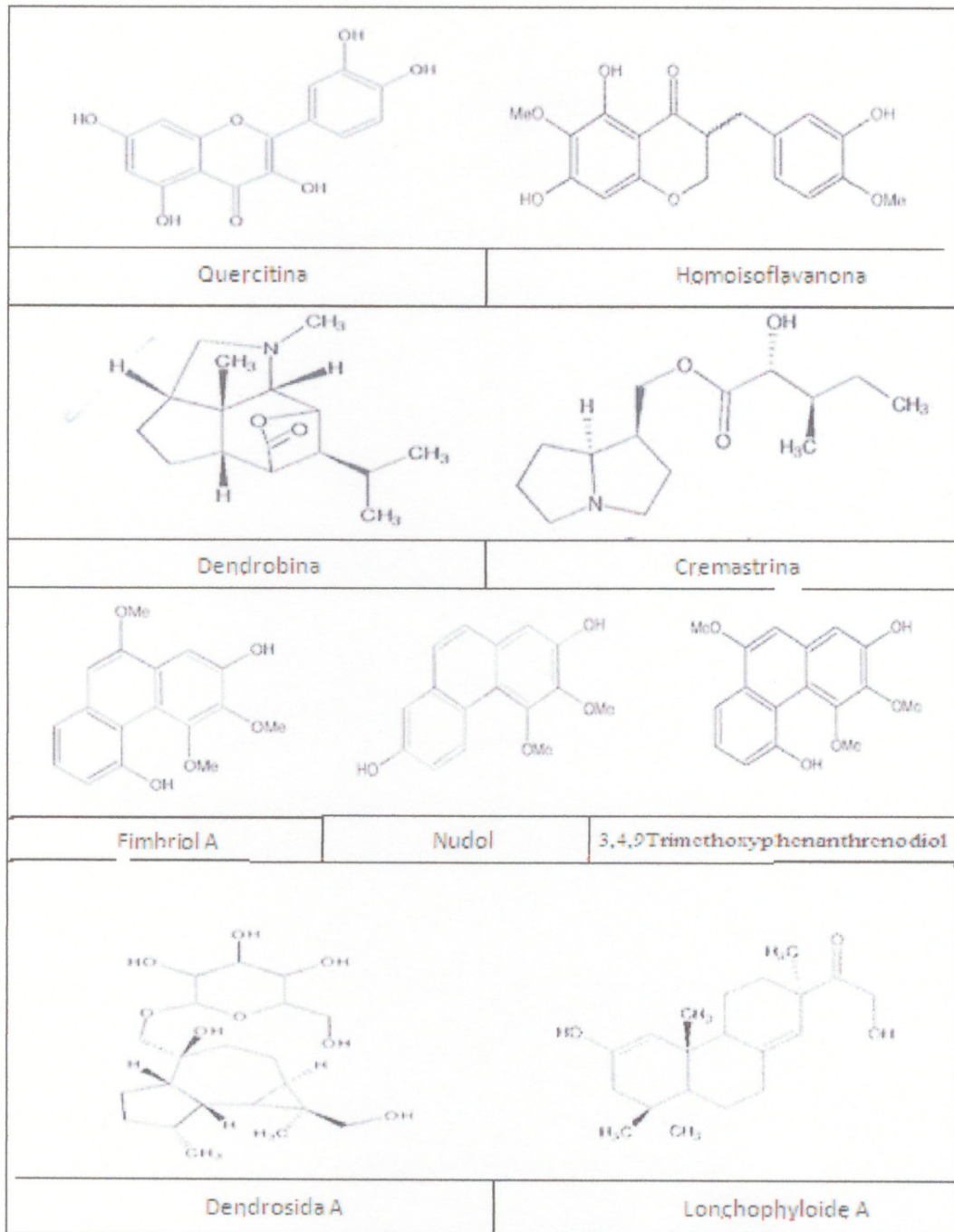


Fig. 4. Metabolitos secundarios identificados en la familia Orchidaceae (modificado de Pérez Gutiérrez, 2010).

4.2 LA HERBIVORÍA Y FLORIVORÍA

La producción de compuestos químicos es considerada por muchos autores como una expresión de defensas en las plantas, ante el daño o herbivoría por diversos organismos (Bell, 1974; Deverall, 1977; Dirzo, 1986; Wink, 1999; Sánchez-Ramos *et al.*, 2010). Este daño no es igual en todas las especies de plantas y las variaciones en la magnitud en las especies dentro de una sola comunidad reflejan principalmente la diferencia en la palatabilidad de las especies (Coley *et al.*, 2007).

La herbivoría es una de las interacciones bióticas de mayor impacto en las comunidades naturales (Crawley, 1983; Dirzo, 1984). El término herbivoría se emplea de una manera amplia e incluye tanto el daño foliar que provocan los insectos y los que ocasionan los patógenos. Mientras que la herbivoría en las flores o florivoría se define como el consumo de botones florales o flores maduras, e incluye daño en brácteas, sépalos, pétalos, estructuras críticas de reproducción (estambres, pistilos, columna, etc.) así como en el polen y óvulos (Burgess, 1991).

En los bosques tropicales las relaciones evolutivas entre los herbívoros y las plantas da como resultado una gran variedad de adaptaciones e interacciones. Los herbívoros dan paso a una serie de defensas químicas, mecánicas y fisiológicas en las plantas (Coley & Barone, 1996). Al mismo tiempo, los herbívoros luchan por neutralizar las defensas de las plantas, reproducirse en competencia con otras especies, y eludir a los depredadores por lo que las interacciones entre plantas y herbívoros son dinámicas. Un ejemplo de estas interacciones se observa en la Figura 5, el algodoncillo (*Asclepias* spp.) produce algunos compuestos tóxicos para los vertebrados como la Calotoxina; la

oruga de la monarca come las hojas de *Asclepias* spp. y asimila el compuesto, éste es retenido por la oruga hasta llegar al estado de mariposa. El compuesto hace que la mariposa sea desagradable a los pájaros depredadores (Granados-Sánchez *et al.*, 2008).

Coley & Barone (1996) mencionan que la herbivoría en hojas y flores es mayor en los bosques tropicales en contraste con los bosques templados, sobre todo en el sotobosque. Además, la tasa de herbivoría varía de acuerdo a la madurez y estado de las hojas y flores, lo cual está relacionado con el contenido de defensas como los taninos.

De los enemigos de las plantas, los insectos son los que causan mayores daños y son los más numerosos. Se han identificado más de un millón de insectos, de los cuales tres cuartas partes afectan las plantas, atacando sus hojas, flores, raíces, semillas y troncos (Gómez, 2001).

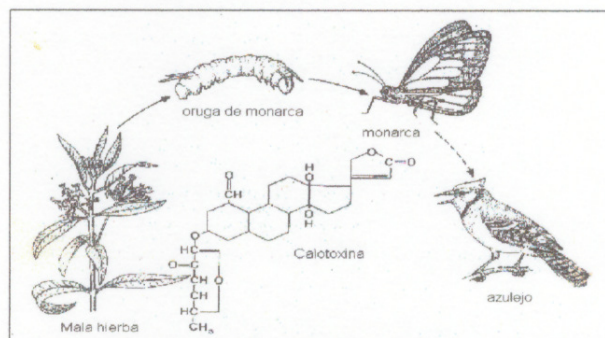


Fig. 5. Interacciones dinámicas de herbivoría entre el algodoncillo (*Asclepias* spp.) y la oruga monarca (tomado de Granados-Sánchez *et al.*, 2008).

Estudios de la herbivoría en las hojas de varias especies de plantas y sus efectos en la biomasa y el crecimiento han sido muy documentados, sin embargo los estudios sobre la florivoría han recibido menor atención. Esto es interesante, teniendo en cuenta

que los daños en las flores u otros tejidos reproductivos tienen un efecto directo en la producción y maduración de gametos (Krupnick & Weis 1999). Además, la florivoría afecta las condiciones de los individuos, poblaciones y comunidades de plantas (McCall & Irwin, 2006).

Las características que distinguen la florivoría de otros tipos de consumo, son tres principales. Primero, la florivoría está asociada con el daño a las estructuras relacionadas con el potencial reproductivo, ya que afectan los pétalos y sépalos, que se requieren en algunos casos, para la atracción de polinizadores. Segundo, la florivoría se asocia generalmente con la eliminación de recursos como néctar y polen. Tercero, la florivoría y la herbivoría a veces puede tener efectos diferentes en la planta y en la dinámica de la población y pueden ser diferencialmente sensibles a los cambios en diferentes etapas de la historia de vida (Breadmore & Kirk 1998).

La cuantificación de la florivoría no es tan sencilla como medir la herbivoría foliar. En primer lugar, porque las flores son a menudo estructuras efímeras que se producen en ciertas temporadas y no se mantienen todo el tiempo, Además, la florivoría en el campo puede ser difícil de evaluar porque las flores a menudo sólo están abiertos durante unos días, y muchas veces sin un registro claro del daño es difícil distinguirla de la senescencia de la flor. En segundo lugar, es difícil separar los efectos de los florívoros y de los antagonistas. Sin embargo, distinguir cuando y qué estructuras son dañadas en una flor es esencial para la comprensión de los efectos de los florívoros en la reproducción de las plantas (McCall & Irwin, 2006).

Dentro de los insectos que se alimentan de flores, existe una gran variedad de estrategias y preferencias alimentarias; algunos se alimentan de polen, otros forman vesículas en las superficies y algunos son generalistas, alimentándose no solo de flores, sino de otros tejidos de las plantas (McCall & Karban, 2006).

4.2.1 Efectos de la herbivoría y florivoría en las plantas

El costo ecológico de la herbivoría es diverso, e influye significativamente en la productividad primaria de los bosques tropicales y en la riqueza y abundancia de especies, en especial aquellas en peligro de extinción, como las orquídeas (Trumble *et al.*, 1993).

Los herbívoros pueden provocar daños en el sistema foliar, reducir la tasa fotosintética y aumentar la pérdida de agua. Estos insectos pueden reducir en un 25 % las tasas de crecimiento y biomasa de las plantas (Ehrlich & Raven, 1964; Feeny, 1976; Rhoades & Cates, 1976; Harper, 1977; Marquis, 1984; Whitman & Mooper, 1985; Trumble *et al.*, 1993).

Las plantas reaccionan a la pérdida de hojas con una explosión de nuevo crecimiento, con un consumo de nutrientes que de otra forma hubieran ido a parar al crecimiento y la reproducción. La defoliación también hace que la planta recurra a defensas químicas, con un costo considerable. Con frecuencia, la extracción de nutrientes y fenoles de las raíces las expone al ataque por parte de los hongos, mientras la planta concentra sus defensas en las partes aéreas. La defoliación severa, y el posterior crecimiento foliar, alteran fisiológicamente a la planta afectada (Sánchez-Ramos, 2002).

Pero si la herbivoría afecta el sistema reproductivo, dañando las flores, esto podría limitar la capacidad reproductiva de la plantas, reduciendo la liberación de polen y afectando la atracción de polinizadores (Jolivet, 1992; Malo *et al.*, 2001; Pellegrino & Mussachio, 2006).

La herbivoría, incluso en la vegetación de un bosque, puede constituir un efecto estimulante, induciendo un aumento de la producción de biomasa, aunque a costa de una pérdida de vigor y de nutrientes almacenados en las raíces. El grado de estimulación depende del tipo de planta, de la disponibilidad de nutrientes y de la humedad (Granados-Sánchez *et al.*, 2008).

4.2.2 Teorías que tratan de explicar la herbivoría y florivoría

Las teorías que explican el mecanismo de defensa de las plantas ante la herbivoría y florivoría son la **Teoría Clásica**, **Teoría de la Apariencia Vegetal** y la **Teoría de la Asignación de los Recursos** (Granados- Sánchez *et al.*, 2008). Las defensas de las plantas incluyen protección mecánica en la superficie de la planta, compuestos polímeros de cristales de sílice que reducen la digestibilidad de los animales y, tóxicos vegetales en muy bajas concentraciones que matan o repelen a herbívoros pequeños (Barbosa & Wagner, 1989).

4.2.2.1. Teoría clásica de la defensa vegetal

La Teoría Clásica predice que taxa relacionados de insectos llegan a “encerrarse” químicamente en un círculo con taxa de plantas relacionadas (Berryman, 1988). Sin

embargo, esta teoría es controversial. Una de las teorías que contradice la teoría clásica, establece que los insectos pierden la capacidad de desintoxicarse a metabolitos secundarios presentes en plantas no relacionadas filogenéticamente. Algunas familias de plantas adquieren una compleja defensa que les permite excluir a los herbívoros especialistas (Granados- Sánchez *et al.*, 2008).

4.2.2.2. Teoría de la apariencia vegetal

Establece que las plantas más abundantes y de vida larga, son fácilmente encontradas (aparentes) por los herbívoros y han evolucionado desarrollando defensas químicas diferentes a las que producen plantas menos abundantes, de corta vida y difíciles de encontrar (no aparentes) para los animales. Esto implica que las plantas aparentes deben invertir más recursos para producir reductores cuantitativos de digestibilidad que les permitan defenderse de los herbívoros; en cambio, las plantas no aparentes pueden escaparse espacial y temporalmente y además producir pequeñas cantidades de toxinas que son efectivas contra los herbívoros especialistas (Baldwin, 1994).

Algunos ejemplos de plantas aparentes son los árboles, arbustos y hierbas perennes de bosques clímax, praderas y sabanas; se piensa que estas plantas usan como defensa hojas pobres en nutrientes, lignificadas, con taninos o silicatos que reducen su valor nutricional para los herbívoros. Por el contrario, plantas no aparentes serían las hierbas de vida corta ubicadas en los primeros estados sucesionales o de praderas recientemente perturbadas; estas plantas no necesitan defensas generalizadas más que

algunas toxinas simples, de efectos más bien cualitativos sobre el metabolismo de los herbívoros, por ejemplo, alcaloides, glucosinolatos y terpenoides que son nocivos a la mayoría de los herbívoros, pero que son fácilmente desintoxicados por los herbívoros especialistas que han evolucionado sistemas apropiados (Whittaker, 1970).

El principio de esta teoría puede ser aplicado a partes específicas de las plantas, por ejemplo, tejidos lignificados u hojas maduras, que se asume tienen defensa permanente, mientras que defensas temporales se dan en tejidos efímeros pero muy importantes como las yemas, primordios o semillas (Granados- Sánchez *et al.*, 2008). En el caso de las flores, McCall & Irwin (2006) señalan que tienden a tener más defensas que las hojas, y que aquellas flores de vida larga por lo general presentan mayores defensas que las de vida corta, debido a que no pueden escapar en espacio y tiempo, como las flores efímeras.

Una limitación de esta teoría es la predicción de los patrones de defensa vegetal, esto debido a que no existe distinción absoluta entre los patrones y tipos de defensa que presentan los diferentes tipos de plantas; es decir, algunas especies leñosas tienen defensas cualitativas (toxinas) además de las ligninas y fenoles reductores de la digestibilidad y algunas hierbas tienen altos niveles de fenoles además de las toxinas (Granados- Sánchez *et al.*, 2008).

4.2.2.3. Teoría de la asignación de recursos

Esta teoría sugiere que la capacidad defensiva de las plantas está en función de su capacidad de reemplazar partes perdidas con los recursos disponibles, más que la

aparición a los herbívoros. A diferencia de la Teoría de la Apariencia, la Teoría de la Disponibilidad de Recursos asume que la fisiología inherente al crecimiento, la capacidad fotosintética y la disponibilidad de nutrientes son los factores que determinan la cantidad y tipos de defensas que las plantas usan (Berryman, 1988).

Cipollini & Levey (1997), establecen que las tres variables básicas que determinan la cantidad y tipos de defensas desarrolladas por las plantas son la tasa intrínseca de crecimiento, la disponibilidad total de recursos y el balance carbono/nitrógeno. Estas tres variables interactúan para determinar si la inversión en defensa será alta o baja, si los elementos de defensa son inmóviles (lignina, taninos) y si son con base en carbono (ligninas, taninos, terpenos) o con base en nitrógeno (alcaloides, cianógenos, aminoácidos no proteínicos).

La tasa intrínseca de crecimiento es un elemento importante en esta teoría, ya que sugiere que las plantas de rápido crecimiento (usualmente árboles y hierbas de estados sucesionales tempranos) invertirán relativamente poco en defensa de cualquier tipo y éstas serán moléculas móviles fácilmente metabolizadas por los herbívoros; estas especies “minimizan” la elaboración de lignina y taninos que podrían inhibir la elaboración de tejidos. Mientras que, las plantas de lento crecimiento invierten más en defensa con polímeros complejos (lignina y taninos) y favorecen el uso de estas defensas inmóviles, las cuales, una vez empleadas son elementos permanentes de las hojas y tallos (Cipollini & Levey, 1997). En el caso, de las flores, las flores que se desarrollan más lento, tienen a tener mayores defensas las flores de rápido desarrollo (McCall & Irwin, 2006).

El costo energético del tipo de defensa difiere en la Teoría de la Apariencia y la Teoría de la Disponibilidad de Recursos ya que la primera asume que las defensas cuantitativas (polímeros en altas concentraciones) tienen costos energéticos más altos que las cualitativas (toxinas). En cambio, la segunda considera que lo anterior no siempre es cierto, pues los polímeros sólo se sintetizan una vez, mientras que las toxinas, aunque son moléculas más pequeñas, se están continuamente sintetizando y destruyendo, por lo que su costo energético a la larga puede ser más alto que los otros (De Moraes *et al.*, 1998).

Las defensas cuantitativas son más ventajosas cuando la limitación de recursos impone una tasa de crecimiento baja a las plantas y cuando los tejidos no requieren ser constantemente reemplazados. En cambio, las defensas cualitativas tienen ventajas para las plantas de rápido crecimiento. Un punto importante de la teoría de la asignación de recursos es que permite explicar los patrones cambiantes de defensas en tejidos jóvenes y maduros, es decir, establece que los tejidos jóvenes de rápido crecimiento usan defensas móviles (cualitativas) y los tejidos maduros requieren las defensas inmóviles (cuantitativas) (Braekman *et al.*, 1998).

En cuanto al papel del balance carbono/nitrógeno, esta teoría predice que el tipo de nutrientes disponibles determina si la defensa será basada en carbono o en nitrógeno. Las plantas que crecen sobre suelos pobres en nitrógeno usarán toxinas basadas en carbón (como terpenoides) como defensas móviles, a diferencia de aquellas que crecen sobre suelos fértiles, que usarán toxinas basadas en nitrógeno (alcaloides). (Braekman *et al.*, 1998).

4.2.3 Defensas en las plantas contra la herbivoría

En la naturaleza, las defensas físicas y químicas parecen tener una función importante al restringir las cualidades gustativas de los insectos (Braekman *et al.*, 1998; Coley, 1981, 1983; Coley *et al.*, 1985; Coley & Aide, 1991; Crankshaw & Langenheim, 1981; Marquis, 1984; Waterman & McKey, 1984; Sánchez-Ramos *et al.*, 2010). Según Gómez (2001), existen diferencias interespecíficas e intraespecíficas en las defensas químicas y físicas de las plantas, ya que los metabolitos secundarios utilizados por las plantas para defenderse varían entre las diferentes especies y entre individuos y se puede producir componentes similares (en diferentes combinaciones y cantidades).

4.2.3.1. Defensas físicas

La primera línea de defensa en las plantas son las defensas físicas, ya que tienden a ser menos costosas energéticamente. Algunas hojas pueden estar cubiertas de vellosidades, pelos glandulares, espinas y escamas, o pueden presentar superficies muy lisas cubiertas de cutícula, o fibras duras en las hojas, las cuales impone restricciones para muchos herbívoros. También algunas ramas, troncos y raíces cubiertas de corteza presentan espinas. Las plantas también desarrollan defensas físicas, como superficies duras y lisas, para defender los órganos reproductivos de las flores. Además, algunas flores presentan tricomas que limitan el acceso a los florívoros a los tejidos reproductivos (Leitao *et al.*, 2005). Algunas defensas físicas pueden estar asociadas a las defensas químicas, lo cual brinda mayor resistencia contra la herbivoría (Gómez, 2001).

4.2.3.2 Defensas químicas (metabolitos secundarios)

Los organismos utilizan las vías metabólicas para vivir, crecer y reproducirse; una de estas vías funciona para modificar y sintetizar carbohidratos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos que son esenciales en todos los organismos y se denomina metabolismo primario y los compuestos involucrados se denominan metabolitos primarios. Mientras que los metabolitos secundarios son compuestos de una distribución más limitada en la naturaleza, que se encuentran en organismos o grupos específicos, y son una expresión de la individualidad de las especies (Dewick, 2002).

Los metabolitos secundarios tienen una gran importancia ecológica porque participan en procesos de adaptación de las plantas, en establecimiento de la simbiosis con otros organismos, en la atracción con compuestos volátiles de insectos polinizadores y dispersores de semillas y frutos, colorantes naturales para advertir o atraer otras especies. Además, participan en la defensa de las plantas cuando son expuestas a: a) consumo de herbivoría; b) ataque de microorganismos como virus, bacterias y hongos; c) competencia por espacio, suelo, luz y nutrientes con otras plantas; y d) estrés hídrico o exceso de luz solar (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003). La mayoría de los compuestos naturales farmacológicamente activos son productos de los metabolitos secundarios (Dewick, 2002).

Se conocen alrededor de 20,000 estructuras de metabolitos secundarios, sin embargo, la variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a partir de una estructura básica, originadas por reacciones químicas de hidroxilación, metilación, epoxidación entre otras (Wink, 1999).

De acuerdo a Sepúlveda Jiménez *et al.* (2003), esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de una planta, lo cual es parte de la estrategia de adaptación y defensa de las plantas (Fig. 6).

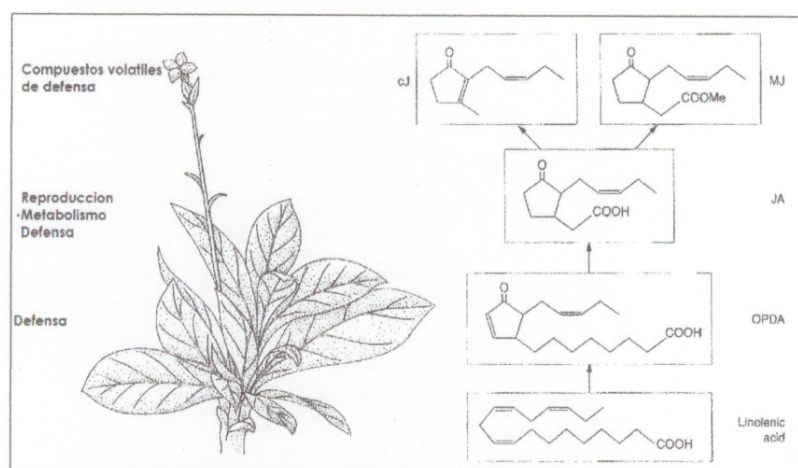


Fig. 6. Perfil metabólico de *Nicotiana attenuata* y las funciones que realizan en la planta (modificado de Liechti & Farmer, 2002).

Las tres principales categorías de metabolitos secundarios de defensa son los fenólicos, los alcaloides, y los terpenos. Compuestos de defensa adicionales incluyen proteínas y aminoácidos tóxicos, inhibidores de proteasas, y compuestos cianogénicos (Sánchez-Ramos *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos incluyen una gran variedad de químicos que consisten de un anillo aromático con un grupo hidroxilo unido, -OH. Estas sustancias reciben también el nombre de polifenoles o fenilpropanoides (Drago Serrano, 2007).

Probablemente los compuestos fenólicos más importantes para la defensa en angiospermas y gimnospermas, son los taninos, los cuales reducen la digestibilidad de los tejidos de las plantas. Otro grupo importante de compuestos fenólicos son las ligninas, las cuales brindan fuerza estructural a la planta y proporcionan una barrera contra el ataque de herbívoros y patógenos. Otros compuestos fenólicos incluyen saponinas venenosas así como flavonoides y antocianinas, pigmentos que dan a las flores y los frutos, sus colores (Baldwin, 1994).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico (Fig. 7). En la ruta del ácido siquímico, a partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Dewick, 2002).

Los alcaloides son otro amplio grupo de compuestos e incluyen muchos que son usados como fármacos. Algunos de estos compuestos son tóxicos para los herbívoros y son altamente específicos para las especies de plantas o grupos de especies en las que se encuentran (Sánchez-Ramos *et al.*, 2010).

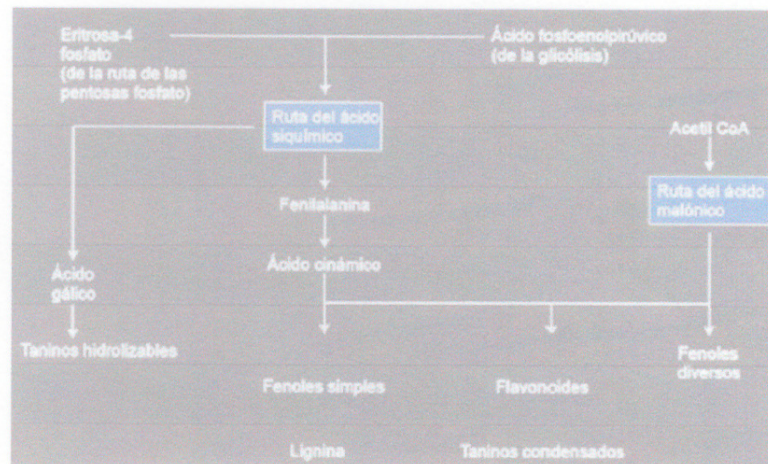


Fig. 7. Ruta biosintética de compuestos fenólicos (modificado de Drago Serrano, 2007).

Los alcaloides se clasifican de acuerdo con el aminoácido que proporciona tanto el átomo de nitrógeno y la porción fundamental del esqueleto de alcaloide. La ornitina da lugar a pirrolidina y alcaloides tropano, lisina a piperidina, quinolizidina y alcaloides indolizidina y ácido nicotínico a la piridina alcaloides. La tirosina produce feniletilaminas y simples alcaloides tetrahydroisoquinolina, también a muchos otros en los que el acoplamiento oxidativo fenólico juega un papel importante, como los modificados benzyltetrahydroisoquinolina, phenethylisoquinolina, terpenoides tetrahydroisoquinolina y alcaloides de Amaryllidaceae. Los alcaloides derivados del triptófano se subdividen en

indol simple, sencilla β -carbolina, terpenoide indol, quinolina, pirroloindol y alcaloides del cornezuelo del centeno. El ácido antranílico actúa como un precursor de la quinazolina, quinolina y alcaloides de acridina, mientras que histidina da derivados de imidazol. Sin embargo, muchos alcaloides no se derivan de un núcleo de aminoácidos, sino que surgen por aminación de otro tipo de sustrato, que puede ser derivados de acetato, derivado de fenilalanina, un terpeno o un esteroide. Los alcaloides de la purina son construidos por las vías que se asemejan a los de las purinas en los ácidos nucleicos (Dewick, 2002).

Los terpenos están en todas las plantas, y un individuo puede contener muchos terpenos diferentes. Estos compuestos juegan una amplia variedad de papeles funcionales en las plantas, ya que puede servir como protección contra el calor, puede ser tóxicos para los herbívoros, responsables de características de aroma y sabor, reducen el crecimiento de las bacterias y de los hongos, imitan las hormonas de los insectos y alteran el desarrollo de la larva del insecto (Barbosa & Wagner, 1989).

Bajo el nombre genérico de terpenos se engloba un gran número de compuestos que comparten un mismo origen biosintético en el mevalonato. Estos compuestos reciben el nombre de terpenos, terpenoides o isoprenoides, y están formados por la condensación de moléculas de isopreno ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$) (Dewik, 2002).

El origen de la biosíntesis de terpenos (Fig. 8) está en el isopentenil pirofosfato (IPP), formado a través del ácido mevalónico, el cual en el Reino Vegetal y microorganismos, comienza la ruta, activándose una de las ramas de la síntesis. Sin embargo recientemente se ha propuesto que algunos terpenoides no se origina por esta

ruta, sino por una ruta alternativa que puede involucrar piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Roberts, 2007). Dos moléculas de isopentenil pirofosfato se condensan en el geranil pirofosfato (GPP), precursor inmediato de los monoterpenos. El geranil pirofosfato se une a otra molécula de isopentenil, para dar lugar al farnesil pirofosfato (FPP), origen de los sesquiterpenos, que al condensarse con una nueva unidad molecular de isopentenil pirofosfato, origina el geranilgeranil pirofosfato (GGPP), cuya ciclación proporciona el esqueleto diterpenoide. Diferentes combinaciones de estas unidades C5, C10 y C15 dan lugar a los terpenoides de mayor peso molecular, siendo formados los sesterpenos a partir del geranilfarnesilpirofosfato (GFPP), los triterpenos a partir de 2 unidades de farnesil, tetraterpenos y carotenoides por condensación de dos unidades de geranilgeranil, finalizando en el poliprenilpirofosfato (PPP) que da lugar a los poliprenoles y politerpenos (Dewik, 2002).

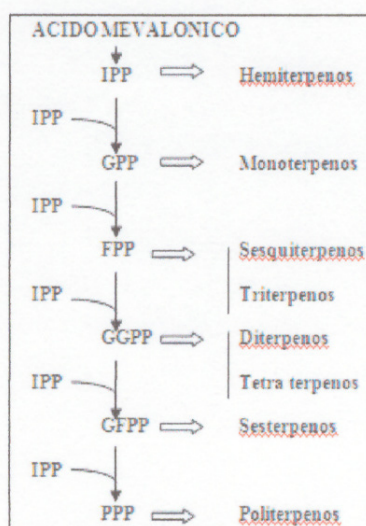


Fig. 8. Ruta biosintética de compuestos terpénicos (modificado de Drago Serrano, 2007).

4.2.4 Importancia de los estudios de herbivoría

Las plantas presentan complicados mecanismos bioquímicos para protegerse e inmunizarse frente a los ataques de los herbívoros. El entender estos mecanismos, ha permitido a los científicos generar métodos de mitigación de plagas en cultivos agrícolas y ornamentales. Los avances en estas investigaciones han permitido generar: plantas genéticamente mejoradas y resistentes, la utilización de sustancias como las feromonas para el control biológico de plagas y el cultivo de plantas “trampa” que atraen a insectos dañinos y los mantienen alejados de los cultivos principales (Gómez, 2001). Estas plantas “trampa” puede reducir los daños a las cosechas y plantas ornamentales, sin tener que recurrir a plaguicidas y pueden ser plantados en el perímetro del terreno cuyo cultivo se trata de proteger o en forma intercalada; un ejemplo de estas planta “trampa” son los geranios *Pelargonium* plantados cerca de los rosales para protegerlos del escarabajo japonés y la Fabaceae *Sesbania* que atrae a las chinches hediondas para desviar la atención de cultivos (Finch & Collier, 2003).

Los compuestos que las plantas utilizan para defenderse pueden ser evaluados para detectar sustancias promisorias para la fitoquímica y farmacología, y así contar con criterios más poderosos para seleccionar sustancias potencialmente útiles. Además, la diversidad fitoquímica de las plantas puede tener efectos diversos en los herbívoros, desde sustancias insecticida hasta repelente o incluso atrayente o distractores; esto es muy interesante desde el punto de vista biológico y acarrea consecuencias económicas importantes (Vivanco *et al.*, 2004).

En el contexto ecológico, el estudio de la herbivoría nos permite entender las interrelaciones que existen entre los seres vivos, desde un punto de vista evolutivo y fisiológico. Además, el estudio de la herbivoría nos permite entender la importancia de los metabolitos secundarios en los procesos de adaptación de las plantas, en la competencia con herbívoros y otras plantas, en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos, en la resistencia frente al estrés por factores abióticos, en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas y frutos (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003).

4.2.5 Estudios de herbivoría en orquídeas

Recientes estudios han determinado la importancia de los estudios fitoquímicos y de bioprospección en esta familia (Pérez Gutiérrez, 2010), lo que permitirá la identificación de compuestos involucrados en las interacciones entre las orquídeas y diversos organismos. Diversos estudios se han realizado sobre los daños que presentan las especies de orquídeas cultivadas (Chacón, 2002; Corrales & Rivera, 2003; Kitajima *et al.*, 2005; Tremblay, 2006; Suárez & Mora, 2007; Salazar *et al.*, 2008). Por el contrario, en orquídeas creciendo en condiciones silvestres, se ha dado más énfasis a las interrelaciones simbióticas de las plantas epífitas (Benzing, 1990) y la información sobre los daños, enfermedades y organismos fitófagos es limitado (Walter, 1983; Benzing, 1990; Janzen & Hallwachs, 1999; Chacón, 2002; Rivera & Corrales, 2007; Salazar *et al.*, 2007 y 2008).

Uno de los mayores retos para el estudio de la herbivoría en plantas como las orquídeas, es tratar de entender cómo algunas especies e individuos son poco atacados, y por qué algunos individuos sobreviven sin daños mientras sus vecinos sufren herbivoría. Esto está relacionado con la facilidad con la que estas plantas son localizadas por los herbívoros, la inversión y disponibilidad de recursos para producir defensas, y el tipo de defensa que se produce ante un determinado herbívoro (Granados- Sánchez *et al.*, 2008). Así, diversas especies de orquídeas, a pesar de estar relacionadas filogenéticamente y presentar características físicas similares, pueden presentar respuestas diferentes ante un determinado herbívoro como por ejemplo, la hormiga *Acromyrmex coronatus*, una especie de hormiga cortadora ampliamente distribuida en las zonas forestales y de montañas (Wetterer, 1995).

En la naturaleza las diversas interacciones ecológicas entre orquídeas e insectos son mediadas por señales de forma, color, textura, estructura, néctar y los aromas florales, que son utilizados para su defensa y reproducción (Dressler, 1990). Además, la historia de vida de las plantas puede ser afectada por factores bióticos, como la herbivoría (Reichman & Smith, 1991) y por algunos factores abióticos (disponibilidad de nutrientes y agua), lo que repercute en la sobrevivencia y futura reproducción (Reznick, 1985).

El estudio de la herbivoría en plantas como las orquídeas es importante porque la pérdida de área en las hojas remueve tejidos fotosintéticos activos, decreciendo la energía para el crecimiento, floración y producción de frutos. Un decrecimiento del área fotosintética, limita la producción de sucesos reproductivos, producción de polen, producción de flores y semillas, e indirectamente en atracción de polinizadores (Nuñez-

Frafan & Dirzo, 1994; Meyer, 1998; Strauss *et al.*, 1996; Pellegrino *et al.*, 2005). Además, para la familia Orchidaceae la reproducción sexual está determinada por la limitación de polinizadores efectivos y/o limitación de recursos (Stephenson, 1981), por lo que el daño en las flores puede representar un problema para estas plantas, ya que alrededor del 50 % de sus especies presentan pocos polinizadores y en muchos casos son específicos para cada especie de orquídea (Dodson, 1975). También, se ha observado que la herbivoría puede afectar la floración de las orquídeas en los siguientes años (Vallius & Salonen, 2000).

En general, las plantas pueden presentar adaptaciones o defensas físicas y químicas para defenderse de los insectos. Esto también ocurre en las orquídeas, donde características físicas como las hojas duras, fibrosas y coriáceas que presentan algunas especies como las del género *Epidendrum* se pueden considerar como la primera línea de defensa (Hammel *et al.*, 2003).

Estudios previos de la herbivoría en orquídeas, han demostrado que existen compuestos que sirven de defensa como algunos alcaloides y terpenos (Wilson *et al.*, 1999), sin embargo existe poca información sobre la mayoría de los compuestos presentes en estas especies, sobre todo las de zonas tropicales y que podrían tener importancia farmacológica y biotecnológica. Un ejemplo de esto, es el estudio de Bolser *et al.* (1998) donde realizaron investigaciones con la orquídea acuática *Habenaria repens* Nutt. y otras macrófitas acuáticas, para determinar las defensas que presentan estas plantas ante el ataque de cangrejos. Sus resultados mostraron que la orquídea *H. repens* tenía baja depredación en comparación con las otras plantas y al hacer el análisis

químico, lograron aislar un nuevo compuesto de defensa química llamado *habenariol* (Wilson *et al.*, 1999). El *habenariol* además de ser utilizado por la planta como defensa química, también ha mostrado ser un antioxidante fenólico con aplicaciones farmacológicas (Fig. 9) (Johnson *et al.*, 1999).

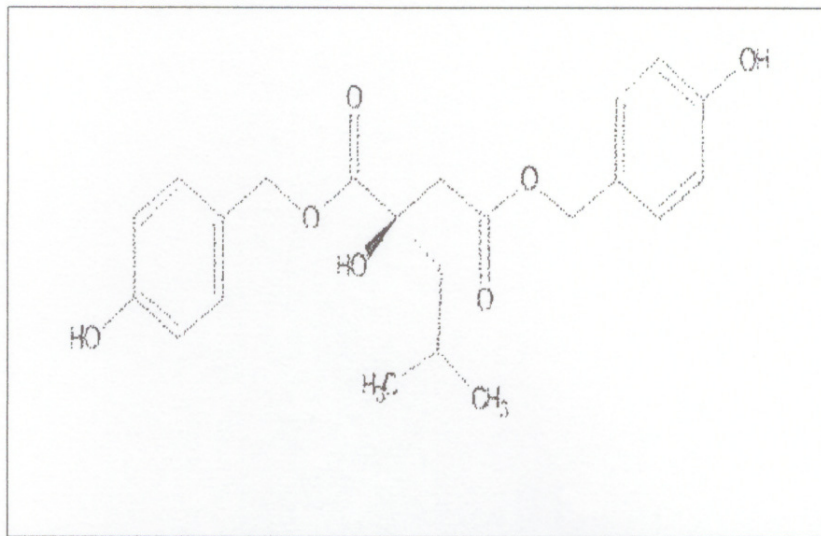


Fig. 9. Estructura química del habenariol, compuesto químico de *Habenaria repens* contra la herbivoría de cangrejos (Johnson *et al.*, 1999).

Estudios sobre la herbivoría en la familia Orchidaceae han demostrado que existe poca preferencia de los herbívoros hacia las hojas y otras partes vegetativas. Sin embargo aunque se han registrado bajos índices de herbivoría en esta familia (Whigham, 1990; Sterck *et al.*, 1992; Lowman *et al.*, 1996; Vallius & Salonen, 2000; Malo *et al.*, 2001; Schmidt & Zotz, 2002; Pellegrino & Musacchio, 2006), los estudios sobre las defensas

físicas y químicas, y las diferencias en la herbivoría entre especies e individuos han recibido muy poca atención (Winkler *et al.*, 2005).

En base a lo expuesto anteriormente, se puede suponer que el daño por herbivoría en dos especies de orquídeas, *E. exasperatum* y *E. vespa*, presenta diferencias de acuerdo al órgano de la planta y a la estacionalidad. Estas diferencias están relacionadas con variaciones en las características fitoquímicas presentes en las hojas y flores, y que determinan la preferencia de los herbívoros hacia las plantas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realizó en la Reserva Forestal Fortuna (RFF) que tiene una extensión de 19,500 hectáreas, adyacente al Bosque Protector Palo Seco, constituidos por bosques nubosos de montaña (Bosque Pluvial Premontano y Bosque Pluvial Montano Bajo).

La RFF tiene una precipitación promedio superior a 4,000 mm/año y una temperatura media de 20° C, debido a los efectos de sotavento y a la cortina de precipitación formada por las altas montañas de la Cordillera Central. El suelo es de origen volcánico y rico en materia orgánica (Andersen *et al.*, 2009).

Para la medición de la herbivoría y colecta de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, se establecieron tres sitios de muestreo, específicamente a partir de 2 m de la orilla de la carretera (Fig. 10): Sitio A 8°42' 35.6" N y 82°13' 56.4" W (1,150 m.s.n.m.), Sitio B 8°43' 42.4" N y 82°14' 16.6" W (1,270 m.s.n.m.), y Sitio C en entrada a parcela Honda 8°45' 00.8" N y 82°14' 20.2" W (1,220 m.s.n.m.).

5.2 ESPECIES SELECCIONADAS (modificado de Hammel, 2003; Correa *et al.*, 2004)

La Familia Orchidaceae se divide en cinco subfamilias, y una de las más diversas es la Subfamilia Epidendroideae ya que comprende cerca de 90% de las especies de las orquídeas neotropicales. En este estudio se seleccionaron dos especies dentro de la

Subfamilia Epidendroideae, Tribu Epidendreae, Subtribu Laeliinae. Estas dos especies, *Epidendrum exasperatum* y *Encyclia vespa* son abundantes en la Reserva Forestal Fortuna, donde se encuentran principalmente en bordes de caminos y paredones.

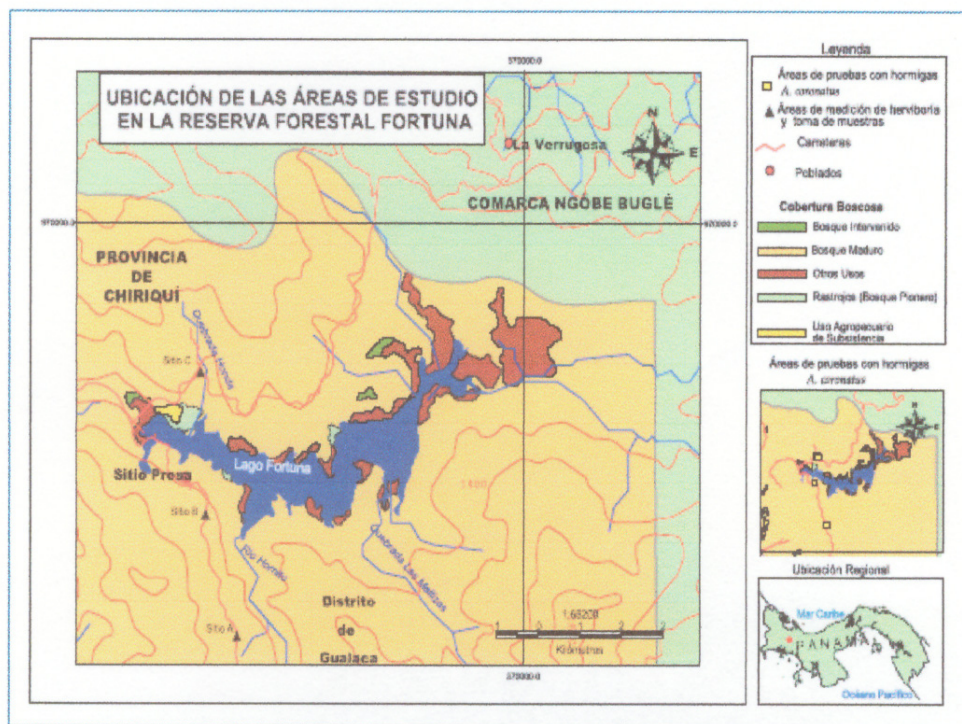


Fig. 10. Mapa de las áreas seleccionadas para el estudio (gvSIG 1.10).

La selección de estas dos especies de orquídeas para el estudio se debió a tres razones principales:

- ❖ En visitas de campo, previas al estudio, se observaron diferencias en la herbivoría de estas dos especies, a pesar de que crecen en sitios muy cercanos.
- ❖ La literatura señala la importancia del género *Epidendrum* y *Encyclia* en diversos estudios de bioprospección, en donde se han detectado varios metabolitos secundarios y compuestos de importancia farmacológica y fitoquímico. Algunos de estos compuestos

como fenantrenos y derivados bibenzil, son utilizados en bioprospección por tener efectos alelopáticos sobre malezas.

❖ Son un grupo relativamente abundante de orquídeas en la Reserva Forestal Fortuna, lo que permite estudiar el mecanismo de herbivoría en condiciones naturales y con poca intervención antropogénica.

Descripción de las especies de estudio:

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Asparagales

Familia: Orchidaceae

Subfamilia: Orchidoideae

Tribu: Epidendreae

Subtribu: Laeliinae

***Epidendrum exasperatum* Rchb.f**

Sin. *Oerstedella exasperata* (Rchb. f.) Hágsater

Planta terrestre, cespitosa de 200 cm. Hojas de 9.5 x 3.4 cm., angostamente elípticas, bilobadas, vainas lisas, solamente con puntos pardos cuando jóvenes. Inflorescencia terminal, racemosa de 12 cm. de largo. Flores fragantes 15, sépalos y pétalos pardos a verdosos con márgenes amarillentos, el labelo y columna blancos, el

disco frecuentemente lila alrededor del callo; sépalos 12 x 7 mm; pétalos 13 x 5 mm, elípticos; labelo 12x 12 mm, 4 lobulado, bicalloso, con una carina central prominente, lóbulos subiguales; columna recta de 8 mm y el clinadrio 4-lobulado (Fig. 11).

Distribuida en Costa Rica y Panamá. Se encuentra en bosque muy húmedo, pluvial, nuboso, robledales, potreros y taludes; en Panamá se distribuye de 0-3,000 m.s.n.m. en Coclé y Chiriquí. Florece de Enero- Diciembre, sin embargo en la Reserva Forestal Fortuna su floración va de Junio a Agosto.

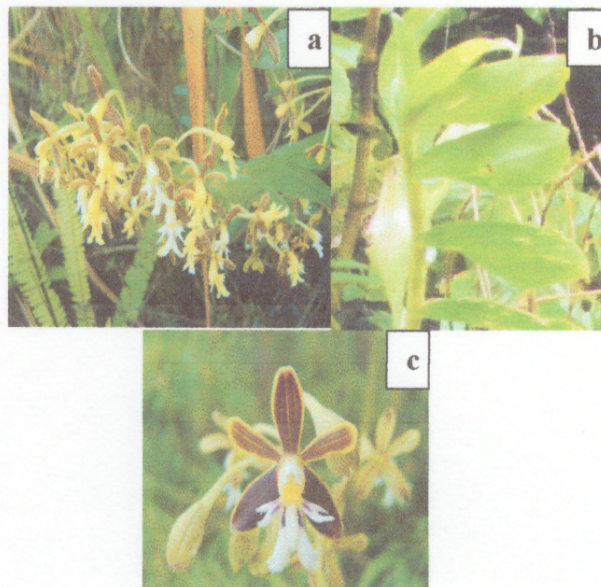


Fig. 11. Características morfológicas de *E. exasperatum* en la Reserva Forestal Fortuna (a=hábito de crecimiento, b= hojas, c= flores).

***Encyclia vespa* (Vell.) Dressler**

Sin. *Prostechea vespa* (Vell.) W.E. Higgins

Planta epífita, ocasionalmente terrestre, de 80 cm. Pseudobulbos 15-40 cm. x 1-2 cm. subcilíndricos, delgados. Hojas 2-4, frecuentemente separadas por entrenudos de

hasta 2 cm., elípticas, de 18.72 x 4.01 cm. Inflorescencia simple de 10 cm. de largo. Flores verdosas amarillentas, no resupinadas, sépalos y pétalos manchados con morado, labelo crema; sépalos 9-13.5 mm. x 4-6.5 mm., ovados; pétalos cueado - oblanceolados; labelo 7-8 mm. x 4.5-6 mm. subróbico aovado, suculento; columna gruesa, solo ligeramente más corta que el labelo (Fig. 12).

Distribuida en Nicaragua hasta Brasil y en las Antillas. Se encuentra en bosque muy húmedo, pluvial y nuboso; en Panamá se distribuye de 0-2,000 m.s.n.m. en Coclé, Chiriquí, Panamá y Veraguas. Florece de Enero- Agosto, Octubre y Diciembre.

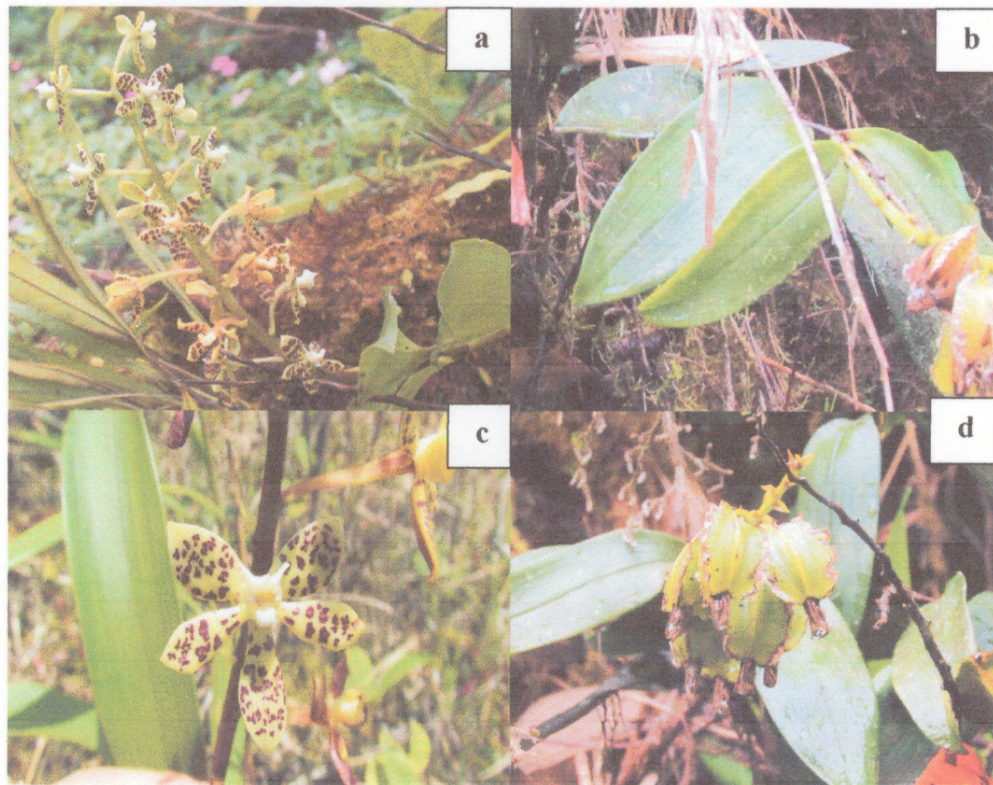


Fig. 12. Características morfológicas de *E. vespa* en la Reserva Forestal Fortuna (a= hábito de crecimiento, b= hojas, c= flores, d=cápsulas).

5. 3. MEDICIÓN DE LA HERBIVORÍA EN HOJAS Y FLORES

5.3.1 Herbivoría en hojas

Los datos de herbivoría fueron registrados durante un periodo de seis meses y consistió en una visita por mes en los tres sitios de muestreo establecidos (Fig. 10):

- 1) Octubre y Noviembre de 2011
- 2) Enero y Febrero de 2012
- 3) Abril y Mayo de 2012

Para la determinación de los porcentajes de herbivoría en hojas, se utilizó la metodología modificada de Pellegrino & Musacchio (2006). En cada muestreo se seleccionaron y evaluaron seis plantas de cada especie de orquídea. En cada planta se seleccionaron al azar diez hojas desde el ápice de la rama hacia la base (6 plantas × 10 hojas × 6 meses × 3 transectos; n = 1800 mediciones). Se midieron la longitud, el ancho y el daño foliar de cada hoja en centímetros, con la ayuda de una página milimetrada.

Con los datos obtenidos se determinó el área foliar (largo x ancho) y en base a esto, se calculó el porcentaje de herbivoría en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*. El daño en hojas causado por insectos fue diagnosticado por observación de las cicatrices o marcas (Dirzo, 1987; Sánchez-Ramos *et al.*, 1999; Sánchez-Ramos & Reyes-Castillo, 2006).

Para realizar los análisis de la herbivoría en hojas, se determinó la herbivoría total en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* y la herbivoría por cada mes de muestreo. Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) con el programa

SPSS 16.0, para determinar diferencias estadísticas en los porcentajes de herbivoría entre las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*.

5.3.2 Herbivoría en flores o Florivoría

Los datos de herbivoría en flores, se registraron durante los meses de floración de ambas especies de orquídeas (Julio y Agosto de 2012). Se seleccionaron diez plantas de cada especie en cada transecto, de cada planta se seleccionaron aleatoriamente diez flores, marcadas con cinta fluorescente (10 plantas × 10 flores × 2 meses × 3 transectos; n = 600 mediciones). Después de marcar las flores, se estimó la florivoría usando las categorías de daño (Cuadro II); además se registró con fotografías, el daño en cada categoría y en cada especie (Fig. 13).

CUADRO II. CATEGORÍAS DE DAÑO Y LAS CARACTERÍSTICAS ESTABLECIDOS PARA LA MEDICIÓN DE LA FLORIVORÍA (modificado de Malo *et al.*, 2001).

Categorías	Características
0	Ausencia de daño
1	Daño en raquis de la flor
2	Daño parcial en pétalos y sépalos
3	Pérdida total de pétalos y sépalos
4	Daño en estructuras críticas de reproducción

Para realizar los análisis de la herbivoría en flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, se determinó el número de flores con daño en cada especie y por mes de muestreo. También se estableció el promedio de flores que presentaba daños para cada categoría establecida (Cuadro). Adicionalmente se realizó un Análisis de Varianza de dos vías (ANOVA) con el programa SPSS 16.0, para determinar diferencias estadísticas en el daño entre las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*.

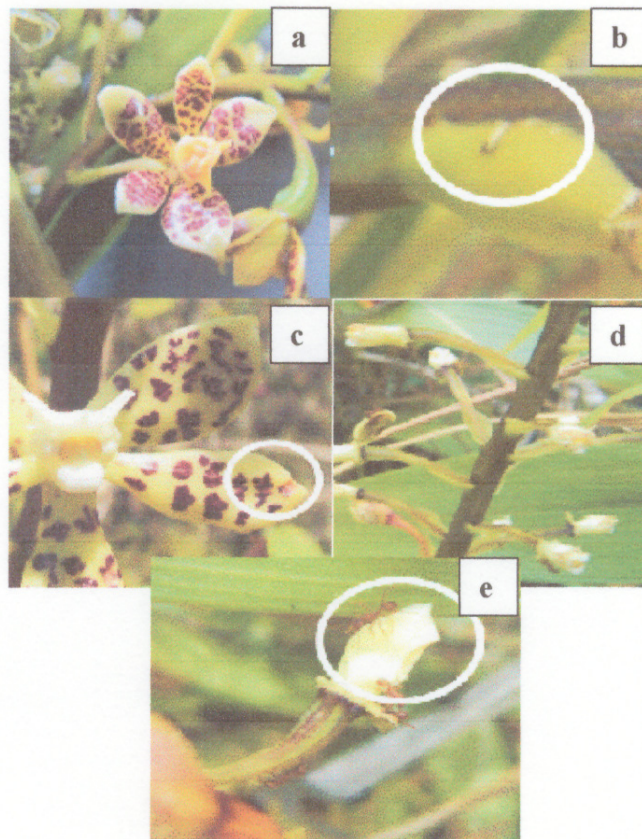


Fig. 13. Identificación de las categorías de daño en las flores de *E. vespa* (a= ausencia de daño, b= daño en raquis, c= daños parciales en pétalos, d= pérdida total de pétalos y sépalos, e= daño en columna).

5.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS HOJAS Y FLORES

5.4.1 Selección y colección del material vegetal

Debido a las restricciones legales que existen para la colecta del material vegetal y para evitar la extracción masiva de hojas y flores de estas especies, se optó por obtener las muestras en diversas áreas dentro de la Reserva Forestal Fortuna, procurando que no existirá mucha variación en la altura de los lugares de colecta. Para la extracción se colectaron aproximadamente 500 g de cada muestra de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (4 muestras).

5.4.2 Extracción de muestras

Para la extracción se utilizaron tres disolventes por separado: etanol, hexano y metanol (dos réplicas por disolvente). Las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* fueron lavadas con agua destilada y con cada disolvente, luego se colocaron aproximadamente 100 g de cada muestra fresca en envases de vidrio, luego se les agregó aproximadamente 100 mL de etanol, hexano y metanol respectivamente; estos envases fueron cubiertos con papel aluminio y colocados en oscuridad durante ocho días (se agitaban diariamente por 15 minutos).

Luego de los ocho días se decantaba el extracto y se concentraba en el Rotavapor modelo R 210 (a 45 ° C y 56 bar), del CIPNABIOT (Centro de Investigaciones de Productos Naturales y Biotecnología) de la Universidad Autónoma de Chiriquí. El concentrado resultante fue pesado en una balanza de precisión KERN EW 600-2M (d=0.01; e= 0.1 g) y depositado en viales de vidrio y bajo refrigeración.

5.4.3 Determinación de porcentajes de rendimiento y porcentaje de humedad

Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento nos indica la eficiencia del método de extracción y de los solventes utilizados para obtener el concentrado de interés (Batanero & Medel, 1985). Se calcularon los porcentajes de rendimiento de los extractos etanólicos, metanólicos y en hexano de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (por duplicado), en base a la siguiente fórmula (AOAC, 1998):

$$\% \text{ de rendimiento: } \frac{\text{peso de la muestra después de concentrar en rotavapor (g)} * 100}{\text{peso de la muestra fresca (g)}}$$

Porcentaje de humedad

Es el contenido de agua presente en una muestra. Para determinar el porcentaje de agua, se colectaron aproximadamente 30 g de hojas y flores adicionales de *E. exasperatum* y *E. vespa* (por triplicado) fueron pesadas en fresco y se secaron a 45 ° C por 24 horas en un horno SELECTA DIGITRONIC, luego se pesaron en una balanza de precisión KERN EW 600-2M (d=0.01; e= 0.1 g) y se calculó el porcentaje de agua de cada muestra. Para el cálculo del porcentaje de agua se utilizó la siguiente fórmula (AOAC, 1998):

$$\% \text{ de humedad: } \frac{\text{peso de la muestra después de calentar en horno (g)} * 100}{\text{peso de la muestra fresca (g)}}$$

5.4.4 Determinación de porcentaje de cenizas

Es la cantidad de materia mineral presente en la muestra. Se colectaron aproximadamente 35 g de muestras frescas de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (por triplicado) y se colocaron en bolsas de papel. Posteriormente las bolsas con las muestras fueron colocadas en un horno Selecta Digitronic a una temperatura de 45 ° C por 24 horas, para luego macerarlas.

Se colocaron los crisoles en el horno a 105 ° C por dos horas. Se colocan en el desecador hasta temperatura ambiente y se pesan. Luego se pesaron las muestras secas y molidas por triplicado en el crisol tarado y se colocaron en la mufla Vulcano a 600 ° C durante cuatro horas. Se colocaron los crisoles en el desecador a temperatura ambiente para después pesarlos con la balanza analítica KERN EW 600-2M (d=0.01; e= 0.1 g). Para calcular el porcentaje de cenizas se utilizó la siguiente fórmula (AOAC, 1998):

$$\% \text{ de cenizas: } \frac{\text{peso de cenizas (g)} * 100}{\text{peso de la muestra fresca (g)}}$$

5.4.5 Análisis de nutrientes

Adicionalmente, se colectaron 100 g de cada muestra: hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* y posteriormente fueron secadas a 105 ° C en un horno Selecta Digitronic. Las cenizas obtenidas fueron pesadas en una balanza analítica KERN EW (d=0.01, e= 0.1 g.) para un análisis de nutrientes de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* en el laboratorio de suelos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP). El análisis se realizó con una digestión ácida y luego se analiza cada

macro y micronutriente de interés. Se analizan los nutrientes mediante lectura con Espectrofotometría de Absorción Atómica.

5.4.6 Análisis de pH

Se realizó la calibración del equipo por medio de los buffer adecuados (ph 4, ph 7, ph 10), posteriormente se determinó el pH de los extractos etanólicos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* con un potenciómetro Ph 1100 Series Oaklon.

5.4.7 Determinación de metabolitos secundarios

5.4.7.1 Cromatografía en placa fina

Se prepararon placas de sílica gel de cromatografía donde se marcó una línea a 1 cm. de la base. En cada placa, sobre esta línea se marcaron puntos, donde se depositaron con capilares pequeñas cantidades de los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (en cada disolvente: etanol, metanol y hexano), en el siguiente orden: **hoja *E. vespa*- hoja *E. exasperatum*- flor *E. vespa*-flor *E. exasperatum*.**

Se utilizó un eluyente de mezcla de acetato de etilo (polar) y hexano (apolar) (2:8), para identificar la polaridad de los compuestos presentes en cada extracto. Posteriormente las placas fueron colocadas en el disolvente por 30 minutos, se retiraron de la cámara y se dejaron secar y se marcó la distancia recorrida por el disolvente.

Las placas se colocaron en una lámpara de rayos UV y las marcas que aparecieron se señalaron con lápiz. Posteriormente se identificaron los factores de retención (Rf) de cada marca señalada.

Para el cálculo de los factores de retención se evaluaron las placas con los extractos etanólicos y se utilizó la siguiente expresión (Ault, 1998):

$$R_f = \text{Distancia recorrida por el compuesto} / \text{distancia recorrida por el disolvente}$$

Se tomará como distancia del compuesto la distancia comprendida entre la línea trazada donde se ha depositado el compuesto y el centro de la mancha.

5.4.7.2. Tamizaje fitoquímico

Con los extractos de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (etanólico, metanólico y en hexano), se realizó un tamizaje fitoquímico preliminar basado en la propuesta de Domínguez (1978), Bilbao (1997) y Marcano (2002). Para ello, cada extracto se colocó en tubos de ensayo y se les realizó una serie de pruebas con reactivos indicadores para identificar grupos funcionales (taninos, terpenos, fenoles, saponinas, alcaloides, cumarinas y glucósidos).

a) Identificación de flavonoides

Prueba de NaOH

Se agregó unas gotas de NaOH diluido en tubos de ensayo con los extractos. La aparición de colores amarillo a naranja se considera positiva.

Prueba de Pew's

Se agregó polvo de zinc y unas gotas de HCl 5 N. en tubos de ensayos con los extractos. Los dihidroflavonoles reaccionan con colores del rojo púrpura al rojo cereza. Las flavononas, dihidrocharconas u otros flavonoides dan coloración rosa a café.

Prueba de Shinoda

En tubos de ensayo con los extractos se adicionó trozos de viruta de magnesio y unas gotas de HCl concentrado. La aparición de colores que van del rojo profundo al magenta indica la presencia de una flavona o dihidroflavonol. Las dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan.

b) Identificación de terpenos/esteroides: (Reacción de Salkowski)

Los extractos se mezclaron con 1 ml de cloroformo, y se dejaron deslizar por las paredes del tubo de ensayo con 1ml de ácido sulfúrico 85%. La formación de colores amarillo a rojo se considera positivo.

c) Identificación de triterpenos

Prueba de triterpenos

Se disolvió una porción de cada extracto en 1 ml de cloroformo. Se agregó por las paredes del tubo 1 ml de anhídrido acético y se dejó reposar en frío. Se añadieron una a dos gotas de H₂SO₄ concentrado por las paredes. La aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase cuando se agrega el H₂SO₄, se considera positivo.

Prueba de Lieberman-Buchard

Se agregó unas gotas del reactivo Lieberman-Buchard a los tubos de ensayo con los extractos de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*. La coloración azul o verde indica la presencia de esteroides, colores del rojo al violeta indica la presencia de triterpenos y el color amarillo pálido indica esteroides y triterpenos saturados.

d) Identificación de alcaloides

Prueba de Mayer

Una porción de cada extracto se disolvió en HCl. Luego se le agregó el reactivo de Mayer. Se considera positiva la prueba en la que aparece un precipitado.

Prueba de Dragendorff

Una porción de cada extracto se disolvió en HCl. Luego se le agregó el reactivo de Dragendorff. Se considera positiva la prueba en la que aparece un precipitado.

Prueba de Wagner

Una porción de cada extracto se disolvió en HCl. Luego se le agregó el reactivo de Wagner. Se considera positiva la prueba en la que aparece un precipitado.

e) Identificación de taninos

Prueba de la gelatina-sal

Se utilizaron dos tubos de ensayo, en cada uno se agregó 0.5 ml de cada extracto a evaluar y luego se le adicionó 1 ml del reactivo de gelatina-sal (solución de gelatina al 1% en NaCl al 10 %). La formación de un precipitado se considera positiva. Si hay formación de precipitado se adicionó 0.5 ml de urea 10 M y dos a tres gotas de cloruro férrico. Coloración del precipitado verde confirma la presencia de taninos condensados, mientras que coloraciones azules confirma la presencia de taninos hidrolizables.

Prueba de FeCl₃

A cada extracto en un tubo de ensayo se le adicionó 1 ml de FeCl₃. La aparición de un precipitado se considera positiva.

Los taninos condensados dan un precipitado de color pardo- verdoso, mientras que los hidrolizables son de color azul-negrucza.

f) Identificación de cumarinas (Prueba de cumarinas)

Se calentó cada extracto en un tubo de ensayo tapado con papel filtro e impregnado de una solución alcalina. Si el papel filtro exhibe puntos fluorescentes bajo luz UV se considera positiva.

g) Identificación de saponinas

Ensayo de agua caliente

Una porción de cada extracto se disolvió con agua caliente durante 15 a 30 minutos, luego se agitó durante 3 a 5 minutos.

La formación de espuma en forma de panal de abeja, estable por 30 minutos se considera positiva.

Prueba de Rosenthaler

A 1 ml de cada extracto se le añade una gota del reactivo de Rosenthaler y una gota de H₂SO₄ concentrado. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan color violeta.

h) Identificación de glucósidos cardiotónicos y lactosas sequiterpénicas (Prueba de Baljet)

A 2 ml de cada extracto se le adicionó tres a cuatro gotas del reactivo de Baljet. Si se forma una coloración naranja a rojo oscura se considera positiva.

i) Identificación de grupos 5-hidroxi flavonas (Prueba de Dimroth)

Se le adicionó a los extractos en tubos de ensayo el reactivo de Dimroth en una proporción 1:1. Se considera positiva la prueba la presencia de una coloración naranja o roja.

Con los resultados obtenidos en cada prueba se realizó un cuadro, señalando las respuestas y la intensidad de cada reacción.

5.4.7.3 Pruebas espectroscópicas

Se realizaron lecturas de los extractos etanólicos de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* en el espectrofotómetro ultravioleta visible (modelo UV-UIS Dual Bean UVS-2800). Adicionalmente se realizaron análisis en el Espectrofotómetro Infrarrojo IRAffinity-1 FTIR-8400S utilizando los extractos de las hojas y flores en cada disolvente. Las lecturas en el Espectrofotómetro Infrarrojo se realizaron con el Software IR Solution.

5.5 EVALUACION DE LA PREFERENCIA DE HERBIVOROS POR HOJAS Y FLORES

Con el fin de evaluar la actividad de los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* sobre un herbívoro, se seleccionó como modelo de estudio la especie de hormiga cortadoras de hojas *Acromyrmex coronatus*. Esta especie fue observada en varias áreas dentro de la Reserva Forestal Fortuna.

***Acromyrmex coronatus* Fabricius**

Reino: Animalia

Phylum: *Arthropoda*

Clase: Insecta

Orden: Hymenoptera

Familia: Formicidae

Subfamilia: Myrmicinae

Tribu: Attini

Descripción:

Especie de hormiga cortadora de hojas que se encuentran en montañas y hábitats forestales, pero no en las tierras bajas. Recolectores relativamente pequeños (masa media = $3,4 \pm 1,4$ mg) que cortan casi exclusivamente las hojas finas, suaves y otras partes de plantas herbáceas pequeñas (Fig. 14). Establecen caminos y los mantienen despejados para acceder a su alimento y transportarlo. Su alimentación es continua por la noche, pero diurna sólo cuando ha habido lluvias recientes (Wetterer 1995). Son herbívoros polípagos que cortan vegetales en pequeños fragmentos, que luego son transportados al nido para ser utilizados como sustrato para su hongo simbionte (Hölldobler & Wilson, 1990).

Se realizaron cuatro visitas al área de estudio, donde se seleccionaron 5 nidos de *Acromyrmex coronatus*, separados unos de otros para evitar la competencia. Además se consideró que los nidos estuvieran a una distancia mínima de 10 m de la carretera, en condiciones ecológicas similares y que fueran accesibles.

Los sitios donde se realizaron las pruebas con las hormigas fueron (Fig. 10): **A)** entrada a parcela Honda 8°42' 35.6" N y 82°13' 56.4" W, **B)** antes de sitio presa 8°44' 58.2" N y 82°14' 17.1" W , **C)** después de sitio presa 8°45' 00.8" N y 82° 14' 20.2" W, **D)** 8°44' 03.71" N y 82° 14' 25.37" W y **E)** 8°44' 58.1" N y 82° 14' 16.3" W.



Fig. 14. Imagen de la especie *A. coronatus*, hormiga de la tribu Attini.

Se realizaron dos tipos de bioensayos en cada muestreo y en cada nido:

- ❖ El primero consistió en establecer un cuadrante de 1 x 1 m, donde se colocaron en caminos cercanos a los nidos, pedazos pequeños de algodón impregnados con los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* en los tres disolventes (etanol, metanol y hexano), luego se registró en un período de 30 minutos la actividad de las hormigas ante los extractos (selección por las hormigas y tiempo de

selección). Adicionalmente se les colocó algodones con los disolventes puros (etanol, metanol y hexano) utilizados en la extracción, como grupo control.

- ❖ En el segundo bioensayo, porciones pequeñas de las hojas de ambas especies de orquídeas, fueron cortadas y aplicadas directamente en el cuadrante 1 x 1 m. Se registró en un período de 30 minutos la actividad de las hormigas ante las porciones de las hojas (selección por las hormigas y tiempo de selección).

Se analizaron los resultados de las pruebas para determinar el promedio de hormigas que visitaba para cada extracto (hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*), adicional se registró el tiempo de reacción. Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) con el programa SPSS 16.0, para establecer si había diferencias significativas en la reacción ante una determinada muestra.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 HERBIVORÍA EN HOJAS Y FLORES

6.1.1 Herbivoría en hojas

Se determinó la herbivoría total de las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* durante seis meses de muestreo, que representaban la estación seca y lluviosa. Se observó que los porcentajes de herbivoría de las hojas de *E. vespa* eran mayores que los porcentajes en las hojas de *E. exasperatum*. Sin embargo, el Análisis de Varianza (ANOVA de una vía) no mostró diferencias significativas entre los porcentajes de herbivoría en hojas de ambas especies ($F_{1, 1800} = 2.517$; $P > 0.05, 0.114$) (Fig. 15).

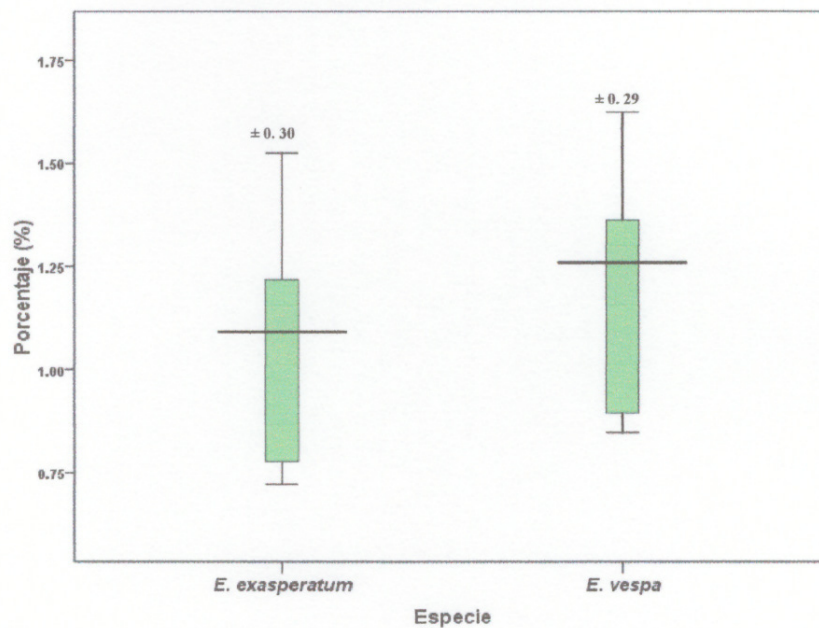


Fig 15. Porcentaje total de herbivoría en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* durante seis meses de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012 (error estándar en la parte superior de cada barra).

En general se observaron porcentajes bajos de herbivoría en las hojas de ambas especies (menores al 2%), lo cual es consistente con otros estudios en esta familia. Por ejemplo, Malo *et al.* 2001 reportaron daños por herbivoría de en la orquídea; Winkler *et al.*, 2005 registraron porcentajes de herbivoría en hojas de orquídeas epifitas menores a 1.3 % y Tremblay, 2006 registró porcentajes de en *Sarcochilus australis*. Sin embargo, estos porcentajes son bajos en comparación con otros grupos de plantas. Filip *et al.* (1995) registraron un porcentaje de 7.6 % de área perdida en 16 especies de árboles tropicales. Entre 2.9 y 7.5 % de área foliar en lianas neotropicales fue pérdida por la herbivoría (Aide & Zimmerman, 1990); mientras que Williams-Linera & Baltazar (2001), encontraron que cerca del 4 % del área foliar es pérdida en árboles deciduos y 3-8 % en árboles perennes de un bosque montano húmedo subtropical.

Aunque la herbivoría en las hojas de *E. vespa* y *E. exasperatum* es baja en comparación con otras especies, existen diferentes opiniones en cuanto a los efectos en la supervivencia de estas plantas. Algunos estudios señalan que la herbivoría en las orquídeas puede reducir la biomasa de la planta, y los procesos de reproducción sexual en los subsecuentes años (Whigham, 1990; Zimmerman & Whigham, 1992; Vallius & Salonen, 2001); sin embargo Kindlmann & Balounová (1999) encontraron que la defoliación en *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F. Hunt & Summerh., no causa un efecto marcado en su supervivencia y reproducción.

Los bajos porcentajes de herbivoría en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* sugieren que existe una resistencia y tolerancia a los herbívoros del área. La resistencia es la habilidad para reducir la frecuencia de daño, como son las defensas físicas y químicas

que se presentan, mientras que la tolerancia es la habilidad para mantener las condiciones después del daño, que en las hojas se presenta con producción de nuevos brotes (Karban & Baldwin, 1997; Strauss & Agrawal, 1999; Irwin *et al.*, 2004).

Los bajos porcentajes de herbivoría en las hojas de orquídeas pueden estar relacionados con las defensas y el valor nutricional. En general, las hojas de las orquídeas son gruesas y fibrosas por la presencia de elementos como cristales de sílice, celulosa y hemicelulosa, lo que sugiere un bajo valor nutricional y palatabilidad (Winkler *et al.*, 2005), ya que los herbívoros requieren de numerosas modificaciones en el aparato digestivo que permita fermentaciones lentas por microorganismos simbióticos y así poder digerir los compuestos que pueden inhibir la digestión (Granados-Sánchez *et al.*, 2008). Estas observaciones son congruentes con las Teorías de la Apariencia Vegetal y la Teoría de la Asignación de Recursos.

La teoría de la apariencia vegetal implica que las plantas aparentes o perennes deben invertir más recursos para producir reductores cuantitativos de digestibilidad en las hojas, como pocos nutrientes, lignina, taninos o silicatos (Baldwin, 1994). Mientras la teoría de la asignación de recursos podría explicar cómo las plantas de lento crecimiento, como las orquídeas, invierten más en defensa con polímeros complejos (lignina y taninos) y favorecen el uso de estas defensas inmóviles, las cuales, una vez empleadas son elementos permanentes de las hojas y tallos (Cipollini & Levey, 1997).

La dureza y consistencia de la hoja es considerada como una de las defensas físicas más eficaz para determinar la preferencia o no de un herbívoro por una hoja, ya que viene dada por el contenido de fibra y lignina en las paredes celulares (Barone &

Coley, 2002). Estas defensas físicas y la presencia y concentración de metabolitos secundarios pueden estar ligados al nivel de daño causado por los herbívoros en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*.

Los porcentajes de herbivoría en las hojas de ambas especies mostraron diferencias entre la estación seca y lluviosa. Al realizar el análisis de herbivoría en las hojas por cada mes de muestreo se observó que las variaciones de porcentajes de herbivoría para las hojas de ambas especies eran muy similares, sin embargo, los mayores porcentajes de herbivoría en las hojas de ambas especies fueron en los meses de Enero y Febrero, que corresponde a la estación seca en la Reserva Forestal Fortuna (Fig. 16).

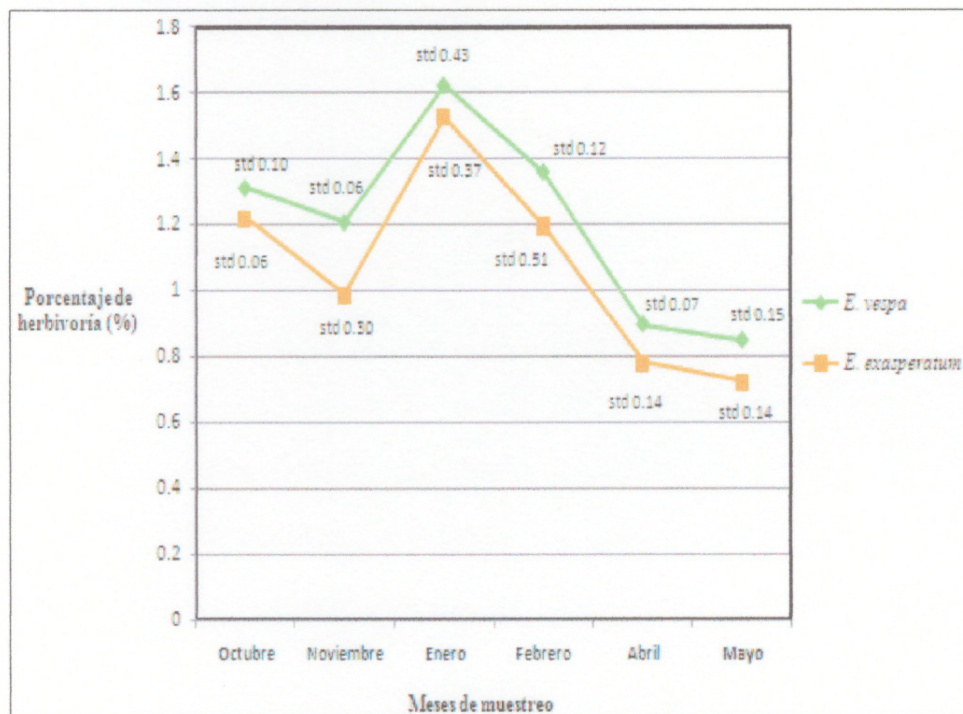


Fig. 16. Variaciones en los porcentajes de herbivoría en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* durante cada mes de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012 (error estándar en la parte superior de cada barra).

La mayor herbivoría en la estación seca observada en las hojas de *E. vespa* y *E. exasperatum*, está relacionada con el crecimiento de las hojas y la actividad de los herbívoros. Coley (1982) menciona que en la estación lluviosa las plantas muestran una sincrónica emergencia de hojas, lo que es probablemente efectivo para satisfacer las necesidades nutricionales de las poblaciones de herbívoros. Sin embargo en la estación seca, los daños por herbivoría pueden aumentar porque se reducen el movimiento de herbívoros e incrementa la presión de herbivoría sobre las hojas, que al mismo tiempo deben sobrellevar situaciones de estrés hídrico y ambiental, por lo que la movilización de recursos para defensas tienden a disminuir (Coley & Barone, 1996).

6.1.2 Herbivoría en flores

La herbivoría total en las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* fue determinada durante dos meses de muestreo, que correspondía a los meses en que ambas especies estaban en floración. La floración observada en *E. exasperatum* durante los dos años de estudio (2011 y 2012), no es consistente con lo reportado por Hammel *et al.*, (2003) que menciona esta especie con floración durante todo el año, sin embargo en la Reserva Forestal Fortuna, *E. exasperatum* solo presenta flores en los meses de Julio a Agosto.

El mayor número de flores con daño se observó en *E. vespa* con la categoría 3 (pérdida total de pétalos y sépalos) seguido de la categoría 2 (daño parcial en pétalos y sépalos). En contraste con las flores de *E. exasperatum*, cuyo mayor número de flores con daño estaban en la categoría 1 con daño en el raquis de la flor. Se observaron diferencias

significativas en el número de flores con daño de *E. exasperatum* y *E. vespa* ($F_{1, 12} = 57.270$; $P < 0.05, 0.001$) (Fig. 17).

En el análisis de daño por herbivoría en las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* por cada mes de muestreo se observó que no existía una variación entre meses (Fig. 17). Sin embargo, es importante recordar que el análisis se realizó solo durante los meses de Julio y Agosto que corresponden a la estación lluviosa, por lo que no se puede hacer una comparación con la estación seca. Sin embargo, Coley & Barone (1996) señalan que en la estación lluviosa se da un aumento en las poblaciones de insectos herbívoros que pueden causar los daños observados en las flores y tejidos de reproducción.

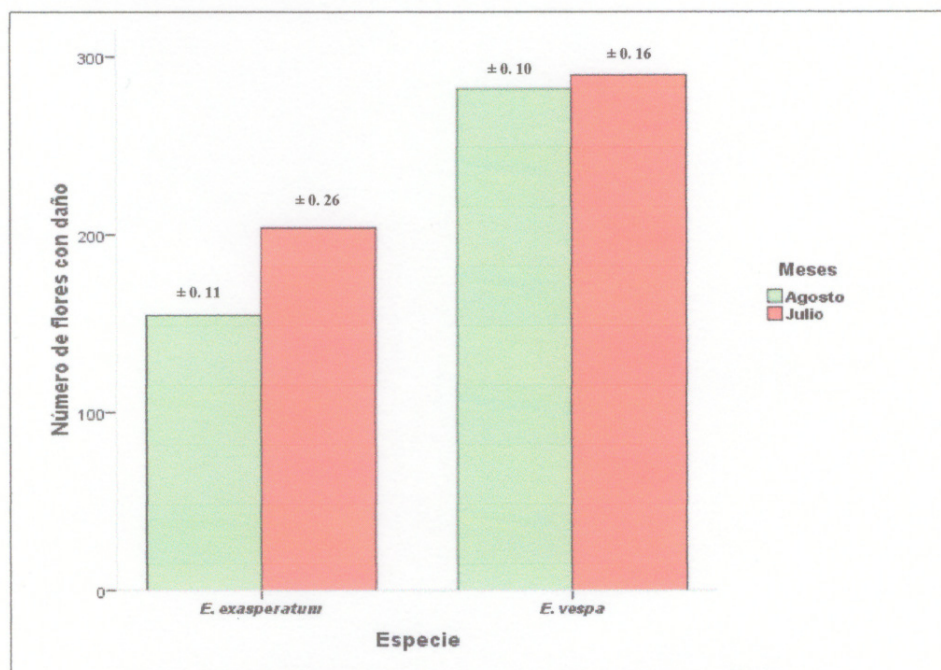


Fig 17. Variaciones en el número de flores con daño por herbivoría en *E. exasperatum* y *E. vespa* durante cada mes de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2012 (error estándar en la parte superior de cada barra).

En base a las observaciones en campo, se determinaron mayores daños por herbivoría en las flores que en las hojas. Esto concuerda con algunos autores que señalan que la herbivoría en flores es casi tan amplia y extensa como en las hojas (Wolfe, 2002). Además de acuerdo a McCall & Karban (2006), la herbivoría en flores puede afectar a una planta en una proporción similar o mayor que la herbivoría en hojas.

Los efectos del daño en flores difieren de los efectos que causa la herbivoría en las hojas, ya que el daño en las flores puede ser directo o indirecto, el efecto directo es el consumo de los gametos y disminución de los recursos para reproducción, lo que produce efectos indirectos que pueden afectar la dinámica de las poblaciones y comunidades; mientras la herbivoría en hojas está asociada con remoción de tejidos importantes para la fotosíntesis y por tanto para el crecimiento (McCall & Irwin, 2006).

Los resultados muestran un mayor daño en los pétalos y sépalos de flores de *E. vespa* con daño parcial y pérdida total; mientras que en *E. exasperatum*, las flores mostraron pocos o ningún daño, y también presentaron daño parcial en los pétalos; esto sugiere que los pétalos presentan características que los hacen más susceptibles a la depredación, que otras partes florales (Fig. 18).

Las características de las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* son muy similares en cuanto a coloración y forma (Fig. 11c y Fig. 12c), esto es importante ya que las flores medianas y aparentes, tienden a ser más atractivas y susceptibles para los herbívoros (Wilson & Thomson, 1991; Ashman, 2002). Además, diversos autores han mencionado que las plantas pueden tener un control independiente de la expresión de compuestos

secundarios en diferentes tejidos, de tal manera que hay diferencias en el daño en diferentes partes florales (Zangerl & Rutledge, 1996; Strauss *et al.*, 2004).

De acuerdo a McCall & Irwin (2006) las partes florales dedicadas a la reproducción presentan mayores defensas químicas que las partes dedicadas a la atracción de polinizadores. Esto podría explicar porque los pétalos fueron los más afectados en comparación con otras estructuras como la columna en las flores de *E. vespa* y *E. exasperatum*.

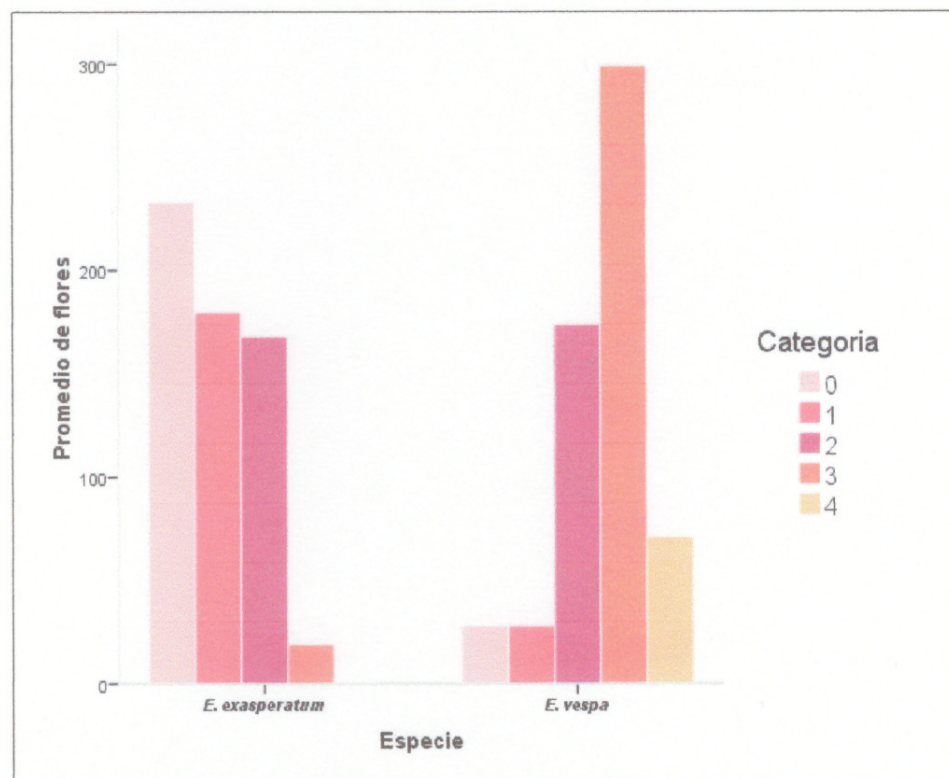


Fig 18. Promedio total de flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* en cada categoría de daño, durante dos meses de muestreo en la Reserva Forestal Fortuna, Panamá, 2011-2012.

Las diferencias en la herbivoría en las flores de *E. vespa* y *E. exasperatum* parecen estar asociadas con características de resistencia y tolerancia: 1) compuestos tóxicos en estructuras reproductivas como los pétalos, 2) escape en espacio y tiempo ya que se pueden reducir los daños, con una reducción en el tiempo de floración como ocurre con las flores de *E. exasperatum*, 3) algunos compuestos volátiles producidos por las flores pueden atraer predadores de herbívoros de flores o estar asociado con otro tipo de defensa químico, ya que según se observó las flores de *E. exasperatum* presentan un olor dulce muy intenso (De Craene & Miller, 2004; Leitao *et al.*, 2005, McCall & Irwin, 2006).

6.2. CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS IDENTIFICADAS EN LAS HOJAS Y FLORES

6.2.1 Coloración de extractos

Los extractos en etanol y metanol obtenidos de las hojas de ambas especies presentaron coloraciones que variaron del verde brillante al verde oscuro. Mientras que con los extractos etanólicos y metanólicos de las flores se observó un color rojizo en los extractos de *E. vespa* y coloración magenta con olor dulce en los extractos de *E. exasperatum*. Sin embargo todos los extractos de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* que se realizaron con hexano tuvieron una coloración amarillenta. La coloración de los extractos también fue indicativo de la presencia de algunos metabolitos secundarios (Fig. 19).

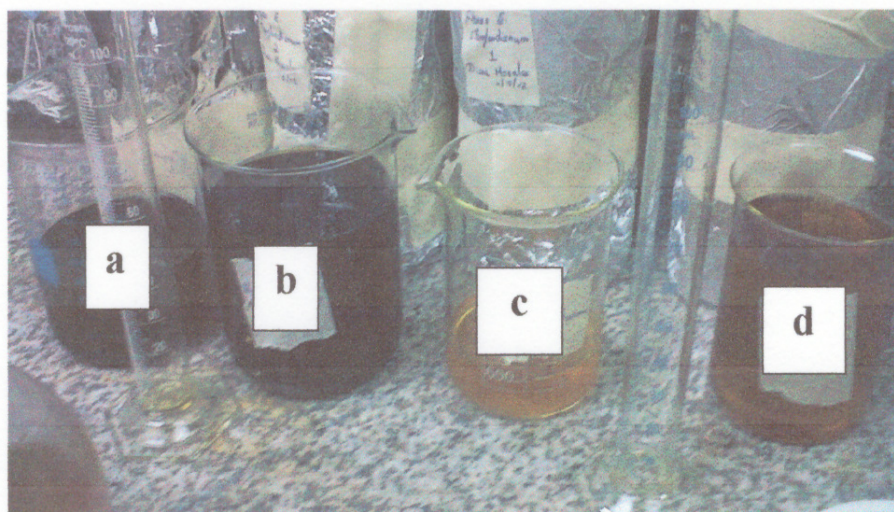


Fig. 19. Coloración de extractos etanólicos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (a= hoja *E. vespa*, b= hoja *E. exasperatum*, c= flores *E. vespa*, d= flores *E. exasperatum*).

Las coloraciones verdes de los extractos etanólicos y metanólicos de las hojas indican la presencia de la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, mientras que las coloraciones de los extractos de las flores pueden indicar la presencia de otras sustancias como flavonoides (Aichele-Alvarado, 2006). El color amarillo de los extractos de hojas y flores en hexano podrían relacionarse con la presencia de pigmentos carotenoides (carotenos o xantofilas) ya que estos pigmentos se extraen más fácilmente en hexano (Lallana & Lallana, 2003).

Para la determinación de los metabolitos presentes en todos los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, fue necesario la realización de la cromatografía en capa fina y el tamizaje fitoquímico, cuyos resultados son confirmados con las pruebas espectroscópicas.

6.2.2 Porcentajes de rendimiento y de humedad de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*

Porcentaje de rendimiento

El porcentaje de rendimiento describe la proporción del rendimiento real con respecto al rendimiento teórico (va desde el 1% hasta el 100%), debido a que en una reacción no siempre se obtiene toda la masa de producto calculado. Cuanto mayor sea el porcentaje de rendimiento, más eficiente es una reacción, es decir, que se obtiene una mayor cantidad de producto o concentrado) a partir de una muestra con masa conocida (TUXCIENCE.ORG, 2009).

Se calculó el porcentaje de rendimiento de los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, a partir de 100 g de material fresco para cada disolvente. Los mayores porcentajes de rendimiento se obtuvieron con los extractos etanólicos de las hojas (77.34 % de hojas de *E. vespa* y 76.55 % de *E. exasperatum*). Las flores de *E. exasperatum* mostraron valores de 73.33 % y *E. vespa* con 71.95 % (Fig. 20).

Los extractos metanólicos de las hojas de *E. vespa* mostraron porcentajes de rendimiento de 57.36 %, seguido de las hojas de *E. exasperatum* con 50.1 %. Los porcentajes de rendimiento de los extractos metanólicos de las flores de *E. exasperatum* fueron de 40.31 %, seguido de las flores de *E. vespa* con 39.6 % (Fig. 20).

Los menores porcentajes de rendimiento se obtuvieron de los extractos en hexano de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Los extractos de hojas de *E. vespa* con 8.12 %, extractos de hojas de *E. exasperatum* con 7.14 %; mientras que los extractos en

hexano de flores de *E. exasperatum* mostraron un valor de 7.0 % seguido de los extractos de flores de *E. vespa* con 6.11 % (Fig. 20).

Los mayores porcentajes de rendimiento registrados en los extractos etanólicos y metanólicos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, indican que estos disolventes son más efectivos para obtener la cantidad de producto. Además, el etanol es un disolvente menos tóxico que el metanol y el hexano, por lo que su uso como disolvente ofrece ventajas (TUXCIENCE.ORG, 2009).

Entre los factores que pueden afectar el porcentaje de rendimiento se encuentran la temperatura y la presión. Además, el hecho de que la masa obtenida sea menor se debe a varias razones, entre ellas: a) muchas reacciones no se completan, es decir, los reactivos no se convierten completamente en productos; b) en algunos casos, un conjunto particular de reactivos sufre dos o más reacciones simultáneas, formando productos no deseados junto con los deseados; c) algunas veces la separación del producto deseado de la mezcla de reacción es tan difícil que no todo el producto formado puede aislarse (Vogel *et al.*, 1996).

Porcentaje de humedad

Las muestras de flores de ambas especies mostraron porcentajes mayores de humedad en comparación con las hojas, *E. vespa* con 90.31 % y *E. exasperatum* con 89.24 %. Las hojas de *E. exasperatum* contenían mayor porcentaje de humedad (86.53 %) en comparación con las hojas de *E. vespa* (83.45 %) (Fig. 21).

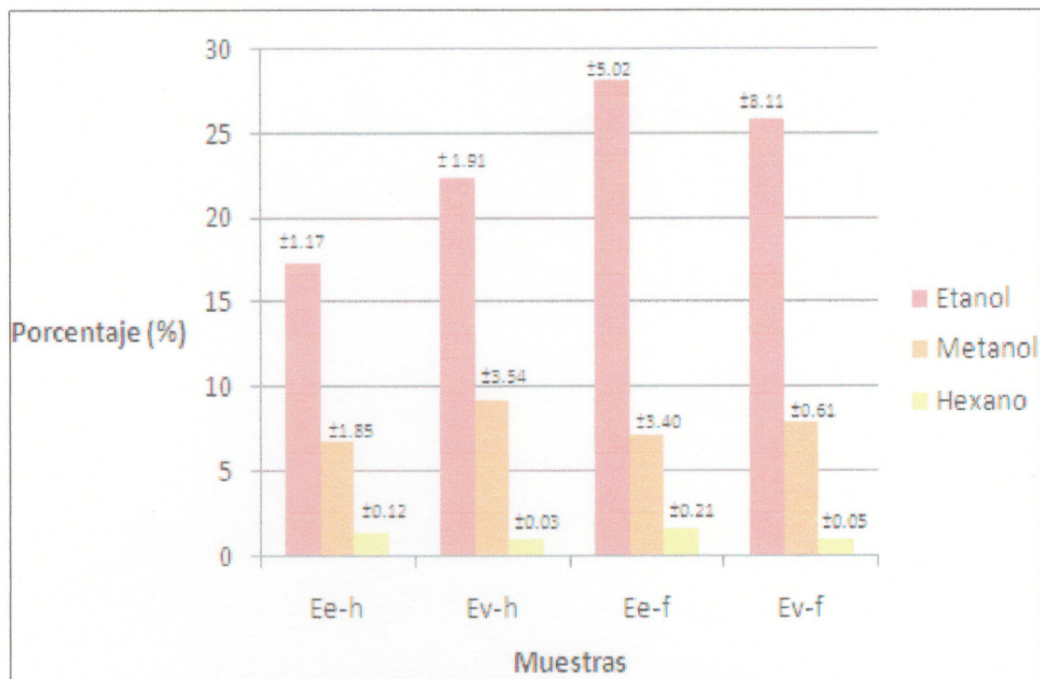


Fig. 20. Porcentaje de rendimiento de muestras de extractos etanólicos, metanólicos y hexánico de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (Ee-h= extractos de hojas de *E. exasperatum*; Ee-f= extractos de flores de *E. exasperatum*; Ev-h= extractos de hojas de *E. vespa*; Ev-f= extractos de flores de *E. vespa*). Error estándar en la parte superior de la barra.

El mayor contenido de agua en las flores en comparación con las hojas puede relacionarse con los datos de herbivoría, donde se observó una mayor herbivoría en flores que en hojas. De acuerdo a algunos autores los insectos herbívoros prefieren estructuras vegetales con mayor contenido de lignina y agua, más que por el valor nutricional que contengan; por lo que el contenido de humedad es un factor determinante en la preferencia de los insectos herbívoros; (Cross *et al.*, 2003; Poorter *et al.*, 2004).

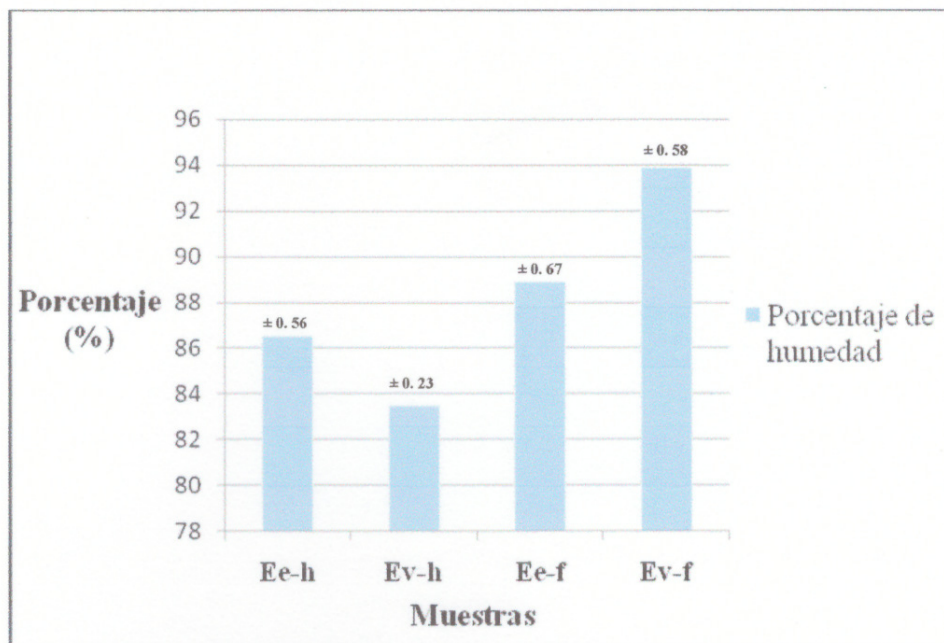


Fig. 21. Porcentaje de humedad en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (Ee-h= hojas de *E. exasperatum*; Ee-f= flores de *E. exasperatum*; Ev-h= hojas de *E. vespa*; Ev-f= flores de *E. vespa*). Error estándar en la parte superior de la barra.

Scriber (1977) menciona que una de las limitaciones que enfrentan los insectos herbívoros es la adquisición correcta de agua nutricional. Algunos insectos deben mantener en sus cuerpos 85-92 % de agua, sin embargo el contenido de agua en algunas hojas maduras es sustancialmente menor. El contenido de agua puede en algunos casos limitar el crecimiento y alimentación de insectos herbívoros (Feeny, 1970). Este efecto limitante del contenido de agua se debe a que algunos insectos tienen más dificultad para comer y procesar las hojas y flores con menor concentración de agua, ya que les resulta difícil procesar las duras fibras con poco agua (Soo Hoo & Fraenkel, 1966).

Esto podría explicar porque las hojas de *E. vespa* con menor porcentaje de humedad fueron las que presentaron menor herbivoría, en comparación con las hojas de *E. exasperatum*; además podría indicar porque las flores de *E. vespa* y *E. exasperatum* con mayores porcentajes de humedad presentaron mayor herbivoría en comparación con las hojas.

6.2.3 Porcentaje de cenizas de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*

Las cenizas de hojas y flores están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha quemado. Las cenizas obtenidas no tendrán necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en la muestra original, ya que se dan pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes, pero nos permite tener una aproximación del contenido mineral de las muestras (Ayala, 2007).

Los mayores porcentajes de cenizas o de material mineral se observó en las hojas (1.68 % en *E. vespa* y 1.57 % en *E. exasperatum*), seguido de las flores de *E. vespa* con 1.20 % y las de *E. exasperatum* con 1.19 % (Fig. 22).

Las diferencias observadas en el contenido de cenizas o materia mineral, puede relacionarse con los resultados de herbivoría observados en las hojas y flores de *E. vespa* y *E. exasperatum*. Se observó que las hojas con mayor contenido de minerales fueron las que presentaron mayor herbivoría en comparación con las flores. Esto está relacionado

principalmente por la presencia de minerales como nitrógeno y fósforo (Elser *et al.*, 2003).

Cross *et al.* (2003) menciona que la calidad de la alimentación en los herbívoros es relativa y está basada en los requerimientos de los consumidores individuales. Sin embargo, existen ciertos elementos y nutrientes que imponen limitaciones en el rango de crecimiento y alimentación de insectos herbívoros, lo que podría explicar la relación entre el contenido de materia mineral y la herbivoría de *E. vespa* y *E. exasperatum*.

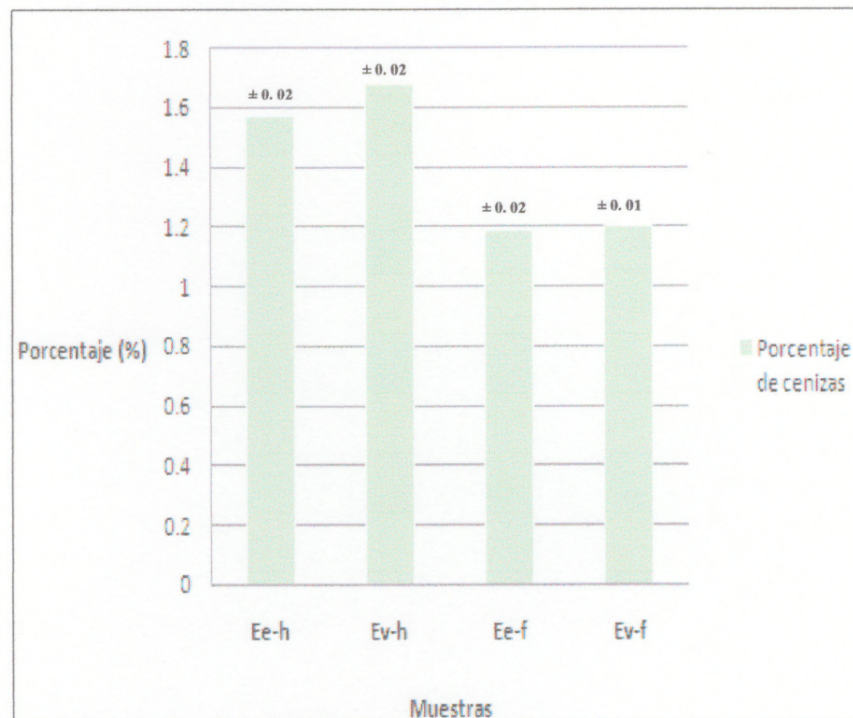


Fig. 22. Porcentaje de cenizas en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (Ee-h= hojas de *E. exasperatum*; Ee-f= flores de *E. exasperatum*; Ev-h= hojas de *E. vespa*; Ev-f= flores de *E. vespa*). Error estándar en la parte superior de la barra.

6.2.4 Macronutrientes y micronutrientes en hojas y flores

Macronutrientes

El análisis de nutrientes nos permite reconocer algunos de los nutrientes, elementos y minerales en las muestras de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, y de esta manera identificar algunos de los minerales que representan los porcentajes de cenizas o de contenido mineral analizados anteriormente.

En la figura 23, se observa que en las muestras de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* los macronutrientes que estaban en mayor concentración eran el potasio (K), nitrógeno (N) y el fósforo (P). Esto concuerda con el estudio de Zotz (1999), donde se menciona que estos elementos, se encuentran en mayor proporción en diversos órganos de las orquídeas, sobre todo en las hojas, ya que son necesarios para los procesos reproductivos y de crecimiento de la planta.

En las hojas, la mayor concentración de nitrógeno se encontró en *E. exasperatum* (1.68 %), mientras que *E. vespa* tenía 1.15 %. Sin embargo las hojas de *E. vespa* mostraron mayor concentración de fósforo (0.31 %) y mayor concentración de potasio (3.25 %), en comparación con *E. exasperatum* que tenía 0.18 % de fósforo y 1.33 % de potasio. En las flores se encontró una mayor concentración de nitrógeno en las muestras de las flores de *E. exasperatum* (2.86 %) en comparación con las de *E. vespa* que tenían 1.71 %, sin embargo las flores de *E. vespa* (al igual que las hojas) presentan el potasio como el elemento en mayor concentración con 2.34 %, seguido del fósforo con 0.17 %; mientras que en las flores de *E. exasperatum* el potasio estaba en 1.22 % y el fósforo en bajas concentraciones de (0.09 %) (Fig. 23).

Las concentraciones de estos elementos en las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* son relativamente bajas si se comparan con otras especies de orquídeas y arboles tropicales. En un estudio realizado con la orquídea *Dimerandra emarginata* se encontraron en las hojas concentraciones de Potasio 14.3 %, Nitrógeno 8.4 % y Fósforo 0.63 % (Zotz, 1999). Mientras que las hojas de *Encyclia tampensis* mostró mayores proporciones, en especial de nitrógeno con hasta un 9 % (Benzing & Ott, 1981). Sin embargo, los valores de estos nutrientes de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* están dentro de la gama conocida de plantas vasculares, en particular de las orquídeas (Benzing, 1990).

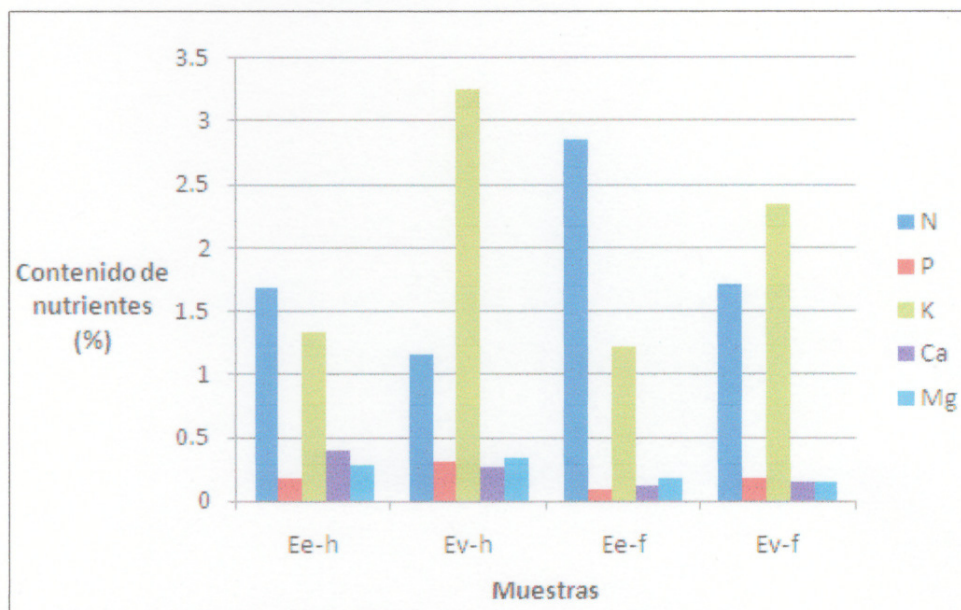


Fig. 23. Macronutrientes encontrados en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (Ee-h= hojas de *E. exasperatum*, Ee-f= flores de *E. exasperatum*; Ev-h= hojas de *E. vespa*; Ev-f= flores de *E. vespa*; N= nitrógeno; F= Flúor; P= Fosforo; Ca= Calcio; Mg= Magnesio).

El contenido bajo de nitrógeno, fosforo y potasio en la hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* es interesante, teniendo en cuenta la gran inversión de nutrientes que necesitan estas especies para el desarrollo de los frutos. Por lo que se cree que la absorción de nutrientes, en algunas especies de orquídeas, se limita entonces a períodos cortos después de las lluvias ocasionales, y la gran acumulación de nutrientes en los tejidos deriva casi en su totalidad de las reservas internas (Zotz, 1999).

Aunque la oferta de nitrógeno y potasio es limitada para algunas plantas, como las orquídeas, estos elementos son necesarios para el crecimiento óptimo de los tejidos de hojas y flores, siempre que se mantengan en el nivel óptimo. Sin embargo, el fósforo parece ser un elemento más limitado en las orquídeas, ante algunas situaciones como la formación de frutos (Zotz, 1999).

El nitrógeno es esencial para la producción de proteínas, hormonas, clorofila, vitaminas, enzimas y ácidos nucleicos; además el mayor contenido en nitrógeno puede contribuir con el crecimiento vegetativo de la hoja y del tallo. Mientras que el potasio juega un papel importante en el balance hídrico de las células y que es necesario para la formación de almidones, hidratos de carbono, azúcares, la síntesis de proteínas, y la división celular en las raíces, hojas y otras partes de la planta. Además se requiere como catión en la función enzimática (Nashriyah, 2010).

Otro aspecto importante es que el nitrógeno y el fósforo influyen en la relación de las plantas con insectos herbívoros, ya que la calidad nutricional de hojas y flores para los herbívoros está dada por la presencia y proporción de estos elementos (Huberty & Denno,

2006). Elser *et al.*, (2003) menciona que los insectos herbívoros tienen altas tasas de crecimiento por lo que demandan alimentos con altas proporciones de nitrógeno y fósforo, en parte porque el rápido crecimiento está asociado con muchas copias de RNA ribosomal que es rico en nitrógeno y fósforo.

La limitación que imponen el nitrógeno y el fósforo en los insectos herbívoros y la elección de su alimento, tiene relación con la mayor herbivoría en algunas plantas con altas concentraciones de nitrógeno foliar (Huberty & Denno, 2006). Esto explicaría los bajos valores de herbivoría observados en las hojas de *E. vespa* y *E. exasperatum*, ya que contienen los menores valores de nitrógeno en comparación con las flores.

Se encontraron en menores concentraciones en las hojas y flores calcio y magnesio, los cuales son reutilizados para el crecimiento de los tejidos (Fig. 23). Además, el magnesio se requiere como activador de enzimas fotosintéticas, es componente estructural crítico de la molécula de clorofila y es necesario para producir carbohidratos, azúcar y grasa (Poole & Seeley, 1974, Nashriyah, 2010).

Micronutrientes

Los micronutrientes encontrados en mayor concentración en las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* fueron el manganeso, hierro y zinc. En las hojas de *E. exasperatum* el manganeso y el hierro fueron los micronutrientes en mayor concentración, mientras que en las hojas de *E. vespa* estos elementos estaban presentes pero en menor concentración. Las flores de *E. exasperatum* presentaron el hierro en mayor concentración, mientras que en las flores de *E. vespa* el manganeso estaba como

micronutriente mayoritario. Se detectaron pequeñas concentraciones de cobre en las hojas de ambas especies (Fig. 24).

En las orquídeas, al igual que otras plantas, es necesario un adecuado balance de todos los nutrientes para el desarrollo óptimo. Es por ello, que las bajas concentraciones de micronutrientes encontradas en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, se encuentran en el rango normal de la plantas vasculares, ya que estos elementos se requieren en cantidades pequeñas para evitar daños tisulares (Rosa *et al.*, 2009).

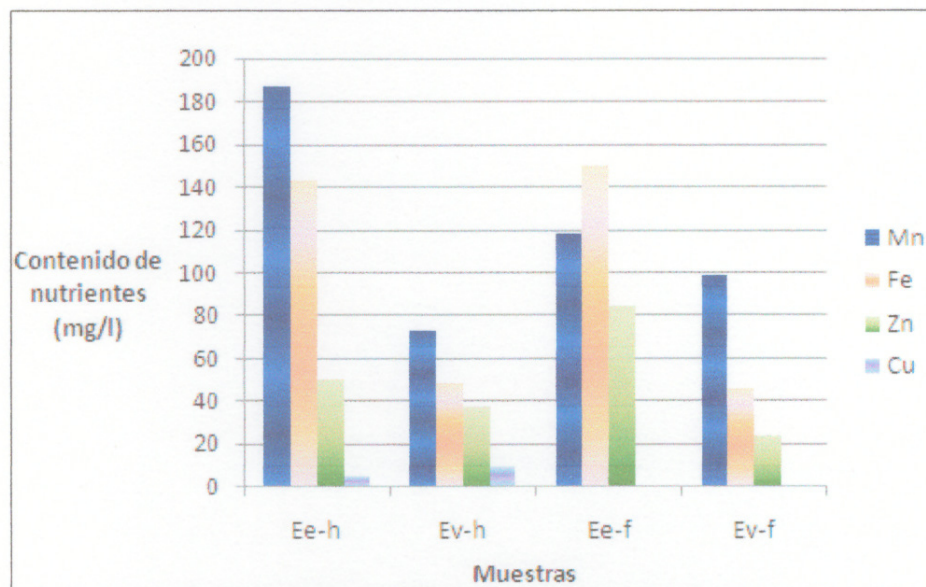


Fig. 24. Micronutrientes encontrados en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (Ee-h= hojas de *E. exasperatum*, Ee-f= flores de *E. exasperatum*; Ev-h= hojas de *E. vespa*; Ev-f= flores de *E. vespa*; Mn= Manganese; Fe= Hierro; Zn= Zinc; Cu= Cobre).

Al comparar los micronutrientes, se observó que en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* el manganeso y hierro estaban en mayores cantidades. Esto se explica por las funciones que realizan, el manganeso interviene en la regulación de la

concentración de auxina que es requerida en procesos fisiológicos, mientras que el hierro es esencial para el crecimiento tisular, forma parte de los aminoácidos cisteína o metionina, por lo que el déficit de este elemento por debajo de lo normal, causa daños en la síntesis de proteínas (Ferreira Santos, 2010).

Algunos tejidos son muy sensibles al zinc, sin embargo este elemento es importante porque interviene en la síntesis de auxinas y, por lo tanto, en el alargamiento de hojas, además es constituyente de muchas enzimas. El cobre que no se observó las flores de *E. exasperatum*, participa en reacciones relacionadas con la cadena de transporte de electrones y es activador de varias enzimas (Taiz & Zeiger, 2009).

6.2.5 Medidas de pH en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. Los valores de pH obtenidos de los extractos etanólicos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* presentaron valores de pH ácido que no difieren mucho entre sí (Fig. 25). Las hojas de *E. vespa* presentaron el mayor valor con 5.9, seguido de las flores de esta especie con 5.7. En el caso de la especie *E. exasperatum*, las flores presentaron un valor mayor de pH con 5.3, mientras que en las hojas el pH fue de 4.7.

La mayoría de las orquídeas mantienen condiciones de pH relativamente ácido de 5.5 a 6.5, lo cual tiene importancia no sólo en el crecimiento de la planta sino además en la efectividad de los nutrientes (Pooley & Seeley, 1974).

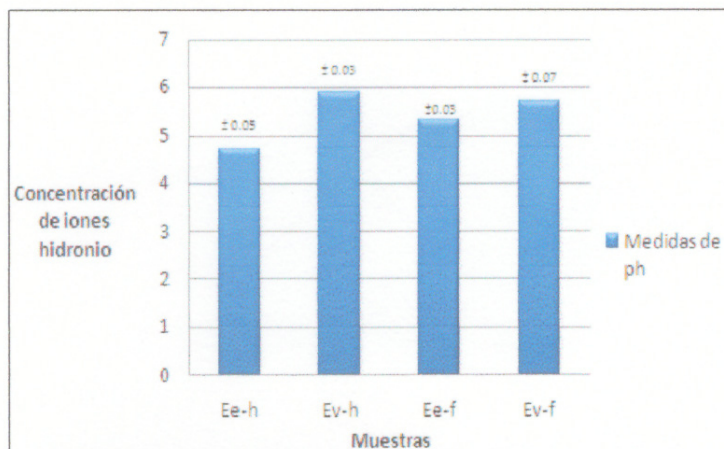


Fig. 25. Medidas de pH de muestras de extractos etanólicos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (Ee-h= extracto etanólico de hojas de *E. exasperatum*; Ee-f= extracto etanólico de flores de *E. exasperatum*; Ev-h= extracto etanólico de hojas de *E. vespa*; Ev-f= extracto etanólico de flores de *E. vespa*). Error estándar en la parte superior de las barras.

6.2.6 Metabolitos secundarios en hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*

6.2.6.1 Factores de retención

Al realizar la cromatografía con los extractos etanólicos y metanólicos de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, en los puntos donde se aplicaron los extractos (de hojas y flores) se observaron manchas de color café que se mantuvieron en la placa mucho tiempo después. Estas manchas podrían indicar la presencia de azúcares, que se oxidan fácilmente y son muy pesados para moverse en la placa. Sin embargo, al realizar la cromatografía con los extractos en hexano no se separaron bien los componentes de las muestras y no se observaron las manchas color café en los puntos,

esto confirma la presencia de glúcidos en los extractos, debido a que estos metabolitos no son solubles en hexano (Fig. 26).

En cromatografía en capa fina es importante medir la relación entre la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por el disolvente, denominada Rf. Si dos compuestos tienen el mismo valor de Rf y éste se obtuvo en condiciones experimentales similares, se puede considerar que los dos compuestos son iguales.

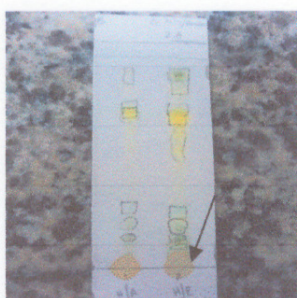


Fig. 26. Manchas de glúcidos observadas en los extractos etanólicos de hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* durante la cromatografía en placa fina (señalados con la flecha).

Para el análisis de los Rf solo se consideraron los extractos etanólicos de las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* debido a que estos extractos presentaron una mejor movilidad y fueron arrastrados más fácilmente en la placa. El número de manchas obtenidas fue mayor en las hojas, lo que significa que en las hojas hay más compuestos apolares que fueron extraídos con el disolvente (acetato de etilo/hexano 2:8). Mientras que en las flores sólo se obtuvieron dos manchas en cada muestra. Esto sugiere que para separar los compuestos de las muestras de flores con la técnica de cromatografía fina, es necesario probar con un disolvente con mayor polaridad (Fig. 27).

Se calcularon los Rf de las manchas observada en cada extracto (Fig. 27) y los resultados se observan en el Cuadro III.

Los RF muy bajos (0.1) indican que la sustancia no se desplazó del origen o muy poco (Garin Aguilar 2010), por lo que se considera que el disolvente utilizado (acetato de etilo/hexano 2:8) no fue muy eficaz para separar algunos componentes del extracto, en especial en las flores, ya que las manchas B1 –B5 tienen valores menores o iguales a 0.1.

A partir del factor de retención se observa la polaridad de los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, siendo el componente más polar aquel con un Rf menor (0.2) que se observó en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Mientras que el componente menos polar (apolar) se observó con un Rf de 0.9 en las hojas de *E. vespa*.

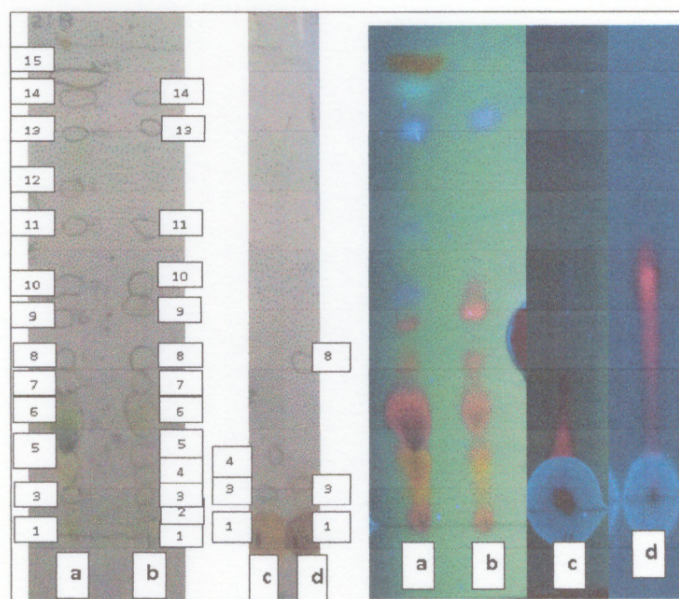


Fig. 27. Resultados de cromatografía en placa fina de extractos etanólicos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* (a=hoja *E. vespa*, b=Hoja *E. exasperatum*, c=flor *E. vespa*, d=flor *E. exasperatum*), con eluyente acetato de etilo/ hexano 2:8. Revelado en lámpara UVA (264 nm).

De acuerdo a Tabares (2006) y Garín Aguilar (2010), bajo las mismas condiciones de extracción y separación, los Rf de las manchas B6- B8 indican la presencia de pigmentos fotosintéticos, las cuales fueron observadas en las hojas de ambas especies y en las flores de *E. exasperatum*. Posiblemente no se observó en las flores de *E. vespa* por problemas en el manejo de la prueba. Los Rf = 0.4 indican la presencia de carotenoides, mientras que la quarcitina que presenta un Rf= 0.6 fue detectada en la muestra de las hojas de *E. vespa*.

CUADRO III. FACTORES DE RETENCIÓN (RF) EN EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS Y FLORES (*= NO SE OBSERVÓ MANCHAS).

Manchas observadas	Hoja <i>E. vespa</i>	Hoja <i>E. exasperatum</i>	Flores <i>E. vespa</i>	Flores <i>E. exasperatum</i>
B1	0.02	0.02	0.03	0.03
B2	0.05	0.05	*	*
B3	0.07	0.07	0.07	0.07
B4	*	0.1	0.1	*
B5	0.1	0.1	*	*
B6	0.2	0.2	*	*
B7	0.2	0.2	*	*
B8	0.3	0.3	*	0.3
B9	0.4	0.4	*	*
B10	0.4	0.4	*	*
B11	0.5	0.5	*	*
B12	0.6	*	*	*
B13	0.7	0.7	*	*
B14	0.8	0.8	*	*
B15	0.9	*	*	*

6.2.6.2. Resultados de tamizaje fitoquímico

En los diferentes extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* se ensayaron una serie de reacciones analíticas cuyo propósito es determinar, de forma cualitativa, la presencia de los distintos grupos fitoquímicos. La sensibilidad y efectividad de estas pruebas depende de la concentración de la muestra, concentración de los metabolitos en el extracto, caducidad de los reactivos y errores humanos (Guevara *et al.*, 2009). Al realizar el tamizaje fitoquímico se observaron diferencias tanto en la coloración como en la intensidad de la respuesta (Fig. 28).

Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de las pruebas espectroscópicas y cromatográficas (Bruneton, 2001).

Los resultados del tamizaje realizado en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* fueron similares para ambas especies y en los tres disolventes (etanol, hexano y metanol). Entre los metabolitos detectados destacan los flavonoides del tipo flavonas y dihidroflavonol, taninos condensados, terpenos, triterpenos y alcaloides. La presencia de cumarinas en los tres extractos de las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* fue confirmada por la aparición de puntos fluorescentes bajo luz ultravioleta, con excepción del extracto en hexano de las hojas de *E. exasperatum* en donde no hubo reacción. La prueba de saponinas mostró resultados negativos para los tres extractos de las hojas, de igual modo no se detectaron glucósidos cardiotónicos, lactosas sequitérpenicas y grupos 5-hidroxi-flavonas. (Cuadro IV).

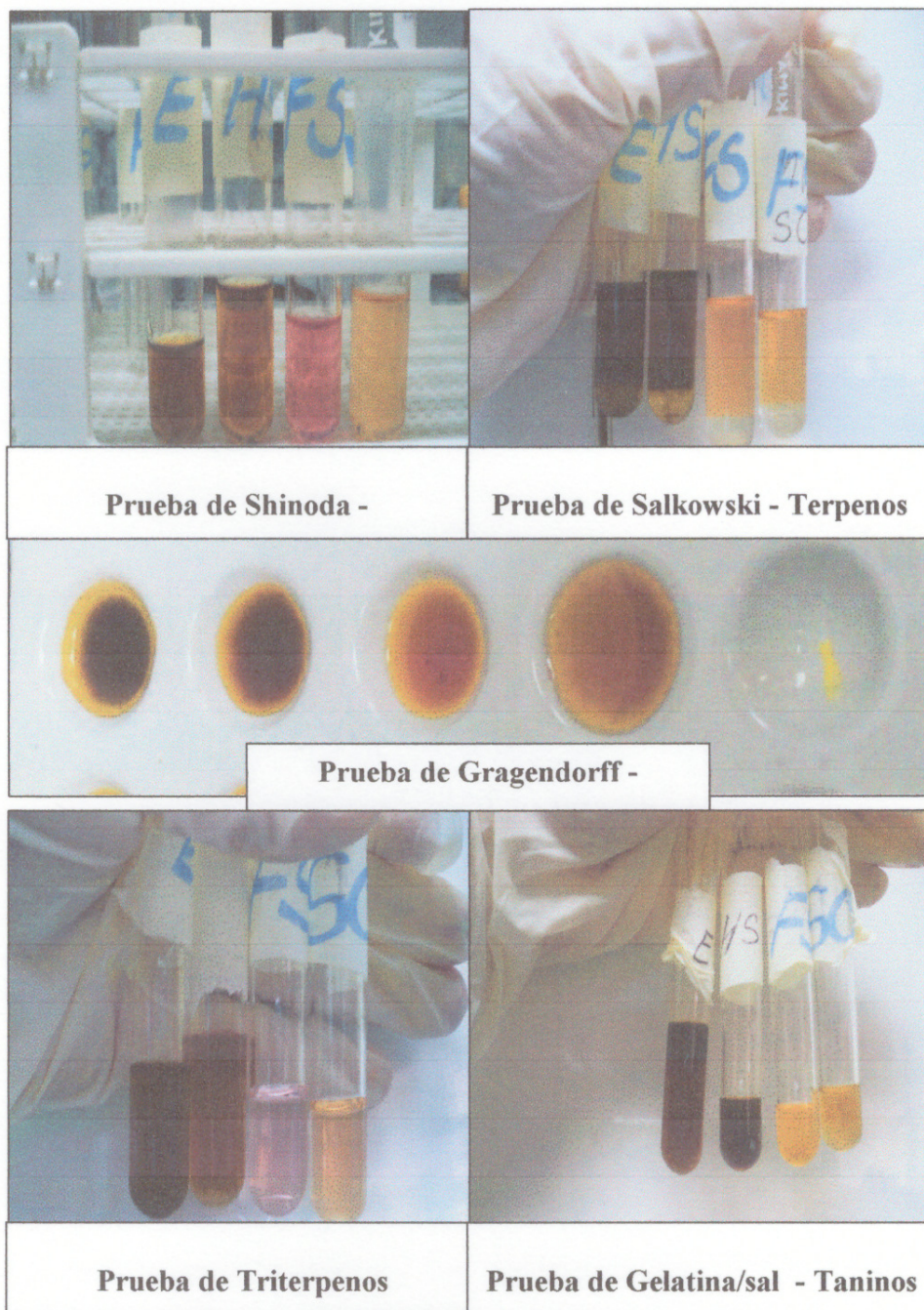


Fig. 28. Resultados cualitativos de algunas pruebas realizadas durante el tamizaje fitoquímico de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*.

En el cuadro V, se observa el tamizaje para las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* con diversos resultados en cada especie y en cada disolvente. Se detectaron en todas los extractos flavonoides dihidroflavonoles y flavonas, taninos hidrolizables, alcaloides y cumarinas. Además se encontraron terpenos y triterpenos, sin embargo no se formó una interfase azul o verdosa como ocurrió en las hojas, lo que indica que el pigmento puede ser de tipo antocianinas. En todos los extractos de flores de ambas especies no se encontró presencia de saponinas con el Ensayo de agua caliente y con la prueba de Rosenthaler. La prueba de Baljet de glucósidos cardiotónicos y lactosas sequitérpenicas y la de Dimroth para grupos 5-hidroxi flavonas fue positiva para las flores de *E. exasperatum*.

6.2.6.3. Análisis e interpretación de pruebas espectroscópicas

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV) se utilizó para identificar algunos grupos funcionales y además, para determinar el contenido y fuerza de las sustancia. Los compuestos que tengan un cromóforo o instauraciones son visibles en esta región. Un cromóforo es cualquier grupo de átomos que absorben luz independientemente de que presente color o no (Dyer, 1965).

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto. Esta información se obtiene a partir del espectro de absorción de dicho compuesto al haberlo sometido a la acción de la radiación infrarroja en el espectrofotómetro (Dyer, 1965).

CUADRO IV. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO REALIZADOS EN EXTRACTOS DE HOJAS

Grupo funcional	Prueba	Ee-h			Ev-h		
		Et	Me	He	Et	Me	He
Flavonoides	NaOH	Color naranja +++	Color naranja +++	Color naranja +	Color naranja +++	Color naranja +++	Color naranja ++
	Pew's	Color rojo +++	Color rojo +++	Color rojo +	Color rojo +++	Color rojo +++	Color rojo + +
	Shinoda	Color naranja +++	Color naranja +++	Color naranja +	Color amarillo-naranja +++	Color amarillo-naranja +++	Color amarillo-naranja ++
Terpenos	Salkowski	Interfase azul verdosa +++	Interfase azul verdosa +++	Interfase azul verdosa +	Interfase azul verdosa +++	Interfase azul verdosa +++	Interfase azul verdosa +
Triterpenos	Triterpenos	Color verde oscuro +++	Color verde oscuro +++	Color verde oscuro +	Color verde oscuro +++	Color verde oscuro +++	Color verde oscuro +
	Lieberman-Buchard	Color verde +++	Color verde +++	Color verde +	Color verde +++	Color verde +++	Color verde +
Alcaloides	Mayer	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +
	Gragendorff	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +++
	Wagner	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado ++	Precipitado +++	Precipitado +++	Precipitado +
Taninos	Gelatina-sal	Color verde +++	Color verde +++	-----	Color verde +++	Color verde +++	Color verde +
	FeCl ₃	Precipitado pardo verdoso +++	Precipitado pardo verdoso +++	-----	Precipitado pardo verdoso +++	Precipitado pardo verdoso +++	Precipitado pardo verdoso +
Cumarinas	Cumarinas	Puntos fluorescentes ++	Puntos fluorescentes ++	-----	Puntos fluorescentes ++	Puntos fluorescentes ++	Puntos fluorescentes +
Saponinas	Ensayo de agua caliente	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Rosenthaler	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glucósidos cardiotónicos y lactosas sequitérpica	Baljet	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Grupos 5-hidroxiflavona	Dimroth	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Observaciones: Ee-h= hojas de *E. exasperatum*; Ev-h= hojas de *E. vespa*; Et= extracto etanólico; He= extracto en hexano; Me= extracto metanólico; ----- no hay reacción; + poca reacción; ++ moderada reacción; +++ alta reacción.

CUADRO V. RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO REALIZADOS EN EXTRACTOS DE FLORES

Grupo funcional	Prueba	Ee-f			Ev-f		
		Et	He	Me	Et	He	Me
Flavonoides	NaOH	Color amarillo +++	Color amarillo ++	Color amarillo +++	Color naranja +++	Color naranja +	Color naranja +++
	Pew's	Color rojo +++	Color rojo ++	Color rojo +++	Color rojo +++	Color rojo +	Color rojo +++
	Shinoda	Color rojo +++	Color rojo ++	Color rojo +++	Color rosa +++	Color rosa ++	Color rosa +++
Terpenos	Salkowski	Color rojo +++	Color rojo ++	Color rojo +++	Color amarillo +++	Color amarillo ++	Color amarillo +++
Triterpenos	Triterpenos	Color rojo +++	Color rojo ++	Color rojo +++	Color rosa +++	Color rosa ++	Color rosa +++
	Lieberman-Buchard	Color rosa +++	Color rosa ++	Color rosa +++	Color rosa +++	Color rosa ++	Color rosa +++
Alcaloides	Mayer	Precipitado +	-----	Precipitado +	Precipitado +	-----	Precipitado +
	Gragendorff	Precipitado +	Precipitado +	Precipitado +	Precipitado +	Precipitado +	Precipitado +
	Wagner	Precipitado +	Precipitado +	Precipitado +	-----	-----	-----
Taninos	Gelatina-sal	Color azul +++	Color azul +	Color azul +++	Color azul +++	Color azul +	Color azul +++
	FeCl ₃	Precipitado azul +++	Precipitado azul +	Precipitado azul +++	Precipitado azul +++	Precipitado azul +	Precipitado azul +++
Cumarinas	Cumarinas	Puntos fluorescentes ++	Puntos fluorescentes +	Puntos fluorescentes +	Puntos fluorescentes ++	Puntos fluorescentes ++	Puntos fluorescentes ++
Saponinas	Ensayo de agua caliente	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Rosenthaler	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glucósidos cardiotónicos y lactosas sequitérpenica	Baljet	Color naranja +	Color naranja +	Color naranja +	-----	-----	-----
Grupos 5-hidroxiflavona	Dimroth	Color rojo +	Color rojo +	Color rojo +	-----	-----	-----

Observaciones: Ee-f= flores de *E. exasperatum*; Ev-f= flores de *E. vespa*; Et= extracto etanólico; He= extracto en hexano; Me= extracto metanólico; ----- no hay reacción; + poca reacción; ++ moderada reacción; +++ alta reacción.

La figura 29 muestra el análisis del extracto etanólico de las hojas de *E. exasperatum* en el Espectrofotómetro Infrarrojo en donde se observaron señales de metabolitos secundarios como flavonoides como taninos por la presencia del grupo fenol a 1248.00 cm^{-1} y 1408.10 cm^{-1} y grupo éster a 1117.8 cm^{-1} y 1019.42 cm^{-1} . También se observa señal del carbonilo de cetonas a 1723.47 cm^{-1} . Además se observaron señales de alcaloides por la presencia del grupo aminas a 1518.04 cm^{-1} y 3333.14 cm^{-1} . Esto fue confirmado con el tamizaje fitoquímico, que mostró resultados positivos para los flavonoides, taninos y alcaloides; y por el espectro UV que mostró señales para flavonas a 310.0 nm . En el espectro UV se observó una absorbancia a 664.8 nm que de acuerdo a Lock (1997) está en el rango de absorbancia de la clorofila a de las plantas, absorbancia a 362.0 nm y 384.0 nm que corresponde al rango de las chalconas ($340\text{ a }390\text{ nm}$) y absorbancias que van de 332.00 nm y 338.0 nm que indican la presencia de flavonoles ($330\text{ a }360\text{ nm}$) (Lock, 1997).

En el espectro infrarrojo del extracto en hexano de las hojas de *E. exasperatum* (Fig. 30) también se observó otra evidencia de la presencia de flavonoides y grupos doble enlace cíclicos con la señal de carbonos de hidrogeno terciarios a 2928.07 cm^{-1} . Además la presencia de cetonas que podrían ser de glucósidos fue detectada a 1714.79 cm^{-1} y 1666.57 cm^{-1} . En este mismo espectro se detecta la señal de terpenos por el grupo aromático a 1658.85 cm^{-1} y 928.76 cm^{-1} , esto fue confirmado por el tamizaje fitoquímico, en donde se observan señales de grupos de terpenoides.

Las señales del grupo fenol a 1410.99 cm^{-1} y 1216.17 cm^{-1} , del grupo éter a 1070.54 cm^{-1} y 1019.42 cm^{-1} , y la señal intensa del grupo metoxilo (O-CH_3) a 2855.73

cm^{-1} que podrían indicar la presencia de la lignina. Este es un polímero en que se encuentra en la pared de las células vegetales, de grupo químico básico (fenil propano), que se repite y se encadena con uniones químicas de distinta naturaleza. Esta disposición dificulta el ataque por los microorganismos y por ello es dificultoso extender su degradación (Soest, 1994), además se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (Taiz & Seiger, 2002). La lignina representa una gran reserva de materiales aromáticos sin explotar por las dificultades asociadas con la liberación de estos metabolitos. La acción de los hongos descomponedores de madera ofrece la forma más eficaz de hacer estos productos útiles y más accesibles (Dewick, 2002).

La figura 31 muestra el espectro infrarrojo de los extractos etanólicos de hojas de *E. vespa*, en donde se observaron señales de flavonoides por las señales del grupo fenol a 1261.45 cm^{-1} y 1452.4 cm^{-1} , además del grupo de éster alifáticos a 1710.86 cm^{-1} . En el espectro UV se observaron señales para flavonas a 309.1 nm . En el espectro IR, también se detectan cetonas cíclicas por la señal carbonilo a 1710.86 cm^{-1} y 1693.5 cm^{-1} , y grupo éter a 1099.43 cm^{-1} y 1018.41 cm^{-1} . En este mismo espectro se observa las señales de alcaloides por la presencia de aminas a 3558.67 cm^{-1} y de hidrocarburos por la señal a 2956.87 cm^{-1} . Estos glucósidos pueden corresponder a los observados en la cromatografía en placa fina, mientras que los alcaloides fueron detectados también en el tamizaje fitoquímico.

La figura 32 muestra el espectro infrarrojo del extracto en hexano de las hojas de *E. vespa*, en donde se detectaron señales de ésteres de flavonoles a 1721.54 cm^{-1} y

1721.86 cm^{-1} , además de carbonos de hidrógeno terciarios que corresponden a flavonoides a 2925.17 cm^{-1} . Las cetonas cíclicas se detectaron a 1703.22 cm^{-1} y grupos de hidrocarburos a 2957.97 cm^{-1} que podrían corresponder a los observados en la cromatografía en placa fina. En este mismo espectro se observa la señal de la lignina por el grupo éter a 1019.42 cm^{-1} y 116.83 cm^{-1} , además de la señal intensa del grupo metoxilo 2853.81 cm^{-1} . No se observaron señales de terpenos en este espectro.

El espectro infrarrojo del extracto etanólico de las flores de *E. exasperatum* muestra señales de flavonoides por el grupo fenol a 1410.02 cm^{-1} y los ésteres aromáticos a 1722.51 cm^{-1} y 1268.25 cm^{-1} ; estos flavonoides corresponden a antocianinas, esto fue confirmado por la señal en espectro UV para antocianinas a 253.0 nm (260 a 280 nm) y para flavonoides a 375 nm y 366.0 nm, de acuerdo a Lock (1997) esta absorbancia corresponde al rango de los flavonoides (300-380 nm/240-280 nm). Se observaron éteres a 1101.4 cm^{-1} y el metoxilo de grupos aromáticos a 2848.98 cm^{-1} que corresponde a la lignina observada anteriormente y presente en las partes vegetales de las plantas. También se observaron varias señales de grupos aromáticos a 3031.26 cm^{-1} y con núcleo bencénico o terpenos a 1652.1 cm^{-1} , esto fue confirmado con el tamizaje fitoquímico. La presencia de alcaloides fue confirmada por las señales de aminas a 3551.1 cm^{-1} y 1645.35 cm^{-1} (Fig. 33).

En la figura 34 se observa el espectro infrarrojo del extracto en hexano de las flores de *E. exasperatum*, en donde se detectan señales de ésteres aromáticos, con señal intensa del grupo carbonilo a 1722.51 cm^{-1} y 1248.96 cm^{-1} . También se observa señales de éteres a 1171.81 cm^{-1} y 1019.42 cm^{-1} , el grupo metoxilo de compuestos aromáticos se

detecta a 2858.63 cm^{-1} ; esto podría confirmar la presencia de la lignina en la muestra. Señales finas de cetonas aromáticas se detectan a 1703.22 cm^{-1} y 1102.37 cm^{-1} ; además señales de terpenos se observan a 1445.71 cm^{-1} y 1268.25 cm^{-1} , lo que fue confirmado con el tamizaje fitoquímico.

La figura 35 muestra el extracto etanólico de las flores de *E. vespa*, en donde se observan las señales de flavonoides como antocianinas por el grupo fenol a 1400.32 cm^{-1} y 1261.45 cm^{-1} y por los esteres alifáticos a 1735.93 cm^{-1} y 1168.86 cm^{-1} ; esto fue confirmado por el espectro UV que mostró señales para antocianinas a 280.0 nm y 264.0 nm, además señales de flavonoides a 360.0 nm. La presencia de la lignina se observó por la señal del grupo éter a 1074.35 cm^{-1} y 1205.51 cm^{-1} y el metoxilo a 2883.58 cm^{-1} . Los alcaloides fueron detectados en la muestra por la presencia de señales de amins a 3423.65 cm^{-1} y 1625.99 cm^{-1} , lo que fue confirmado en el tamizaje fitoquímico. Se detectan señales de hidrocarburos a 2924.09 cm^{-1} y 1436.97 cm^{-1} . Se observaron señales de grupos aromáticos a 3307.92 cm^{-1} y de cetonas aromáticas a 1687.71 cm^{-1} .

El espectro infrarrojo del extracto en hexano de las flores de *E. vespa* muestra señales de esteres aromáticos a 1710.93 cm^{-1} y de grupos aromáticos a 3018.73 cm^{-1} . Se detecta nuevamente la presencia de la lignina por los grupos éter a 1261.5 cm^{-1} y metoxilo a 2854.77 cm^{-1} . También se detectan los terpenos con la señal 1694.54 cm^{-1} y 967.34 cm^{-1} , esto fue confirmado por el tamizaje fitoquímico (Fig. 36).

Los compuestos encontrados en las muestras de hojas y flores muestran relación con las mediciones de herbivoría observados. Los porcentajes de herbivoría en las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* no mostraron grandes diferencias, y al realizar el tamizaje y

las pruebas espectroscópicas se encontraron los mismos grupos de metabolitos secundarios en los tres extractos de las hojas de ambas especies. Sin embargo, en las flores se observaron diferencias en el contenido de metabolitos secundarios.

Los compuestos que presentaron reacciones más fuertes en el tamizaje fitoquímico en los tres extractos, tanto en las hojas como en flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* fueron los flavonoides. La presencia de estos metabolitos fue confirmada con el espectro UV y el IR. Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en plantas (Simões *et al.*, 2002), donde desempeñan varias funciones como la protección contra la herbivoría, pigmentación, atracción de polinizadores y la alelopatía; estas propiedades han permitido encontrar compuestos de interés para el control biológico (Castro & Demarco, 2008). Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, además tienen un número de propiedades farmacológicas sobre los sistemas biológicos, y muchas de estas propiedades actúan en beneficio para la salud humana. Las plantas con alto contenido de compuestos fenólicos, son estudiadas en la búsqueda del tratamiento de numerosas enfermedades (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Taiz & Zeiger, 2002).

En hojas y flores de ambas especies de orquídeas, se observaron las flavonas y dihidroflavonol, mientras que solamente en las hojas se observaron flavonoles y chalconas. Las flavonas se encuentran principalmente en las hojas, pero también es posible encontrarla en las flores y en algunas ocasiones dan un sabor amargo a los tejidos; actualmente, las flavonas son de interés en la farmacología ya que incluyen compuestos relevantes por su actividad de fitoestrógenos y antimicrobiana (Drago Serrano, 2007).

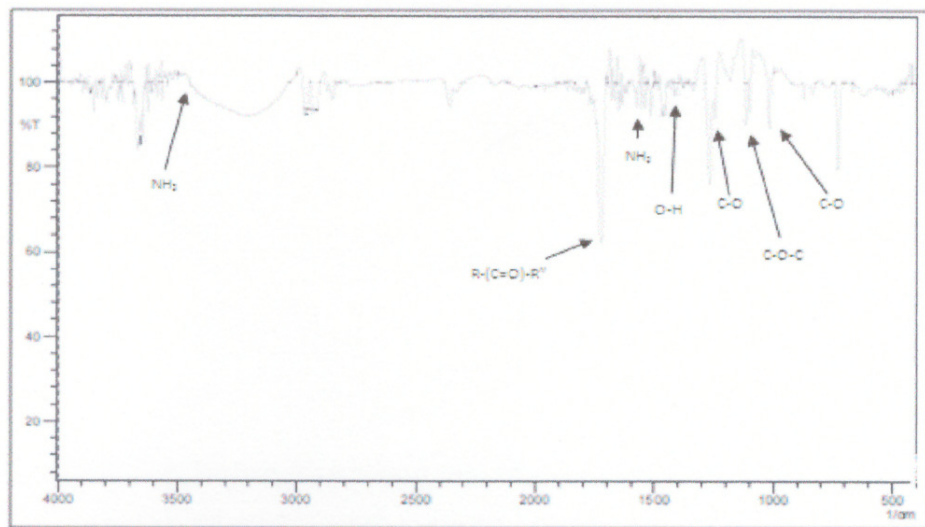


Fig. 29. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de hojas de *E. exasperatum*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 3333.14 (Tensión N-H), 1723.47 (Tensión C=O), 1518.04 (Flexión N-H), 1408.10 (Flexión O-H), 1248.00 (Tensión C-O), 1117.80 (Tensión C-O-C), 1019.42 (Tensión C-O).

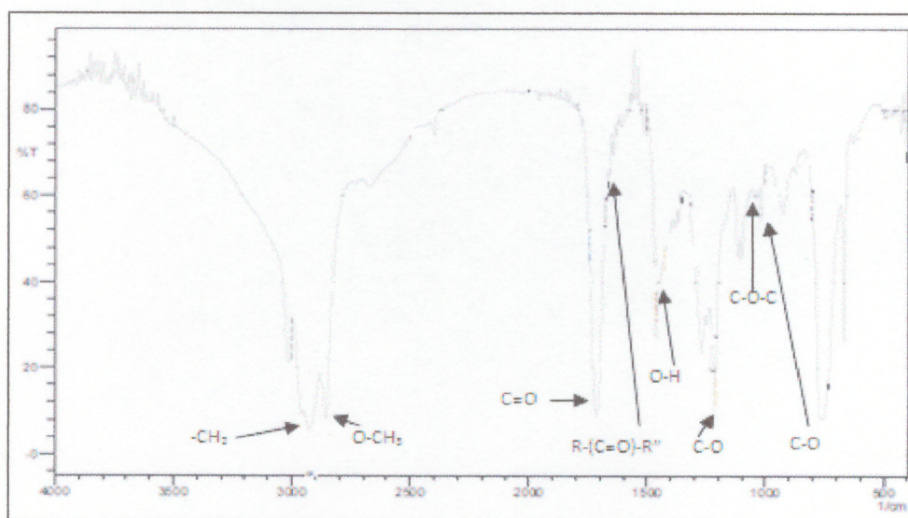


Fig. 30. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de hojas de *E. exasperatum*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 2928.07 (Tensión C-H), 2855.73 (Tensión O-CH₃), 1714.79 y 1666.57 (Tensión C=O), 1410.99 (Flexión O-H), 1216.17 (Tensión C-O), 1070.54 (Tensión C-O-C), 1019.42 (Tensión C-O).

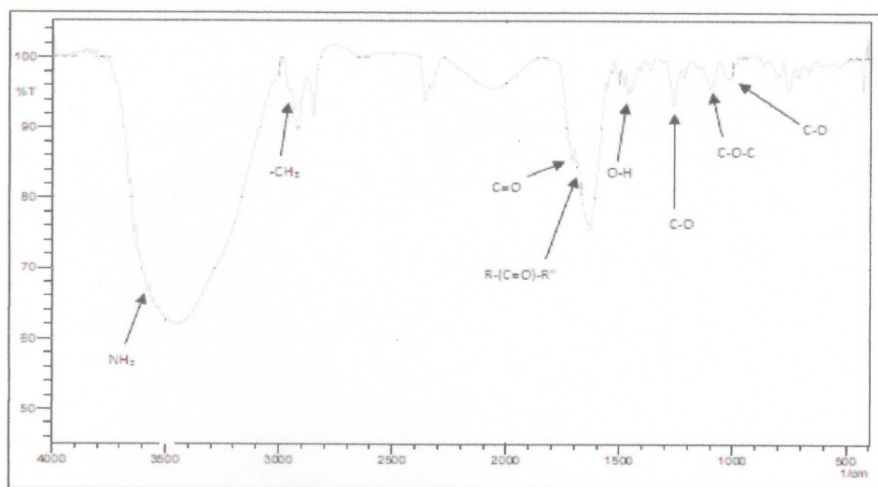


Fig. 31. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de hojas de *E. vespa*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 3558.67 (Tensión N-H), 2956.87 (Tensión C-H), 1710.86 (Tensión C=O), 1693.5 (Tensión C=O), 1452.4 (Flexión O-H), 1261.45 (Tensión C-O), 1099.43 (Tensión C-O-C), 1018.41 (Tensión C-O).

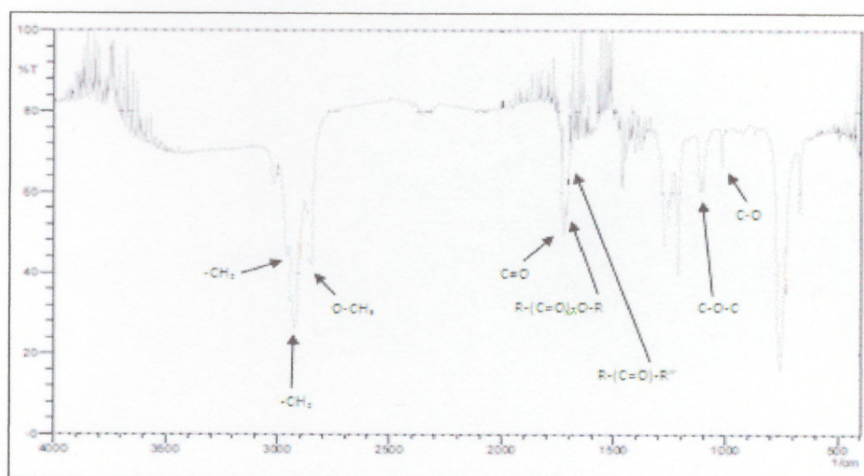


Fig. 32. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de hojas de *E. vespa*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 2957.97 (Tensión C-H), 2925.17 (Tensión C-H), 2853.81 (Tensión O-CH₃), 1721.54 y 1712.86 (Tensión C=O), 1703.22 (Tensión C=O), 1116.83 (Tensión C-O-C), 1019.42 (Tensión C-O).

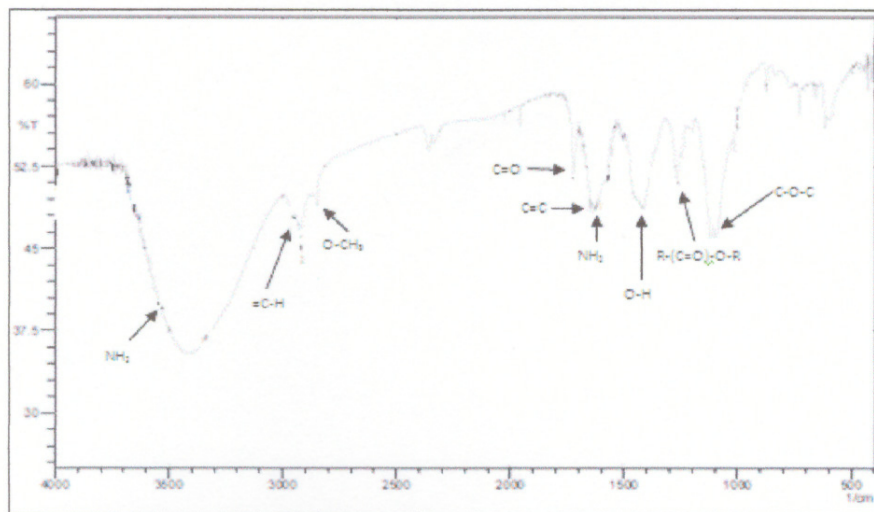


Fig. 33. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de flores de *E. exasperatum*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 3551 (Tensión N-H), 3031.26 (Tensión =C-H), 2848.98 (Tensión O-CH₃), 1722.51 (Tensión C=O), 1652.1 (Tensión C=C), 1645.35 (Flexión N-H), 1410.02 (Flexión O-H), 1268.25 (Tensión C-O-C), 1101.4 (Tensión C-O-C).

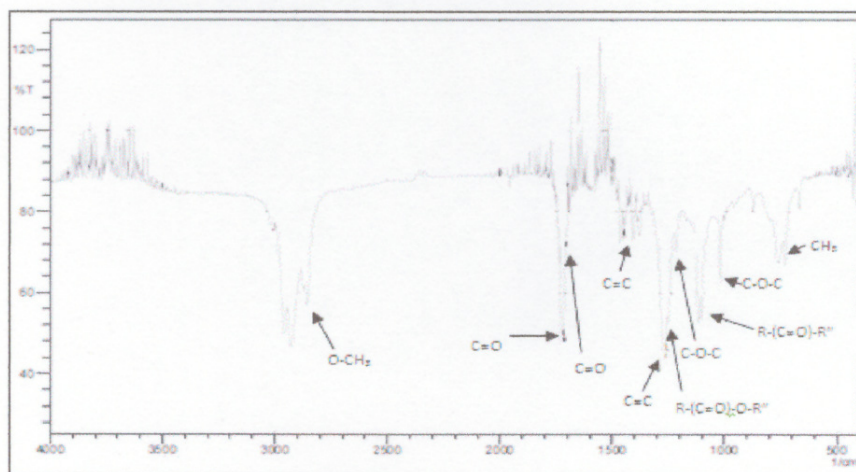


Fig. 34. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de flores de *E. exasperatum*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 2858.63 (Tensión O-CH₃), 1722.51 (Tensión C=O), 1703.22 (Tensión C=O), 1445.71 (Tensión C=C), 1268.25 (Flexión en el plano C=C), 1248.96 (Tensión C-O-C), 1171.81 (Tensión C-O-C), 1102.37 (Flexión C-C-C), 1019.42 (Tensión C-O), 731.05 (Tensión C-H).

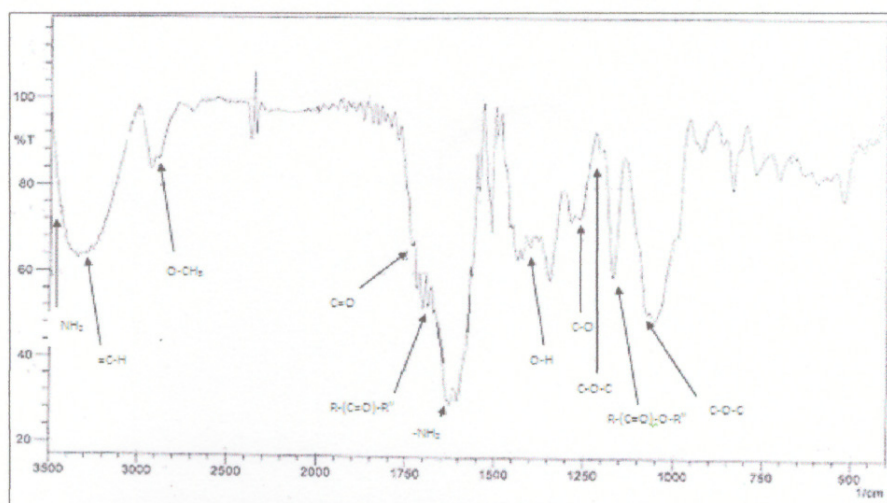


Fig. 35. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto etanólico de flores de *E. vespa*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 3423.65 (Tensión N-H), 3307.92 (Tensión =C-H), 2883.58 (Tensión O-CH₃), 1735.93 (Tensión C=O), 1687.71 (Tensión C=O), 1625.99 (Flexión N-H), 1400.32 (Flexión O-H), 1261.45 (Tensión C-O), 1205.51 (Tensión C-O-C), 1168.86 (Tensión C-O-C) 1074.35 (Tensión C-O).

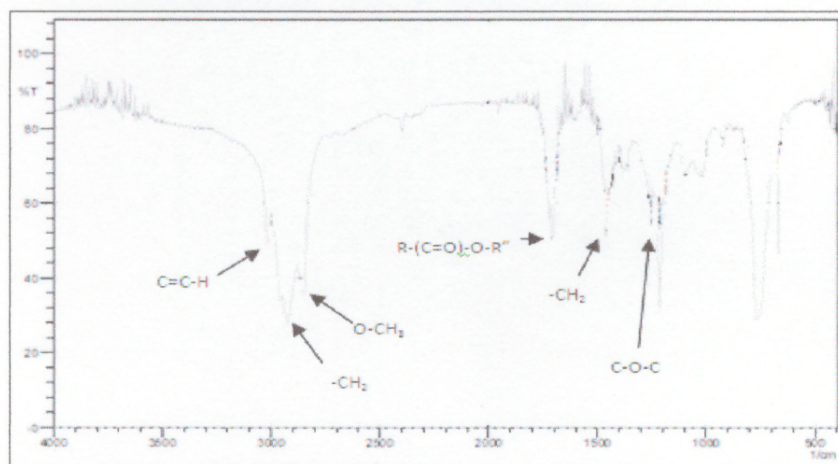


Fig. 36. Principales señales del espectro infrarrojo de extracto en hexano de flores de *E. vespa*: IR (KBr) $\tilde{\nu}$ cm^{-1} 3018.73 (Tensión =C-H), 2926.14 (Tensión C-H), 2854.77 (Tensión O-CH₃), 1710.93 (Tensión C=O), 1465.96 (Tensión C-H), 1261.5 (Tensión C-O-C).

Los dihidroflavonoles, son precursores de los flavonoles y otros flavonoides, pero también llevan a cabo funciones de defensa en las plantas. Los flavonoles, como la quercitina han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes y de defensa, mientras que las chalconas cuentan con diversas propiedades biológicas, las cuales están determinadas dependiendo de la sustitución en los anillos aromáticos en la estructura (Martínez, 2005).

Otro grupo importante de flavonoides encontrados en las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* son los taninos, los cuales se encuentran en las vacuolas y principalmente en las hojas. Los taninos son una de las mayores clases de defensas a base de carbono, que reducen la digestibilidad de los alimentos para los herbívoros. En general se sabe, que los taninos condensados se encuentran principalmente en las hojas, como se observó en nuestros resultados, y que estos compuestos están relacionados con el aumento de la dureza foliar, reduciendo los niveles de herbivoría. Mientras que en las flores de ambas especies, se encontraron taninos hidrolizables que se encuentran principalmente en partes más blandas de las plantas, en donde algunas veces hay mayor herbivoría (Feeny, 1970; Hunter & Schultz, 1995).

A través de las pruebas espectroscópicas fue posible identificar la presencia de lignanos en las hojas y flores de ambas orquídeas; la lignina impregna las paredes celulares, dando fuerza estructural a la planta y proporcionándole una barrera contra el ataque de herbívoros y patógenos. Otro grupo de metabolitos identificado en todos los extractos, fueron las cumarinas, que se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas, y tallos, aunque la mayor concentración se encuentra en

general en frutos y flores; funcionan como defensoras para la planta ya que posee propiedades supresoras del apetito, lo que explicaría su extensión generalizada (Castro & Demarco, 2008).

En las hojas se distinguieron a través del tamizaje fitoquímico la presencia de carotenoides, mientras que las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* se determinó la presencia de antocianinas. Ambos constituyen pigmentos fotosintéticos, sin embargo, los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides formados por ocho unidades de isopreno (C₅H₈), con un sistema de dobles enlaces conjugados lo que otorga intensos colores; mientras que las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico (Aichele Alvarado, 2006).

El grupo de los alcaloides fue detectado en todos los extractos de hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, son compuestos nitrogenados que pueden estar presentes en diferentes partes de la planta, sin embargo, mayormente en los tejidos en crecimiento. Muchos alcaloides se describen como tóxicos, ya que actúa contra los herbívoros y parásitos, además de tener efecto alelopático. Los alcaloides son altamente específicos para las especies de plantas o grupo de especies en las que se encuentran y son efectivos en pequeñas cantidades (Stephenson, 1981; Simões & Schenkel, 2002).

Los terpenos fueron identificados con el tamizaje fitoquímico en todos los extractos de hojas y flores de ambas orquídeas; sin embargo en las hojas se identificaron señales de los carotenoides; mientras que en las flores se observaron varias señales en pruebas espectroscópicas de varios compuestos aromáticos como ésteres, monoterpenos y

triterpenos. Los terpenos detienen a los herbívoros y reducen el crecimiento de las bacterias y de los hongos; además a través de los aceites esenciales son responsables de las características de sabor y aroma que disuaden o atraen a insectos herbívoros. En el caso de las flores de orquídeas, la presencia de compuestos aromáticos es relevante, ya que se sabe que las orquídeas emiten grandes cantidades de monoterpenos atrayentes cuando no han sido polinizadas y repelentes cuando lo han sido; en otros casos y en respuesta a la herbivoría, los emiten para atraer a los enemigos naturales de los herbívoros que las atacan (Roubik & Hanson, 2004).

Las flores de *E. exasperatum* fueron las únicas en donde se detectaron las saponinas, lactosas sequiterpénicas, los glucósidos cardiotónicos y grupos 5-hidroxi-flavona. Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, son tóxicas y se encuentran principalmente en monocotilédneas en distintas concentraciones, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo. Las lactosas sequiterpénicas están implicadas en la disuasión alimentaria por herbívoros, mientras que los glucósidos cianogénicos no son tóxicos mientras se mantenga unido a un azúcar; en el momento en el que se elimina, el compuesto se vuelve muy inestable y da lugar a cianuro (Granados-Sánchez *et al.*, 2008).

La proporción de los metabolitos secundarios producidos por las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* presentan variaciones que dependen del hábitat, la precipitación, la insolación, el suelo, la estacionalidad, entre otras características, incluyendo el momento de la recolección. Por consiguiente, existe un considerable

número de variables que debe ser abordado en estudios posteriores que implican la medición de los metabolitos detectados, con el fin de establecer los grupos que se encuentran principalmente involucrados en la defensa en estas plantas (Roberts, 2007).

El análisis fitoquímico realizado a las hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* sugiere que en la familia Orchidaceae existe una variabilidad que ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de una planta, lo cual es parte de la estrategia de adaptación y defensa de estas plantas ante los herbívoros (Sepúlveda Jiménez *et al.*, 2003).

6.3 RESULTADOS DE LA EVALUACION DE LA PREFERENCIA DE HERBIVOROS POR HOJAS Y FLORES

En general se sabe, que existen varios grupos de insectos masticadores que causan daños en las orquídeas, sin embargo son pocos los estudios que han establecido daños o preferencias de especies de la familia Formicidae en las orquídeas. Algunos autores señalan daños directos que causan estas especies sobre las partes más blandas de las orquídeas (Rivera & Corrales, 2007) y en algunas ocasiones daños indirectos (Salazar, 2009).

Al realizar las pruebas de preferencia con las muestras de hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* se observó un mayor promedio de hormigas que visitaba las muestras frescas y los extractos etanólicos. Los extractos metanólicos y en hexano de las hojas de ambas especies mostraron un menor promedio de visitas de hormigas. Además las muestras

blancos (disolventes) no presentaron ninguna visita de las hormigas en el tiempo de observación. Sin embargo, el análisis general no mostró diferencias significativas en la preferencia de las hormigas por las muestras de hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*, ($F_{1,10} = 0.181$; $P > 0.05, 0.682$) (Fig. 37).

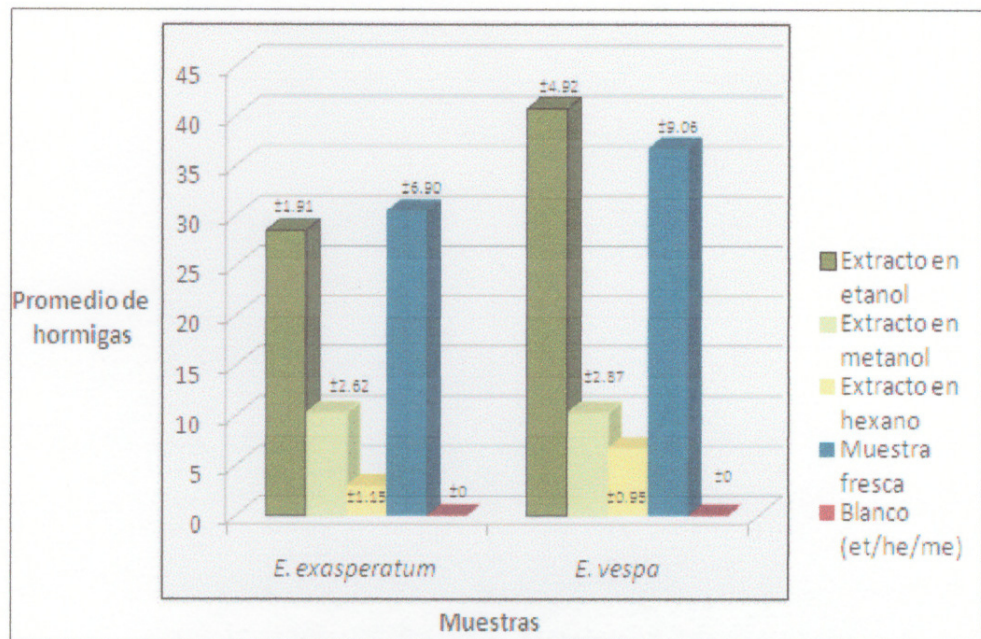


Fig. 37. Resultados de pruebas de preferencia de *A. coronatus* para muestras de hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Error estándar en la parte superior de cada barra.

Al examinar los resultados de las pruebas de preferencia, se pudo observar que en las hojas no existe una preferencia de alimentación por una de las dos orquídeas; sin embargo se observaron variaciones en la preferencia por cada muestra. La mayor preferencia fue hacia las hojas frescas; esto se explica, porque en la naturaleza las hormigas del género *Acromyrmex* forrajean y recolectan recursos para su jardín fúngico,

que constituye la fuente de alimento para las futuras generaciones; sin embargo los adultos que forrajean complementan su dieta con porcentajes variables de savia vegetal fresca, que puede comprender hasta un 90 % de su dieta (Roces & Bollazzi, 2009).

La savia fresca que necesitan las hormigas del género *Acromyrmex* la obtienen de diversas fuentes; sin embargo, algunas especies se han especializado para consumir las hojas duras y fibrosas de monocotilédneas. Esto explicaría, porque *A. coronatus* constituye uno de los mayores herbívoros para las hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa*, sin embargo la plasticidad que demuestran para el forrajeo puede llevarlas a preferir otras fuentes alimentarias, pudiendo ser selectivas u oportunistas dependiendo de la abundancia y palatabilidad de los recursos (Franzel & Farji Brenner, 2000).

En el análisis de las pruebas de preferencia de *A. coronatus* por muestras de flores se observó un mayor promedio de visitas de hormigas a las muestras de flores de *E. vespa*. Sin embargo, el análisis estadístico (especificar cual análisis estadístico se utilizó) no mostró diferencias significativas en el promedio de visitas de las hormigas a las muestras de flores ($F_{1, 8} = 1.466$; $P > 0.05$, 0.0.271). Además se observaron resultados similares a las hojas, ya que los extractos etanólicos de flores de ambas especies fueron los más visitados en comparación con los extractos metanólicos y en hexano. En las muestras blancos (disolventes) no se registraron visitas de hormigas (Fig. 38).

Las flores constituyen una fuente de alimentación que impone menos restricciones físicas para el forrajeo, ya que ofrecen facilidad de corte por su baja fuerza de fractura (Folgarait *et al.*, 1996). Esto explicaría la marcada preferencia de las hormigas hacia las muestras de flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Sin embargo, la química de las muestras

podría influir en la preferencia de las hormigas hacia las flores de *E. vespa* y el mayor daño por herbivoría en las flores; ya que las hormigas eligen recursos que no tengan gran cantidad de metabolitos secundarios que podrían afectar al hongo simbionte, ya que algunos metabolitos como alcaloides, terpenos y taninos son antifúngicos y/o fungistáticos (Wetterer, 1995).

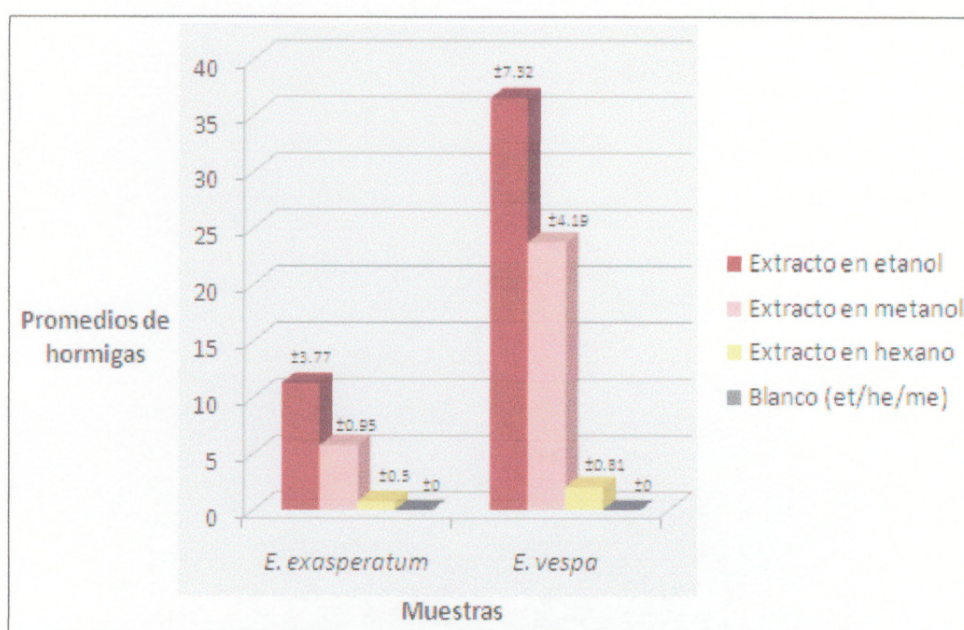


Fig. 38. Resultados de pruebas de preferencia de *A. coronatus* para muestras de flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Error estándar la parte superior de cada barra.

En el análisis químico realizado a las flores de ambas orquídeas, se determinó una mayor cantidad de metabolitos secundarios en las flores de *E. exasperatum*, en especial terpenos y otros compuestos aromáticos. Esto es importante, ya que las hormigas *A.*

coronatus tienden a rechazar materiales que son tóxicos para la colonia y prefieren materiales con menos concentración de ciertos metabolitos. Además, los compuestos como terpenos tienden a ser extraídos mejor en hexano que en otros disolventes, lo que explicaría el menor promedio de visitas de las hormigas a los extractos en hexano, mientras que en los extractos etanólicos se observaron manchas de glúcidos o azúcares, que son recursos que atraen a las hormigas (Tinti & Nofre, 2001).

Aunque en algunos casos, las forrajeras de *A. coronatus* acarrearon muestras de hojas y flores en hexano hacia el nido, Ridley *et al.* (1996) señalan que luego de detectar metabolitos nocivos, las hormigas tienden a dejar de recolectarlo y el rechazo se mantiene por varias semanas.

En general, las muestras de disolventes utilizados como blancos fueron evitadas por las hormigas ya que estas especies aprenden a identificar y rechazar compuestos nocivos rápidamente. Esto es importante, ya que durante el estudio se observó que el mayor número de visitas fue durante los primeros 15 minutos, luego las visitas disminuyeron.

CONCLUSIONES

- ❖ En relación a los resultados obtenidos en este estudio y de acuerdo a las condiciones en las que fueron realizados los análisis, se podría concluir que:
- ❖ Los porcentajes de herbivoría en las hojas no mostraron diferencias significativas entre *E. exasperatum* y *E. vespa*, sin embargo fueron relativamente bajos (menores al 2%). Además, se observaron diferencias en la herbivoría por estacionalidad con una mayor herbivoría en los meses de Enero y Febrero, lo cual podría estar relacionado con la actividad de los herbívoros y la inversión de recursos de estas plantas para mantenerse ante situaciones de estrés hídrico.
- ❖ Los bajos porcentajes de herbivoría en las hojas y la poca preferencia de herbívoros como *A. coronatus*, está relacionado con menor porcentaje de agua para procesar y digerir los alimentos, el contenido de material mineral que imponen limitaciones en el rango de crecimiento y alimentación de insectos herbívoros, poca concentración de nutrientes como nitrógeno y fósforo lo que reduce la calidad nutricional, y la presencia de metabolitos secundarios que disuaden a los herbívoros y reducen la digestibilidad.
- ❖ En cuanto al análisis de metabolitos secundarios y compuestos, en los extractos de hojas de *E. exasperatum* y *E. vespa* no se observaron diferencias en el contenido; en donde se identificaron flavonoides (flavonas, flavonoles, chalconas, dihidroflavonoles, lignanos y taninos condensados), pigmentos carotenoides, alcaloides, terpenos, cetonas alifáticas y glucósidos.

- ❖ Se demostró que existe una preferencia de los herbívoros hacia partes más blandas como las flores, ya que contienen mayor porcentaje de agua nutricional, menor contenido de minerales que podrían reducir la palatabilidad de los herbívoros y concentraciones de nitrógeno y fosforo que aumentan el valor nutricional de las flores.
- ❖ La herbivoría entre las flores de *E. exasperatum* y *E. vespa* mostró diferencias significativas, ya que el mayor número de flores con daño se observó en *E. vespa*, mientras que en *E. exasperatum* el mayor número de las flores observadas no mostraron daños. Estas diferencias entre especies, pueden estar relacionadas con el contenido de metabolitos secundarios implicados en la disuasión de herbívoros.
- ❖ El mayor daño en *E. vespa* fue en pétalos y sépalos, seguido de estructuras críticas de reproducción (columna), mientras que los daños en *E. exasperatum* fueron mayores en el raquis de la flor y daños parciales en pétalos y sépalos. En las flores de ambas especies se observó que existe una preferencia de los herbívoros hacia los pétalos, que son áreas importantes en la atracción de polinizadores, más que a áreas dedicadas exclusivamente a la reproducción; esto es importante porque impone limitaciones para la atracción de polinizadores efectivos y por tanto influye en la supervivencia de estas especies de orquídeas.
- ❖ En los extractos de flores de ambas especies de orquídeas fueron identificados flavonoides (flavonas, dihidroflavonoles, lignanos y taninos hidrolizables), pigmento antocianinas, alcaloides, cetonas aromáticas, glucósidos, terpenos,

varias señales de grupos aromáticos y con núcleo bencénico, en especial en las flores de *E. exasperatum*.

- ❖ Los flavonoides identificados están implicados en efectos de alelopatía, los terpenos son compuestos que pueden influir en la disuasión de herbívoros, mientras que los alcaloides y cumarinas son compuestos tóxicos.
- ❖ Los metabolitos glucósidos cardiotónicos, lactosas sequiterpénicas y saponinas fueron identificadas solamente en los extractos de las flores de *E. exasperatum*. Estos metabolitos están implicados en la disuasión alimentaria de los herbívoros y en algunos casos resultan compuestos tóxicos, lo cual podría explicar porque las flores de *E. exasperatum* mostraron poco o ningún daño y la menor preferencia por *A. coronatus*.
- ❖ En términos generales, *A. coronatus* forrajea hojas y flores de *E. exasperatum* y *E. vespa*, ya que parece estar adaptada a forrajear hojas duras y fibrosas de orquídeas y partes blandas con facilidad de corte como las flores. Se observó una mayor preferencia de hormigas *A. coronatus* hacia las muestras frescas y los extractos etanólicos de las hojas de ambas especies de orquídeas, ya que la savia fresca constituye la fuente principal de recursos para alimentación y el etanol extrae azúcares que atraen a las hormigas. Además los extractos de flores de *E. vespa* fueron más visitadas por *A. coronatus*, debido a la menor presencia de metabolitos secundarios que son detectados por las hormigas y que pueden ser nocivos para la colonia.

RECOMENDACIONES

- ❖ En base a los resultados obtenidos se recomienda realizar estudios para determinar los efectos de la herbivoría en el crecimiento y reproducción de *E. exasperatum* y *E. vespa*, y su relación con los procesos de defensa en las orquídeas ante herbívoros y patógenos.
- ❖ Adicionalmente se recomienda realizar otras pruebas bioquímicas para el aislamiento e identificación de los compuestos involucrados en la defensa vegetal de *E. exasperatum* y *E. vespa*. Desafortunadamente, existen pocos estudios sobre los metabolitos secundarios que producen las orquídeas para la defensa, por lo que se subraya la necesidad de contar con bibliotecas químicas para la identificación de los compuestos de interés.
- ❖ Otra recomendación es ampliar las pruebas de herbivoría y de preferencias de las hormigas hacia ciertos compuestos, para establecer la posibilidad de la utilización de estas plantas como distractoras y/o para la disuasión de herbívoros, lo cual es una alternativa amigable con el ambiente y que podría desarrollarse con otras especies de orquídeas bajo las mismas condiciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOUR, A. & A. MUÑOZ. 1997. Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro* de germoplasma de orquídeas en vías de extinción. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación y Extensión. 4-10 pp.
- AICHELE-ALVARADO, X. 2006. Efecto de la radiación UV-B en la síntesis de pigmentos protectores y fotosintéticos en plántulas de *Aextoxicon punctatum*. Tesis de química farmacéutica. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 93 pp.
- AIDE, T. M., & J. K. ZIMMERMAN. 1990. Patterns of insect herbivory, growth, and survivorship in juveniles of a neotropical liana. *Ecology*, 1412-1421 pp.
- ALVARADO, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de Costa Rica. 92 pp.
- ANDERSEN, K.M., TURNER, B. & J. DALLING. 2009. Soil-based habitat partitioning in understory palms in lower montane tropical forests. *Journal of Biogeography*.
- AOAC. 1998. Official methods of analysis 17th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- ARDITTI, J. 1992. Fundamentals of orchid biology. Wiley-Interscience, New York. 691 pp.
- ASHMAN, T. L. 2002. The role of herbivores in the evolution of separate sexes from hermaphroditism. *Ecology*, 83(5): 1175-1184 pp.
- AULT A., 1998. Techniques and Experiments for Organic Chemistry. University Science. Books. USA.

- AUTORIDAD NACIONAL DEL AMBIENTE. Dirección de Áreas Protegidas y Vida Silvestre. Obtenido de: <http://www.contraloria.gob.pa/inec/archivos/P516172.pdf>. Consultado: 16 de septiembre de 2013.
- AYALA, SILVIO. 2007. Manual de Laboratorio de Bioquímica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 7-8 pp.
- BALDWIN, I. 1994. Chemical changes rapidly induced by folivory, In: Insect Plant Interactions. (ed. Bernays E.). Boca Raton, CRC Press. Estados Unidos. 1-23 pp.
- BARBOSA, P. & WAGNER, M. R. 1989. Introduction to Forest and Shade Tree Insects. Academic Press. San Diego. 514 pp.
- BARONE, J. A., & P. D. COLEY. 2002. Herbivorismo y las defensas de las plantas. In: Ecología y conservación de bosques neotropicales (eds. Guariguata, M & G. Kattan). Libro Universitario Regional. Cartago, Costa Rica. 465-492 pp.
- BASU, K., GUPTA, B., BHATTACHARYA, S. LAL, R. & P. DAS. 1971. Antiinflammatory principles of *Vanda roxburghii*. *Curr. Sci.*, 40-86 pp.
- BATANERO, P. & A. MEDEL 1985. Química Analítica Básica. Ediciones Simancas, S.A. Colombia. 152 pp.
- BELL, E.A. 1974. Control Plant Insects. Institute of Biology. University of California. 403 pp.
- BENZING, D. 1990. Vascular epiphytes: general biology and related biota. Cambridge University Press. New York. 346 pp.
- BENZING, D. H., & D. W. OTT. 1981. Vegetative reduction in epiphytic Bromeliaceae and Orchidaceae: its origin and significance. *Biotropica*, 13 (2): 131-140 pp.

- BERRYMAN, A. 1988. Towards a unified theory of plant defense. In: Mechanisms of Woody plant Defense Against Insects (eds. Mattson W., Levieux J. & C. B. Bernard Dagon) Springer Verlag. New York. 39-55 pp.
- BILBAO, M. 1997. Procedimiento para análisis fitoquímico preliminar. Armenia, Universidad del Quindío. 3 -99 pp.
- BOLSER, R.C., HAY, M.E., LINDQUIST, N., FENICAL, W. & D. WILSON. 1998. Chemical defenses of freshwater macrophytes against crayfish herbivory. *J. Chem. Ecol.*, 24: 1639-1658 pp.
- BRAEKMAN, J. C., DALOZE, D. & J. PASTEELS. 1998. Alkaloids in animals. In Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications (eds. M.F. Roberts and M. Wink). New York. 349-78 pp.
- BREADMORE, K.N. & KIRK, W.D.J. 1998. Factors affecting floral herbivory in a limestone grassland. *Acta Oecol.*, 19, 501-506.
- BRUNETON J. 2001. Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. Editorial Acribia. España. 523 pp.
- BURGESS, K.H. 1991. Florivory: the ecology of flower feeding insects and their host plants. Thesis Postdoral, Universidad de Harvard. Cambridge, MA. 362 pp
- CASTRO, M. D. M., & D. DEMARCO. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications*, 3(8): 1273-1284 pp.
- CERVANTES REYES, M. 2008. Evaluación farmacológica de *Prosthechea michuacana* (Orchidaceae), especie de Potencial agronómico. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politecnico Nacional. México. 58 pp.

- CHACÓN, J. 2002. Identificación de los virus que afectan orquídeas nativas en dos viveros del Valle Central de Costa Rica. Tesis de Lic. Biol. Universidad de Costa Rica. 79 pp.
- CHOPRA, R., NAYAR, S. & I. CHOPRA. 1956. Glossary of Indian medicinal plants. C.S.I.R. New Delhi. 216-219 pp.
- CINGEL, N. 2001. An Atlas of Orchid Pollination: America, Africa, Asia and Australia. A. Balkema Publishers. Londres. 296 pp.
- CIPOLLINI, L. & D. J. LEVEY. 1997. Secondary metabolites of fleshy vertebrate-dispersed fruits: adaptive hypotheses and implications for seed dispersal. *Amer. Naturalist*, 150: 346-73 pp.
- COLEY, P.D. 1981. Ecological and evolutionary responses of tropical trees to herbivory: a quantitative analysis of grazing damage, plant defenses, and growth rates. University of Chicago. Chicago. 130 pp.
- COLEY, P. D. 1982. Rates of herbivory on different tropical trees. The ecology of a tropical forest. Smithsonian Institution Press. Washington. 123-132 pp.
- COLEY, P. D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*. 53: 209-33 pp.
- COLEY, P. D., BRYANT, J. P., & F. S. CHAPIN III. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defenses. *Science*. 230: 895-899 pp.
- COLEY, P.D. & J.A. BARONE. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27:305-335 pp.
- COLEY, P.D. & T.M. AIDE. 1991. Comparison of herbivory and plant defenses in temperate and tropical broad-leaved forests. In: Plant-Animal Interactions:

- Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions, (eds. Price, P., Lewinsohn, T., Fernandes, G. & W. Benson). Wiley & Sons. NY. 25-49 pp.
- COLEY, P.D., BRYANT, J. & S. CHAPIN. 2007. Disponibilidad de recursos y defensas de las plantas frente al herbivorismo. En: Ecología y Evolución de los trópicos (eds. E. G. Leigh, E.A.Herre, J. Jackson, F. Santos-Granero). Smithsonian Tropical Research Institute. 49-57 pp.
- CORRALES, G. & G. RIVERA. 2003. Principales artrópodos asociados con colecciones y viveros de orquídeas en la región del pacífico sur de Costa Rica. Memoria. In: Congreso Alianza Tecnológica para la Agricultura con Calidad. Costa Rica. 54 pp.
- CORREA, M., C. GALDAMES & M. STAPP. 2004. Catálogo de plantas vasculares de Panamá. Editorial Novo Art, S.A. Panamá. 599 pp.
- CRANKSHAW, D.R. & J.H. LANGENHEIM. 1981. Variation in terpenes and phenolics through leaf development in *Hymenaea* and its possible significance to herbivory. *Biochemistry System Ecology*. 9: 115-124 pp.
- CRAWLEY, M. J. 1983. Herbivory. University of California Press, Berkeley. 542 pp.
- CROSS, W. F., BENSTEAD, J. P., ROSEMOND, A. D., & J. BRUCE WALLACE. 2003. Consumer-resource stoichiometry in detritus-based streams. *Ecology Letters*, 6(8):721-732 pp.
- DARWIN, C. R. 1862. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing. *London: John Murray*. 365 pp
- DE CRAENE, L. R., & A. G. MILLER. 2004. Floral development and anatomy of *Dirachma socotrana*, (Dirachmaceae): a controversial member of the Rosales. *Plant Systematics and Evolution*, 249(1-2) 111-127 pp.

- DE MORAES, C. M., LEWIS, W. J., PARÉ, P. W., ALBORN, H. T. & J. H. TUMLINSON. 1998. Herbivore infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393: 570–73 pp.
- DÉCIGA-CAMPOS, M., PALACIOS-ESPINOSA, J., REYES-RAMÍREZ, A. & R. MATA. 2007a. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *J. Ethnopharmacol.* En prensa.
- DÉCIGA-CAMPOS, M., RIVERO-CRUZ, I., ARRIAGA-ALBA, M., CASTAÑEDA-CORRAL, G., ANGÉLES-LÓPEZ, G., NAVARRETE, A. & R. MATA. 2007b. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol*, 110: 334-342 pp.
- DEVERALL, B.J. 1977. Defense Mechanisms of Plants. Cambridge University Press. New York. 240 pp.
- DEWICK, P. 2002. Medicinal Natural Products. Segunda Edición. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. 507 pp.
- DIRZO, R. 1984. Herbivory: a phytocentric overview. *In: Perspectives in plant population ecology* (eds. Dirzo, R. y J. Sarukhán). Sinauer. Associates Publishers. Sunderland. Massachussets. 141–165 pp.
- DIRZO, R. 1986. Insectos y plantas: protagonistas de una historia de la vida. Secretaría de Educación Pública. Dirección General de Publicaciones y Medios. 1ª. Edición. México, D.F. 326 pp.
- DIRZO, R. 1987. Estudios sobre interacciones planta–herbívoro en Los Tuxtlas, Veracruz. En: *Ecología y ecofisiología de plantas en los bosques mesoamericanos* (eds. Clark, D. A., R. Dirzo, N. Fetcher). Sinauer Associates Publishers. 119–131 pp.

- DODSON, C.H. 1975. Coevolution of orchids and bees. In: Coevolution of animal and plants (eds. Gilbert L. & P. H. Raven). University of Texas Press. Austin, Texas, U.S.A. 91-99 pp.
- DOMÍNGUEZ, X. 1978. Experimentos de química general e inorgánica. Editorial Limusa. México. 174 pp.
- DRAGO SERRANO, M. 2007. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4): 42-47 pp.
- DRESSLER, R. 1990. The orchids natural history and classification. Segunda Edición. Harvard University Press. Estados Unidos. 332 pp.
- DRESSLER, R. 1993. Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. Segunda Edición. Cornell University Press. Estados Unidos. 374 pp.
- DYER, J. 1965. Application of Absorption Spectroscopy of Organic Compounds. Prentice Hall, Inc. 511 pp.
- EHRlich, P.R. & P.H. RAVEN. 1964. Butterflies and plants: a study in co-evolution. *Evolution*. 18: 586-608 pp.
- ELSER, J. J., ACHARYA, K., KYLE, M., COTNER, J., MAKINO, W., MARKOW, T., & R. W. STERNER. 2003. Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters*, 6(10): 936-943 pp.
- FEENY, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*. 51: 565-581 pp.
- FEENY P. 1976. Plant apparency and chemical defense. In: Biochemical interactions between plants and insects (eds. Wallace J & R. Mansell). Plenum Press. New York. 40 pp.

- FERREIRA SANTOS, A. 2010. Nutrição e fertilização de orquídeas: Estudo de caso, *Cattleya walkeriana*. Núcleo de Pesquisa e Conservação de Orquídeas. Universidad e Federal de Viçosa (NPCO – UFV). Editorial Viçosa-MG. Brasil. 12 pp.
- FILIP, V., DIRZO, R., MAASS, J. M. & J. K. SARUKHÁN. 1995. Within and among year variation in the levels of herbivory on the foliage of trees from a Mexican tropical deciduous forest. *Biotropica*. 27: 78–86 pp.
- FINCH, S. & R. H. COLLIER. 2003. “Insects can see clearly now the weeds have gone”. *Biologist*, 50 (3): 132-135 pp.
- FOLGARAIT, P. J., DYER, L. A., MARQUIS, R. J., & H. E. BRAKER. 1996. Leaf-cutting ant preferences for five native tropical plantation tree species growing under different light conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80(3): 521-530 pp.
- FRANZEL, C., & A. G. FARJI-BRENER. 2000. ¿Oportunistas o selectivas? Plasticidad en la dieta de la hormiga cortadora de hojas *Acromyrmex lobicornis* en el noroeste de la Patagonia. *Ecología Austral*, 10: 159-168 pp.
- GARBEY, P. 2009. Tus orquídeas: secretos de su cultivo y cuidado. Obtenido de: http://www.tusorquideas.com/crecimiento-de-las-orquideas-leccion-4_i37.html. Consultado el 4 de septiembre de 2013.
- GARÍN AGUILAR, Ma. E. 2010. Manual de prácticas de productos naturales. Instituto politécnico nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. México. 55 pp.
- GÓMEZ, N. 2001. ¿Cómo se defienden las plantas de sus enemigos?. En Panamá: Puente Biológico (ed. Heckadon- Moreno S.). Panamá Puente Biológico. Instituto Smithsonian Tropical Research. Panamá. Imprelibros, S.A. 98-103 pp.

- GONZÁLEZ, F. 1995. Orquídeas de Costa Rica y su cultivo: Vol 1. *Cattleya* y géneros relacionados. Asociación Costarricense de Orquideología. Litografía e Imprenta LIL. San José, Costa Rica 4-5 pp.
- GRANADOS-SÁNCHEZ, D., RUIZ-PUGA, P. & H. BARRERA-ESCORCÍA. 2008. Ecología de la Herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Ambiente*. 14: 51-63 pp.
- GUEVARA, M.; ORTEGA, R. & I. LEANDRO. 2009. Identificación preliminar de pigmentos presentes en *Gardenia* (*Gardenia jasmoides*). Congreso de Investigación Académica Journals.com, Volumen VI Ciencias y Matemáticas, Universidad Veracruzana, México.
- HAMMEL, B. E., GRAYUM, M.H., HERRERA, C. & N. ZAMORA. 2003. Manual de plantas de Costa Rica. Vol. III. Missouri Botanical Garden Press. Estados Unidos. 694 pp.
- HARPER, J. L. 1977. Population biology of plants. Academic Press, New York. 465 pp.
- HERNÁNDEZ-ROMERO, Y., ACEVEDO, L., SÁNCHEZ, M., SHIER, W., ABBAS, H. & R. MATA. 2005. Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 6276-6280 pp.
- HÖLLDOBLER, B., & E. O. WILSON. 1990. Host tree selection by the neotropical ant *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Formicidae). Selección del árbol hospedero por parte de la hormiga bala *Paraponera clavata* (Hymenoptera: Formicidae). *Biotropica.*, 22(2): 213-214 pp.
- HUBERTY, A. F., & R. F. DENNO. 2006. Consequences of nitrogen and phosphorus limitation for the performance of two planthoppers with divergent life-history strategies. *Oecologia*, 149(3): 444-455 pp .

- HUNTER, M. D., & J. C. SCHULTZ. 1995. Fertilization mitigates chemical induction and herbivore responses within damaged oak trees. *Ecology*, 1226-1232 pp.
- IRWIN, R. E., ADLER, L. S., & A. K. BRODY. 2004. The dual role of floral traits: pollinator attraction and plant defense. *Ecology*, 85(6): 1503-1511 pp.
- JANZEN, D.H. & W. HALLWACHS. 1999. Food Plant Records For Caterpillar of the Área de Conservación Guanacaste of Costa Rica (en línea). Department of Biology, University of Pennsylvania. Consultado 13 nov. 2007. Formato HTML. Disponible en <http://janzen.sas.upenn.edu/Wadults/resultsfood.lasso>
- JERSÁKOVÁ J., JOHNSON S. & KINDLMANN P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81:2:219-235.
- JOHNSON, M., ALEXANDER, K., LINDQUIST, N. & G. LOO. 1999. A phenolic antioxidant from the freshwater orchid, *Habenaria repens*. *Comparative Biochememistry Physiology part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 122: 211-214 pp.
- JOLIVET, P. 1992. Insects and plants: parallel evolution and adaptations. 2º edición. Sandhill Crane Press, Florida, Págs. 163 pp.
- KEW ROYAL BOTANIC GARDEN. The Orchid Family (Orchidaceae). Obtenido de: <http://www.kew.org/plants-fungi/for-gardeners/orchids/>. Consultado el 15 de septiembre de 2013.
- KINDLMANN, P., & Z. BALOUNOVÁ. 1999. Flowering regimes of terrestrial orchids: unpredictability or regularity?. *Journal of Vegetation Science*, 10(2): 269-273 pp.
- KITAJIMA, E.W; RODRÍGUEZ, J.C.V. & J. FREITAS-ASTÚA. 2005. Updating List of Plant Species Naturally Infected with Viruses Transmitted by *Brevipalpus* Mites (Acari: Tenuipalpidae). (Manaus, Brasil 2005). Conferencia. In: Biodiversidad y

- Tecnología: Congreso Anual de la Sociedad Americana División Caribe. Costa Rica. 84 pp.
- KONG, J., GOH, N., CHIA, L. & T. CHIA. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24: 7-11 pp.
- KRUPNICK, G.A. & WEIS, A.E. 1999. The effect of floral herbivory on male and female reproductive success in *Isomeris arborea*. *Ecology*, 80, 135-1149.
- KUAN, C. & L. GONZÁLEZ. 1993. Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. San José, Costa Rica. Instituto Nacional de Aprendizaje. 76 pp.
- LALLANA, V.H. & MA. DEL C. LALLANA. 2003. Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal - Edición digital. 13 pp.
- LANS, C. 2006. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and *diabetes mellitus*. *J. Ethnobiol. Ethnomed*, 13: 45-52 pp.
- LANS, C., HARPER, T., GEORGES, K. & E. BRIDGEWATER. 2001. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC complementary and alternative medicine*, 1:10-15 pp.
- LEITÃO, C. A., STROZI ALVES MEIRA, R. M., AZEVEDO, A. A., DE ARAÚJO, J. M., SILVA, K. L. F., & R. G. COLLEVATTI. 2005. Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae). *Canadian journal of botany*, 83(3): 279-286 pp.
- LEOPARDI, C., VELIZ, J. & L. CUMANA. 2009. Orquideoflórula preliminar de la península de Araya y áreas adyacentes, Estado Sucre, Venezuela. *Acta Botánica Venezuelica*, 32 (1): 25-31 pp.
- LIECHTI, R. & E.E. FARMER. 2002. The jasmonate pathway. *Science*, 296 (5573): 1649-50 pp.

- LOCK, O. 1997. Colorantes Naturales. Primera Edición. Pontificia Universidad Católica del Perú. Perú. 137-163 pp.
- LOWMAN, M. WITTMAN, D. & D. MURRAY. 1996. Herbivory in a bromeliad of the Peruvian rain forest canopy. *Journal of the Bromeliad Society*. 46:52-55 pp.
- LUO, H., LIN, S., REN, F., WU, L., CHEN, L. & Y. SUN. 2007. Antioxidant and antimicrobial capacity of chinese medicinal herb extracts in raw sheep meat. *J. Food Protection*, 70:1440-1445 pp.
- MALO, J., LEIRANA, J. & V. PARRA. 2001. Population fragmentation, florivory, and the effects of flower morphology alterations on the pollination success of *Myrmecophila tibicinis* (Orchidaceae). *Biotropica*. 33: 529-534 pp.
- MARCANO, D. & M. HASEGAWA. 2002. Fitoquímica orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV. Segunda edición. Venezuela. 588 pp.
- MARQUIS, R.J. 1984. Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science*. 226: 537-539 pp.
- MARTIN DE LA CRUZ. 1552. An Aztec Herbal: "Badiano Codex". En: Collection of Mexican Codices. Manuscrito azteca. Según traducción latina de Juan Badiano. México.
- MARTÍNEZ, A. 2005. Flavonoides. Libro Universitario. Universidad de Antioquia. Colombia. 73 pp.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., CULEBRAS, J. M., & M. J. TUÑÓN. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6): 271-278 pp.
- MCCALL, A. C., & R. E. IRWIN. 2006. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology Letters*, 9(12):1351-1365 pp.

- MCCALL, A. C., & R. KARBAN. 2006. Induced defense in *Nicotiana attenuata* (Solanaceae) fruit and flowers. *Oecologia*, 146(4): 566-571 pp.
- MEYER, G. A. 1998. Mechanisms promoting recovery from defoliation in goldenrod (*Solidago altissima*). *Canadian Journal of Botany*, 76(3), 450-459 pp.
- NASHRIYAH, A., SHAMSI AH, M., SALMAH, S., MISMAN, M., MAIZATUL A., JAMALIAH, M. & M. MAZLEHA. 2010. Growth and Mineral Content of *Mokara chark kuan* Pink Orchid as affected by allelopathic *Lantana camara* Weed. *International Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 1(1): 35-39 pp.
- NEILAND, M. & C. WILCOCK. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae 1. *American Journal of Botany*, 85 (12): 1657-1657 pp.
- NUÑEZ-FARFAN, J., & R. DIRZO. 1994. Evolutionary ecology of *Datura stramonium* L. in central Mexico: natural selection for resistance to herbivorous insects. *Evolution*, 48 (2): 423-436 pp.
- PACCINI, E. & G. FRANCHI. 2008. Types, evolution and significance of plant-animal interactions. *Rendiconti Lincei* 19: 75-101 pp.
- PELLEGRINO G. & A. MUSSACHIO. 2006. Effects of defoliation on reproductive success in two orchids, *Serapias vomeraceae* and *Dactylorhiza sambucina*. *Annali Fennici Botanica*. 43: 123-128 pp.
- PELLEGRINO, G., GARGANO, D., NOCE, M. & A. MUSACCHIO. 2005. Reproductive biology and pollinator limitation in a deceptive orchid, *Serapias vomeracea* (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 20 (1): 33-39 pp.
- PENG, J., XU, Q., XU, Y., QI, Y., HAN, X. & L. XU. 2007. A new anticancer dihydroflavanoid from the root of *Spiranthes australis* (R. Brown) Lindl. *Nat. Prod.*, 21: 641-645 pp.

- PÉREZ GUTIERREZ, R. 2010. Orchids: a review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(8): 592-638 pp.
- POOLE, N. & J. SEELEY. 1974. Nitrogen, Potassium and Magnesium Nutrition of Three Orchid Genera. Tesis de PhD. University, Ithaca, New York. 251 pp.
- POORTER, L., PLASSCHE, M., WILLEMS, S., & R. G. A. BOOT. 2004. Leaf traits and herbivory rates of tropical tree species differing in successional status. *Plant Biology*, 6(6):746-754 pp.
- RASMUSSEN, H. & D. WHIGHAM. 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of Linnean Society*. 126: 49-64 pp.
- REICHMAN, O. J., & S. C. SMITH. 1991. Responses to simulated leaf and root herbivory by a biennial, *Tragopogon dubius*. *Ecology*, 72 (1): 116-124 pp.
- REVELO M. & M.CISNEROS. 2008. Proyecto de factibilidad de producción y exportación de orquídeas al mercado europeo. Universidad Católica de Ecuador. Tesis Ingeniería Comercial. 335 pp.
- REYES, M. 2008. Evaluación farmacológica de *Prosthechea michuacana* (Orchidaceae), especie de potencial agronómico. Tesis de Maestría de Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos naturales. Instituto Politécnico Nacional. 165 pp.
- REZNICK, D. 1985. Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos*, 44 (2): 257-267 pp.
- RHOADES, D.F. & R.G. CATES. 1976. Toward a general theory of plant herbivore chemistry. *In: Biochemical interactions between plants and insects.*(eds. J. Wallace & R.L. Mansell). Plenum Press. New York, New York. USA. 168-213 pp.

- RIDLEY, P., HOWSE, P. E., & C. W. JACKSON. 1996. Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their 'symbiotic' fungus. *Experientia*, 52(6): 631-635 pp.
- RIVERA, G. & G. CORRALES. 2007. Problemas fitosanitarios que amenazan la conservación de las orquídeas en Costa Rica. *Lankesteriana* 7 (1-2): 347-352 pp.
- RIVERA, G. 1998. Orquídeas: Generalidades y cultivo. Editorial Fundación UNA. Heredia, Costa Rica. 266 pp.
- ROBERTS, SUSAN. 2007. Terpenos, production and engineering of terpenoides in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3(7): 387-395 pp.
- ROCES, F., & M. BOLLAZZI. 2009. Information transfer and the organization of foraging in grass-and leaf-cutting ants. Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches. USA: CRC Press. Boca Ratón, Contemporary Topics in Entomology Series. 261-275 pp.
- ROSA, G., NOVAIS, R.F., SANTOS, A.F. & M.V. LOCATELLI. 2009. Cultivo de orquídeas. 5 Edición. Editorial Viçosa. Brasil. 35 pp.
- ROUBIK, D. & P. HANSON. 2004. Abejas de orquídeas de la América Tropical. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica. 358 pp.
- SAHAVACHARIN, O. 1998. Cut Flower Production in Thailand. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Tailandia. Obtenido de: <http://www.fao.org/docrep/005/ac452e/ac452e09.htm>. Consultado el 22 de agosto del 2013.
- SALAZAR, W. 2009. Descripción de problemas fitosanitarios de orquídeas en dos ambientes: Zona Protectora Cerros de la Carpintera, Cartago y Orquideario 25 de

- mayo, Sabanilla de Montes de Oca. Tesis de Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica. 99 pp.
- SALAZAR, W; RIVERA, G. & G. CORRALES. 2007. Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas o epidemias. *Lankesteriana*, 7 (1-2): 362-367 pp.
- SALAZAR, W; RIVERA, G. & G. CORRALES. 2008. Daños causados por polillas en orquídeas cultivadas y silvestres de Costa Rica. Memoria. In Congreso Nacional de *Trichoderma* y *Gliocladium*. Costa Rica. 57 pp.
- SÁNCHEZ-RAMOS, DIRZO, G, R. & M. A. BALCÁZAR-LARA. 1999. Especificidad y herbivoría de Lepidoptera sobre especies pioneras y tolerantes del bosque mesófilo de la Reserva de la Biosfera El Cielo, Tamaulipas, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 78: 103-118 pp.
- SÁNCHEZ-RAMOS, G. & P. REYES-CASTILLO. 2006. Ecological interaction of *Pantophthalmus roseni* (Enderlein) (Diptera: Pantophthalmidae) and the Red Oak *Quercus germana* Sachltdl. Et Cham. (Fagaceae) in a Mexican Cloud Forest. *Acta Zoológica Mexicana*. 22: 45-56 pp.
- SÁNCHEZ-RAMOS, G. 2002. Patrones de interacción planta-herbívoro en el bosque mesófilo de Gómez Farías, Tamaulipas, México. Tesis Doctoral, inédita. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 326 pp.
- SÁNCHEZ-RAMOS, G., REYES-CASTILLO, P., MORA, A. & J. MARTÍNEZ-AVALOS. 2010. Estudio de la herbivoría de la palma camedor (*Chamaedorea radicalis*) Mart., en la Sierra Madre Oriental de Tamaulipas, México. *Acta Zoológica Mexicana*. 26: 121-130 pp.

- SATISH, M., ABHAY, P., CHEN-YUE, L., CHAO-LINK, K. & T. HSIN-SHENG. 2003. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 44: 79-98 pp.
- SCHMIDT, G. & G. ZOTZ. 2002. Inherently slow growth in two Caribbean epiphytic species: a demographic approach. *Journal of Vegetation Science*. 13:527-534 pp.
- SCRIBER, M. 1977. Limiting effects of low leaf-water content on the nitrogen utilization, energy budget, and larval growth of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae). *Oecologia*, 28(3): 269-287 pp.
- SEPÚLVEDA JIMÉNEZ, G., DUCOING, H. & M. ROCHA SOSA. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3): 355-363 pp.
- SHIMIZY, M., SHOGAWA, H., HAYASHI, T., ARISAWA, M., SUZUKI, S., YOSHIZAKI, M., MORITA, N., FERRO, E., BASUALDO, I. & L. BERGANZA. 1988. Constituents and anti-inflammatory effects of Paraguayan crude drug "Tamandá cuná" (*Catasetum barbatum* Lindl.) *Chem. Pharm. Bull.*, 36: 4447-4452 pp.
- SHIMURA, H., MATSUURA, M., TAKADA, N. & KODA Y. 2007. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, 68: 1442-1447 pp.
- SILVERA, G. 1993. Cultivo de orquídeas en Panamá. Litografía Enan. Panamá. 31 pp.
- SILVERA, G. 2010. Cultivo de orquídeas en Climas Tropicales. Litografía Enan.. Panamá. 42 pp.

- SIMÕES, C. M. O., & E. P. SCHENKEL. 2002. "A pesquisa ea produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12 (1): 35-40 pp.
- SOEST, P.J. 1994. *The nutritional Ecology of the Rumiand*. Cornell University Press. Estados Unidos. 476 pp.
- SOO HOO, C. F., & G. FRAENKEL. 1966. The consumption, digestion, and utilization of food plants by a polyphagous insect, *Prodenia eridania* Cramer. *Journal of insect physiology*, 12(6): 711-730 pp.
- STEPHENSON, A. G. 1981. Toxic nectar deters nectar thieves of *Catalpa speciosa*. *American Midland Naturalist*, 105 (2): 381-383 pp.
- STERCK, F., VAN DER MEER, P. & F. BONGERS. 1992. Herbivory in two rain forest canopies in French Guiana. *Biotropic.*, 24:97-99 pp.
- STRAUSS, S. Y., & A. A. AGRAWAL. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(5): 179-185 pp.
- STRAUSS, S. Y., CONNER, J. K., & S. L. RUSH. 1996. Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant fitness. *The American Naturalist*, 147(6), 1098-1107 pp.
- STRAUSS, S. Y., IRWIN, R. E., & V. M. LAMBRIX. 2004. Optimal defence theory and flower petal colour predict variation in the secondary chemistry of wild radish. *Journal of Ecology*, 92(1): 132-141 pp.
- SUÁREZ, E. & J. MORA. 2007. *Cómo cultivar orquídeas en su casa*. San José, Costa Rica, Editorial Mundo Gráfico. 225 pp.
- SURESH, P., SUBRAMONIAM, A. & P. PUSHPANGADAN. 2000. Aphodisiac activity of *Vanda tessellate*. *Indian J. Pharmacol.*, 32:300-304 pp.

- TABARES, C. 2006. Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. Tesis doctoral. Universidad Laguna. España. 125 pp.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2002. Estruturas secretoras da lâmina foliar de amapá amargo (*Parahancornia fasciculata*, Apocynaceae): histoquímica e doseamento de flavonoides. *Acta Amazonica*, 43 (4): 407-413 pp.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2009. Fisiología Vegetal. 4 Edición. Editorial Artmed, Porto Alegre. Brasil. 820 pp.
- TIFFIN, P. 2000. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: what do we know? *Evolutionary Ecology*. 14: 523–536.
- TINTI, J. M., & C. NOFRE. 2001. Responses of the ant *Lasius niger* to various compounds perceived as sweet in humans: a structure–activity relationship study. *Chemical senses*, 26(3): 231-237 pp.
- TREMBLAY, R. 2006. The effect of population structure, plant size, herbivory and reproductive potential on effective population size in the temperate epiphytic orchid, *Sarcochilus australis*. *Cunninghamia* 9(4): 529-535 pp.
- TRUMBLE, J. T., KOLODNY–HIRSCH, D. M., & I. P. TING. 1993. Plant compensation for arthropod herbivory. *Annual Review of Entomolog.*, 38: 93–119 pp.
- TUXCIENCE.ORG. 2009. Pruebas Químicas para Productos Naturales. Obtenido de: <http://tuxscience.org/?p=34#more-34>. Visitado el 8 de agosto de 2013.
- ULLOA, C. 2000. Micropropagación de *Cattleya skinneri* y *Cattleya skinneri* x *Cattleya maxima* por cultivo de ápices. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de Costa Rica. 92 pp.

- VALLIUS E. & V. SALONEN. 2000. Effects of defoliation on male and female reproductive traits of a perennial orchid, *Dactylorhiza maculata*. *Functional Ecology*, 14(6): 668–674 pp.
- VIVANCO, J.M., BAIS, H.P., STERMITZ, F.R., THELEN, G.C. & R.M. CALLAWAY. 2004. Biogeographical variation in community response to root allelochemistry: novel weapons and exotic invasion. *Ecology Letters*, 7, 285–292 pp.
- VOGEL, A.I., TATCHELL, A.R., FURNIS, B.S., HANNAFORD, A.J. & P.W. SMITH. 1996. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th Edition. Prentice Hall. Estados Unidos. 534 pp.
- WALTER, K. 1979. Orquídeas. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica. 42 pp.
- WALTER, K. S. 1983. "Costa Rican Natural History". The University of Chicago Press. Chicago, USA,. 282-292 pp.
- WATERMAN, P. G. J. A. M. ROSS, & D. MCKEY. 1984. Factors affecting levels of some phenolic compounds, digestibility, and nitrogen content of the mature leaves of *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). *Journal of Chemical Ecology*. 10: 387–401 pp.
- WETTERER J. 1995. Forager size and ecology of *Acromyrmex coronatus* and other leaf-cutting ants in Costa Rica. *Oecologia*. 104:409-415 pp.
- WHIGHAM, D. 1990. The effect of experimental defoliation on the growth and reproduction of a woodland orchid, *Tipularia discolor*. *Canadian Journal of Botany*, 68(8): 1812-1816 pp.
- WHITMAN, T.G. & S. MOOPER. 1985. Chronic herbivory: Impacts on architecture and sex expression of pinyon pine. *Science*. 228: 1089–1091 pp.
- WHITTAKER, R. H. 1970. The biochemical ecology of higher plants. In: Chemical Ecology (eds. Sondheimer, E. & J. B. Simeone). Academic Press. Nueva York.

- WILLIAMS-LINERA, G., & A. BALTAZAR. 2001. Herbivory on young and mature leaves of one temperate deciduous and two tropical evergreen trees in the understory and canopy of a Mexican cloud forest. *Selbyana*, 213-218 pp.
- WILSON, D. M., FENICAL, W., HAY, M., LINDQUIST, N., & R. BOLSER. 1999. Habenariol, a freshwater feeding deterrent from the aquatic orchid *Habenaria repens* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, 50(8): 1333-1336 pp.
- WILSON, P., & J. D. THOMSON. 1991. Heterogeneity among floral visitors leads to discordance between removal and deposition of pollen. *Ecology*, 72(4): 1503-1507 pp.
- WINK, M. 1999. Biochemistry of Plants Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews, Volume 2. Boca Ratón, U.S.A. 320 pp.
- WINKLER, M., HULBER, K., MEHLTRETER, K., FRANCO J. & P. HIETZ. 2005. Herbivory in epiphytic bromeliads, orchids and ferns in a Mexican montane forest. *Journal of Tropical Ecology*. 21: 147-154 pp.
- WOLFE, L. M. 2002. Why alien invaders succeed: support for the escape-from-enemy hypothesis. *The American Naturalist*, 160(6): 705-711 pp.
- YANG, L., WANG, Z. & L. XU. 2006. Simultaneous determination of phenols (Bibenzyl, phenanthrene and fluorine) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatograph A.*, 1104: 230-237 pp.
- ZANGERL, A. R., & C. E. RUTLEDGE. 1996. The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *American Naturalist*, 147 (4): 599-608 pp.
- ZHONG, H., ZHONG J., CHEN H. & S. WANG. 2000. Delectis florae reipublicae popularis sinicae. 238-239 pp.

- ZIMMERMAN, J. K., & D. F. WHIGHAM. 1992. Ecological functions of carbohydrates stored in corms of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *Functional Ecology*, 575-581 pp.
- ZOTZ, G. & P. HIETZ. 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2067-2078 pp.
- ZOTZ, G. 1999. What are Backshoots Good For? Seasonal Changes in Mineral, Carbohydrate and Water Content of Different Organs of the Epiphytic Orchid, *Dimerandra emarginata*. *Annals of Botany*, 84: 791-798 pp.