



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en Ciencias mención Botánica



**Estudio de la composición de alcaloides de *Ulex europaeus* L.
(*Fabaceae*) en Chile y su actividad biológica**

KARLA ANDREA DUHART MARTÍNEZ
CONCEPCIÓN - CHILE
DICIEMBRE 2012

Profesor Guía: Dr. José Becerra Allende
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

COMISIÓN DE EXAMEN DE GRADO

Comisión evaluadora de Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Botánica.

Dr. José Becerra Allende -----

Profesor Guía

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Dr. Aníbal Pauchard Cortés -----

Miembro Comité

Facultad de Ciencias Forestales

Universidad de Concepción



Dr. Carlos Céspedes Acuña -----

Evaluador Externo

Facultad de Ciencias, Departamento de Cs. Básicas

Universidad del Bio-Bío

Dr. Alfredo Saldaña Mendoza -----

Director de Programa

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi profesor guía, Dr. José Becerra Allende, que me acogió en esta Universidad y en el Laboratorio de Química de Productos Naturales “Mario Silva Osorio”, para realizar este Magíster. Gracias Dr. José por su guía, por sus consejos, su preocupación y por su infinita paciencia.

Al equipo de Profesionales, Técnicos, Administrativos y Estudiantes de Postgrado del Laboratorio de Química de Productos Naturales, el famoso 4° piso de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, por enseñarme todos los métodos y técnicas que necesitaba conocer, en especial agradezco a Don Zenón Rozas, Evelyn Bustos, Alejandra Brieva, Karen Vásquez y Fabián Rozas. A mis compañeros de postgrado Isabel Lizama, Jonathan Urrutia y Gastón Sotes, por haber ubicado a esta Profesora de Biología y Ciencias Naturales en el ámbito de la Ciencia Aplicada.

Al Dr. Roberto Rodríguez Ríos y al Dr. Aníbal Pauchard Cortés por revisar esta tesis y enseñarme cómo se deben hacer las cosas.

Al Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío-Bío, en especial al Dr. Carlos Céspedes Acuña y Julio Becerra por permitirme realizar los bioensayos de esta tesis en dicha casa de estudios.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) y al Proyecto Basal PFB-27 por haber financiado mis estudios del segundo año de este Magíster que cambiará mi vida.

A mi partner Óscar Ibáñez Muñoz por darme ánimo para terminar esta tesis y soportar todas mis mañas durante el proceso. Además le agradezco su asesoría como traductor inglés-español y sus servicios informáticos. Te estoy eternamente agradecida.

A mi madre, Margarita Martínez Uribe, pilar fundamental durante estos años en que no trabajé en las aulas secundarias y darme todo el apoyo y la protección que sólo una madre puede dar.

A mi hermano Guillermo Duhart Martínez, mi futuro científico, gracias por la paciencia y comprensión. Sé que todo este tiempo te he robado pedacitos de tu tiempo para realizar esta tesis. En general, a toda mi familia, y en especial a mi padre José Duhart Fica (Q.E.P.D.), por inculcarme valores como la perseverancia, la responsabilidad y resiliencia. Si no fuera por él yo no estaría terminando este Magíster.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Nº de páginas
Agradecimientos.....	3
Índice de Contenidos.....	4
Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Origen y descripción de <i>Ulex europaeus</i> L.....	10
1.2. Distribución general de <i>Ulex europaeus</i> L.....	27
1.3. Generalidades de los alcaloides.....	29
1.4. Alcaloides en <i>Ulex europaeus</i> L.....	36
1.5. Otros metabolitos secundarios en <i>Ulex europaeus</i> L.....	39
1.6. El éxito de especies introducidas como plantas invasoras	39
1.7. Hipótesis.....	42
1.8. Objetivos.....	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
2.1. Detección de alcaloides.....	44
2.1.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	44
2.1.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	45
2.1.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Preparativo	45
2.1.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Analítico	45
2.2. Ensayo Biológico: Determinación del grado de acción insecticida del extracto alcaloide de <i>Ulex europaeus</i> L. en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> (Díptera: Drosophilidae)	46
3. RESULTADOS.....	47
3.1. Obtención de extractos a partir de semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.....	47
3.2. Realización de un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	47
3.2.1. Semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.....	47
3.2.2. Tallos de <i>Ulex europaeus</i> L.....	49
3.3. Realización del análisis cuantitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	54
3.4. Determinación del grado de acción insecticida del extracto alcaloide de <i>Ulex europaeus</i> L. en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> (Diptera:Drosophilidae).....	56
4. DISCUSIÓN.....	60
5. CONCLUSIONES.....	62
6. REFERENCIAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

		Nº de páginas
Figura 1:	Planta de <i>Ulex europaeus</i> L.....	10
Figura 2:	Estructuras de la especie <i>Ulex europaeus</i> L.....	12
Figura 3:	Legumbres que contienen semillas de la especie <i>Ulex europaeus</i> L.....	14
Figura 4:	Semillas de la especie <i>Ulex europaeus</i> L.....	15
Figura 5:	Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados en semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.....	48
Figura 6:	Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de <i>Ulex europaeus</i> de la localidad de Parral, región del Maule.....	50
Figura 7:	Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de <i>Ulex europaeus</i> de la localidad de Concepción, región del Biobío.....	50
Figura 8:	Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de <i>Ulex europaeus</i> de la localidad de Temuco, región de la Araucanía.....	51
Figura 9:	Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de <i>Ulex europaeus</i> de la localidad de Valdivia, región de Los Ríos.....	51
Figura 10:	Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de <i>Ulex europaeus</i> de la localidad de Puerto Montt, región de Los Lagos.....	52
Figura 11:	Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Caulofilina de <i>Ulex europaeus</i> por CG-MS.....	52
Figura 12:	Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Citisina de <i>Ulex europaeus</i> por CG-MS.....	53
Figura 13:	Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Anagirina de <i>Ulex europaeus</i> por CG-MS.....	53
Figura 14:	Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Lupanina de <i>Ulex europaeus</i> por CG-MS.....	53
Figura 15:	Cromatograma de los extractos alcaloideos de <i>Ulex europaeus</i> analizados mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC Analítico).....	54
Figura 16:	Espectro Ultravioleta del alcaloide Caulofilina de la muestra <i>Ulex europaeus</i> analizados mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	55
Figura 17:	Espectro Ultravioleta del alcaloide Citisina de la muestra <i>Ulex europaeus</i> analizados mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	55
Figura 18:	Gráfico que representa el porcentaje de mortalidad de las larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> en relación a la concentración del extracto de semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.....	58

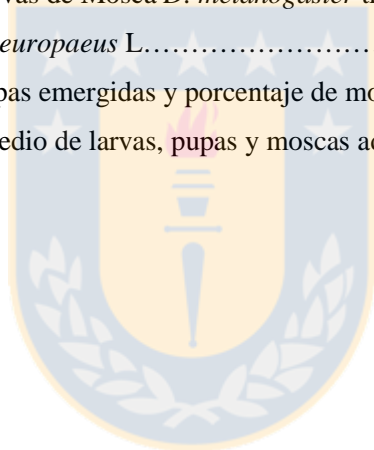
- Figura 19:** Gráfico que representa el porcentaje de mortalidad de las pupas de *Drosophila melanogaster* en relación a la concentración del extracto de semillas de *Ulex europaeus* L..... 58
- Figura 20:** Gráfico que representa el porcentaje de mortalidad de adultos de *Drosophila melanogaster* en relación a la concentración del extracto de semillas de *Ulex europaeus* L..... 59



ÍNDICE DE TABLAS

Nº de páginas

Tabla 1:	Nitrógeno y concentraciones de elementos en hojas y en tallos de <i>Ulex europaeus</i> L. comparando sus dos variantes.....	22
Tabla 2:	Distribución de los alcaloides Quinolizidínicos en la tribu Genisteae.....	37
Tabla 3:	Composición de alcaloides Quinolizidínicos en 19 poblaciones de <i>Ulex</i> L.	38
Tabla 4:	Cantidad de extracto obtenido en relación al peso seco y su rendimiento...	47
Tabla 5:	Alcaloides en semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.....	47
Tabla 6:	Alcaloides en tallos de <i>Ulex europaeus</i> L.....	49
Tabla 7:	Alcaloides analizados mediante HPLC, donde se muestra el tiempo de retención, su abundancia y su máxima longitud de onda expresada en nanómetros.....	55
Tabla 8:	Mortalidad de larvas de Mosca <i>D. melanogaster</i> tratadas con extracto de semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.....	56
Tabla 9:	Porcentaje de pupas emergidas y porcentaje de mortalidad en moscas adultas...	56
Tabla 10:	Porcentaje promedio de larvas, pupas y moscas adultas muertas con su LD50...	57



RESUMEN

El espinillo, *Ulex europaeus* L., es una especie originaria de Europa occidental que pertenece a la familia Fabaceae. Fue introducida a Chile por colonos alemanes, específicamente en la región de Valparaíso, con el objetivo de confeccionar “cercos vivos” con la planta y para usarla como combustible. En Chile, actualmente *Ulex europaeus* se distribuye entre la región de Valparaíso y la región de Los Lagos, y se ha convertido en una amenaza para la agricultura y la silvicultura. Esto se debe a que ocupa terrenos dedicados a dichas actividades productivas, y por su amplia distribución es considerada como una maleza invasiva.

Uno de los factores que podrían favorecer su amplia distribución es su capacidad de defensa frente a potenciales consumidores y que esto es una clara consecuencia de su composición química, en los que destacan los alcaloides. Esto podría dar una explicación coherente a la gran resistencia que ha presentado a diversos tipos de control, específicamente el biológico. Al ser una especie introducida, se deduce que posee una composición química distinta a las especies nativas y endémicas del país, y que cabe destacar no son invasoras. El objetivo de obtener un perfil de los alcaloides de la planta *Ulex europaeus* L. naturalizada en Chile, radica en que existen estudios realizados en Europa desde donde este vegetal es nativo. Dichos análisis la califican como una planta que presenta ciertos alcaloides de tipo quinolizidínicos que son característicos de la familia Fabaceae. En Chile, faltan dichos estudios, que pueden ayudar a entender la capacidad que tiene este arbusto para propagarse y la resistencia que ha presentado a controladores naturales introducidos al país con el fin de contener su dispersión, mayoritariamente por semillas.

En este trabajo, se realizará un análisis cualitativo y cuantitativo de alcaloides de *Ulex europaeus* en primordios foliares, flores, semillas, tallos verdes y rizoma de acuerdo con la metodología de Peña & Cassels (1996), además de evaluar un ensayo insecticida con la especie *Drosophila melanogaster* (Díptera: Drosophilidae).

ABSTRACT

Ulex europaeus L. is an endemic species of occidental Europe; it belongs to the Fabaceae family. It was introduced in Chile by german immigrants, specifically in the Valparaiso region, the main purpose was to create “live fences” and use the plant as firewood. Nowadays *Ulex europaeus* L. is found between the Valparaiso Region and Los Lagos, and it has become a threat to agriculture and silviculture. This is because the plant invades land dedicated to those productive activities, and it is due to its wide distribution that it is considered as an invasive weed.

One of the factors that may benefit its wide distribution is its ability to fight potential consumers, this is a sure consequence of its chemical composition where alkaloids constitute an important amount. This may logically explain the huge resistance to many sorts of control, specifically biological. Being an introduced species, it is inferable that it has a different chemical composition than native and endemic species of the country, and it is important to emphasize that these are not invasive. The objective of having a profile of the alkaloids found in *Ulex europaeus* L. naturalized in Chile is that there are studies made in Europe where this plant is native. Those analyses qualify the plant as one having certain alkaloids of the quinolizidinic type, which are commonly found in the Fabaceae family. We lack studies like this in Chile, they could help us understand the capability of this bush to propagate and deal with the resistance that it has presented to natural controllers introduced in the country, aiming to minimize its distribution, mainly through its seeds.

In this work, a qualitative and quantitative analysis will be presented, regarding alkaloids found in *Ulex europaeus* L. in new leaves, leaf stems, flowers, seeds and rhizome, according to Peña & Cassels's (1996) methodology. The bioactivity of complete extracts will be evaluated in an insecticide essay with the *Drosophila melanogaster* species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen y descripción de *Ulex europaeus* L.

Ulex europaeus es una planta de origen europeo [Hegi, 1906]. Es un arbusto perenne, densamente ramificado de hasta 4.8 metros, pero que usualmente puede ser encontrado con una medida inferior a 2.5 metros. El “espinillo”, como es conocido comúnmente este arbusto, es leñoso y siempreverde. Sus ramas jóvenes se caracterizan por ser pubescentes. En plantas adultas, muy inclinadas, las ramas surgen intrincadamente y se entrelazan desde la base y terminan en puntas espinosas [Pauchard, 1998]. Las plántulas son de morfología variable, y a pesar de que estas tienen brotes tiernos, cerca del suelo poseen pequeñas hojas alternas con 3 foliolos. Las hojas son reducidas a espinas rígidas de 4.5 a 6.5 centímetros de largo en plantas maduras, ya que estas están cubiertas densamente por espinas agudas [Puentes, 2002]. *Ulex europaeus* tiene tejido fotosintético en el tallo, y la fotosíntesis se produce principalmente en la epidermis de los tallos y de las espinas [DiTomaso, 1998].



Figura 1. Planta de *Ulex europaeus* L. Fuente: <http://florabase.dec.wa.gov.au/browse/profile/4317>

Las plantas de *Ulex europaeus* crecen rápidamente. Como es un arbusto leguminoso perenne espinoso, densamente ramificado, glauco, que podría llegar a medir hasta 2 metros de altura y tener 10 metros de diámetro, con renuevos de 70 a 100 cm. Las ramas principales poseen tallos hirsutos, verdosos y angulares con hojas aciculares que son generalmente más cortas que sus espinas conspicuas de entre 25 a 30 mm [Gleason, 1991].

Ulex europaeus pertenece al orden Fabales, familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, Tribu Genisteae [ITIS, 2005]. Esta familia es considerada claramente monofilética en análisis tanto moleculares como morfológicos, sin embargo según Takhtajan en 1997, era tratada como tres familias distintas. En las actuales reconstrucciones de filogenia, la subfamilia Caesalpinioideae es considerada parafilética, mientras que las subfamilias Mimosoideae y Faboideae (o Papilionoideae) son consideradas monofiléticas.

A nivel de familia, las leguminosas o fabáceas, se encuentran cercanamente relacionadas con las familias Polygalaceae, Suraniaceae y Quillajaceae, las cuales forman el orden Fabales [Harbone, 1971].

La gran mayoría de las fabáceas viven en simbiosis con bacterias fijadoras del nitrógeno libre en la atmósfera. Las bacterias se alojan en nódulos en las raíces y pertenecen, en su mayoría, al género *Rhizobium*, bacilos ciliados aerobios, que se alimentan de las sustancias azucaradas cedidas por la planta y son capaces de fijar químicamente el N₂ atmosférico formando con él moléculas orgánicas que brindan a la planta, ya que ésta (como todas las plantas superiores) es incapaz de fijar el nitrógeno libre por sí misma. Debido a esta simbiosis las Leguminosas juegan un importante papel en el ciclo del Nitrógeno en la Tierra [Egunjobi, 1969].

Ulex europaeus, desarrolla flores de color amarillo de hasta 2.5 centímetros de largo, con brácteas aterciopeladas. Las flores se desarrollan por separado, generalmente en las axilas de las hojas o concentradas en un racimo cerca de la punta de las ramas que tienen 2 años de antigüedad. Las flores pueden ser desarrolladas en casi todas las estaciones del año, pero usualmente aparecen en dos periodos distintivos, estos son primavera y otoño. En climas fríos *Ulex europaeus* puede florar solo una vez al año, pero las flores pueden estar presentes en algunos arbustos en otros lapsos bajo las condiciones adecuadas. En definitiva, la floración de *Ulex europaeus* es muy variable y rara vez uniforme en un área determinada y es común que

algunas flores estén presentes en la planta durante todo el año [Ivens, 1982]. El fruto es una legumbre con una vaina de coloración negra, de 1.2 centímetros de largo, con un número variable de semillas, generalmente de 1 a 8 por legumbre. Otra característica de las semillas, es que presentan un arilo y un elaiosoma en su estructura [Pemberton, 1990].



Figura 2. Estructuras de la especie *Ulex europaeus* L. Fuente: Jan Kops *et al.* - Flora Batava. www.biolib.de.

El sistema de las raíces de *U. europaeus* es descrito como superficial, con la mayoría de sus raíces desarrolladas en los primeros 10 centímetros del suelo y su raíz principal con una profundidad de al menos 30 centímetros [Lee, 1986]. Las observaciones que se han realizado en *Ulex europaeus*, sugieren que plantas que han sido repetidamente quemadas, poseen una red muy intrincada de raíces y, cuando estas plantas se eliminan extrayéndolas del suelo, pueden dejar un agujero de hasta 1 metro de ancho y de hasta 60 centímetros de profundidad [Brooks, 2004]. De acuerdo a las revisiones, *U. europaeus* tiene un amplio sistema de raíces laterales con nódulos que fijan nitrógeno y que se complementa con una fina red de raíces adventicias que descienden de las ramas más bajas [Hoshovsky, 2000].

Algunos autores identifican dos variantes o ecotipos de *Ulex europaeus*: uno de “espina corta” y el otro típico o “salvaje”. Como su nombre lo indica el espinillo de “espina corta” tiene espinas más cortas y una estructura más frondosa que el típico *U. europaeus* o también reconocido como “salvaje” [Richardson, 1998]. Otros autores reconocen otros dos ecotipos de *U. europaeus*, como “postrado” y “erecto”. Los de tipo “postrado” se desarrollan en lugares de mucha exposición y en zonas de mucho viento. Las plantas del tipo “erecto”, pueden alcanzar alturas de 2 a 3 metros en promedio, con un diámetro de copa de hasta 4 metros. En las áreas con vegetación muy densa, el espinillo, desarrolla sólo un tronco principal y en los sitios más abiertos crecen tallos múltiples [Gaynor, 1981]. En zonas geográficas donde *Ulex europaeus* es una planta invasora, es descrito formando barreras densas y matorrales impenetrables que cubren grandes áreas y producen una cantidad considerable de biomasa [Eugunjobi, 1971].

En cuanto a su proceso de reproducción, *Ulex europaeus* puede desarrollarse a partir de semillas o puede brotar desde el tejido del tallo debido al daño que se le produce [Ivens, 1982]. Cuando se reproduce sexualmente, *Ulex europaeus* es polinizado por abejas e insectos similares. Las flores de esta planta carecen de néctar, por lo que la visita de estos insectos hace que sus flores liberen polen explosivamente [Mack, 2003].

Ulex europaeus usualmente comienza a producir flores al segundo o tercer año de crecimiento. Numerosas flores son desarrolladas cada año, sin embargo un gran porcentaje de flores no producen frutos. Esto puede ser atribuido en parte al hecho de que algunas floraciones ocurren en invierno, cuando no hay presencia de insectos que dispersen el polen [Clements, 2001].

Una población madura de *Ulex europaeus* puede producir cerca de seis millones de semillas por año. La mayoría de las semillas caen cerca de la planta madre, pero sus vainas pueden abrirse y lanzar las semillas a una distancia de entre cinco y ocho metros a la redonda [Hill, 2001]. La mayoría de las semillas de *Ulex europaeus* caen bajo la planta madre, sin embargo, algunas son diseminadas por la acción de las vainas dehiscentes, que pueden eyectar semillas hasta 8 metros desde la planta madre [Ivens, 1980]. La dispersión de semillas de *Ulex europaeus* sobre distancias intermedias pueden ser atribuibles a los insectos, los animales y posiblemente, las ráfagas de viento. Las semillas tienen elaiosomas que pueden estimular la dispersión secundaria por hormigas [Pemberton, 1990]. Las semillas pueden ser diseminadas

también por aves [Prasad, 2003]. Se ha observado el establecimiento de semillas a 50 metros desde donde está ubicada la planta madre. Debido a esto se sugiere, que las semillas se hayan diseminado por las ráfagas de viento, basada en la conformación de la legumbre que posee una estructura plana y alada [Baker, 1986].



Figura 3. Legumbres que contienen semillas de la especie *Ulex europaeus* L. (Fuente: J.P. Clark California Dept. of Food & Agriculture, Integrated Pest Control Branch. © 2001 CDFA.)

La dispersión de semillas por largas distancias puede ocurrir por transporte del agua y sus corrientes; transporte a lo largo de los caminos, especialmente en vehículos y equipamientos destinados a la agricultura; y transporte de las semillas por la vida salvaje [Hely, 1998].

La acumulación de semillas de *Ulex europaeus* entre la basura y el suelo ha sido medido por varios investigadores en Nueva Zelanda. El total de semillas medidas en los primeros 30 centímetros bajo la planta, oscilaron desde 133 a 20,742 semillas/m², con un promedio de 5,446 semillas/m². Sobre el 90% de estas semillas, están en los primeros 6 centímetros bajo la planta [Zabkiewicz, 1978].

La mayoría de las semillas de *Ulex europaeus*, tienen un cubierta dura e impermeable, por lo que requiere escarificación para germinar. Esto sugiere una potencial persistencia en el suelo donde se ubica el banco de semillas. Adicionalmente, evidencia experimental y anecdótica desde el terreno, parece sugerir que las semillas permanecen viables en el suelo y en el banco de semillas por muchos años [Balneaves, 1982].

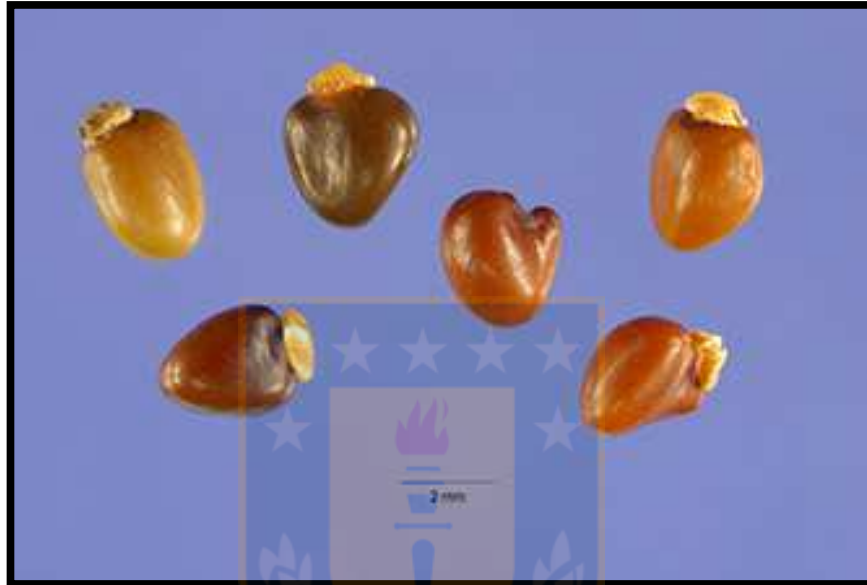


Figura 4. Semillas de la especie *Ulex europaeus* L. Fuente: Steve Hurst - USDA-NRCS PLANTS Database.

La viabilidad de las semillas de *Ulex europaeus* excede en 85% [Gaynor, 1981]. Basándose en esta información y observaciones similares sugieren que las semillas de *U. europaeus* pueden permanecer latentes en el suelo cerca de 30 años o más. Una larga proporción de estas semillas recuperadas del suelo son viables. Cuando hay o hubo presencia de *U. europaeus* en un sitio, pero ha sido removido del lugar, se debe estar alerta a la posibilidad de que plántulas puedan establecerse desde las semillas que han permanecido en el suelo o bien, por la remoción del suelo por prácticas agrícolas. La perturbación del suelo, a menudo resulta en germinación de las semillas que están soterradas, aún cuando *Ulex europaeus* haya estado ausente de la plantación por 15 años o más [D'Antonio, 1998].

Debido a que las semillas de *Ulex europaeus* tienen una cubierta dura e impermeable, los índices de germinación son altamente variables sin pre tratamiento, que oscila entre el 0 y el 90%. Estudios señalan que semillas de *U. europaeus* ubicadas en agua hirviendo por 30 segundos y luego refrigeradas rápidamente con agua potable, resultan en la germinación significativa con porcentajes de 96%, 94% y 90%. Igualmente, semillas de *U. europaeus* tomadas desde el suelo y escarificadas con papel de lija tuvo un rango de germinación de 73% en promedio, mientras que semillas a las que se le removió su dura cubierta con un bisturí tuvo un rango de germinación superior a un 90%. La dureza de la semilla es mayor cuando la semilla es en primer lugar, depositada en el suelo, por lo que va progresivamente declinando así como la semilla vaya permaneciendo en la superficie del suelo y llegue a ser incorporada a este [Ivens, 1983].

Los rangos de germinación bajo el dosel de *Ulex europaeus* difiere sustantivamente de aquellas que ocurren por la remoción de plantas por perturbación física, por ejemplo el corte de la planta, fuego o control químico. Observaciones indican un incremento de la germinación de *U. europaeus*, seguido por la aplicación de herbicida y por la remoción de poblaciones de la planta mediante maquinaria pesada, corte y fuego [Hermann, 1968]. La razón del por qué la germinación aumenta después de una modificación del dosel, aún no está clara. El cambio más obvio en el banco de semillas es la intensidad de la luz. Esto expone a la semilla a mejores fluctuaciones de temperatura y disponibilidad de la humedad, lo que puede estimular la germinación de la semilla [Ivens, 1983].

La mejor temperatura a la que germina la semilla de *Ulex europaeus* es de 15° a 19°C, de acuerdo con observaciones de campo, la germinación tiene un aumento a finales de primavera y a principios del verano. La germinación también ocurre a una temperatura mínima de 0°C, apoyando observaciones que indican la proliferación de plántulas durante el invierno. Las temperaturas sobre 26°C inhiben la germinación, y la viabilidad de las semillas se pierde con temperaturas sobre los 35°C [Ivens, 1983].

La germinación de semillas bajo el dosel se puede deber a la interceptación de lluvia por el dosel. La lluvia de 1.8 mm es completamente absorbida. Al aclarar la espesura del dosel, se esperaría que resultara en el incremento considerable de los niveles de humedad del suelo y por lo tanto la germinación aumentaría [Hill, 2000].

La germinación de semillas puede tener lugar en cualquier época del año, pero el índice más alto de desarrollo de plántulas se produce desde la primavera hasta mediados del verano, y de nuevo en el otoño [Hill, 1991].

Seguido de la germinación en el terreno, la sobrevivencia de las plántulas depende del tipo y la abundancia de especies asociadas. Bajo el dosel de *Ulex europaeus*, la mortalidad de las plántulas tiene una tasa de 70%, comparado al 41% de mortalidad de plántulas después de aclarar el dosel. A menudo, las plántulas no se establecen en presencia de pastos fuertes y vigorosos [Ivens, 1980]. En una parcela experimental limpiada y desmalezada manualmente y mantenida libre de otra vegetación, el establecimiento de plántulas de *Ulex europaeus* continúa sobre el tiempo. En comparación a otras parcelas que no fueron desmalezadas, muchos pastos y herbáceas se establecieron en conjunto con *U. europaeus* y la densidad poblacional de las plántulas fue menor que en las parcelas desmalezadas [INIA, 2007].

Cuatro separados estadios de crecimiento de *Ulex europaeus*, con distintas formas y características foliares, han sido distinguidos como cotiledón, juvenil, juvenil/maduro y maduro [Puentes, 2002]. La transformación desde juvenil a maduro envuelve un cambio en la forma de la hoja, modificación en los meristemas de las ramas, aceleración en su extensión y crecimiento. El estadio juvenil, se caracteriza típicamente por tener hojas trifoliadas. Tan rápido como la extensión y el crecimiento se llevan a cabo, las espinas se comienzan a desarrollar en las axilas de las hojas y en las ramas, pasando por la pérdida de las hojas juveniles, así como la planta madura. La distinción entre fases de crecimiento no siempre es notoria. Durante el desarrollo, la cantidad y la composición de la cera foliar cambia, la cutícula se engruesa, el radio de la raíz cambia y, subsecuentemente, los potenciales efectos herbicidas decrecen [Rees, 2001].

La información en la literatura es conflictiva, con respecto a la habilidad de *Ulex europaeus* de brotar desde las raíces. Clemens *et al* sugiere que la reproducción vegetativa de *U. europaeus* puede ocurrir por el arrastre de sus raíces, y que algunos fragmentos de raíces son capaces de producir plantas que florecerán a los 6 meses. Sin embargo, la literatura que se cita en este estudio no sostiene estas conjeturas. Esta investigación también sugiere que tanto raíces y brotes son capaces de brotar, pero que la planta no forma brotes adventicios bajo la primera rama.

Hay un acuerdo general en la literatura, que indica que *Ulex europaeus* brota desde el tejido del tallo debido a daño mecánico sobre partes de la planta, ya sea por corte manual, por maquinaria pesada o por fuego [Hilgendorf, 1967]. Finalmente, Richardson and Hill, sugiere que *Ulex europaeus* no se reproduce vegetativamente, aunque ramas procumbentes pueden desarrollar raíces adventicias.

Es muy común que esta especie aparezca en lugares abiertos o perturbados, especialmente en caminos, sitios eriazos, terrenos muy pastoreados, viejos terrenos dedicados a la agricultura, dunas de arena, bancos de grava, cercos, zonas taladas y en comunidades vegetales post-incendio [Nunez-Regueira, 1996]. *Ulex europaeus* y otras especies asociadas, como por ejemplo *Teline monspessulana*, invaden bosques y sotobosques con aberturas adyacentes, y pastizales costeros [Prasad, 2003]. En algunos sitios descritos, los cuales deben ser monitoreados por ser susceptibles a la invasión por *Ulex europaeus*, King *et al* [48] incluyen barrancos y zonas ribereñas, donde cursos de agua pueden transportar semillas de esta especie. La diseminación de *Ulex europaeus* está asociada además a la agricultura, donde esta planta ha sido instalada como seto y subsecuentemente, invadió plantaciones y bordes de caminos. En algunas partes del mundo, esta especie invade los lechos de los ríos y áreas ribereñas, laderas empinadas y el sotobosque de *Pinus radiata* [Norambuena, 2000]. Observaciones sugieren que estas infestaciones a menudo comienzan en los lechos de los ríos y se disemina desde ahí [Hill, 1986]. *Ulex europaeus* es capaz de invadir las turberas y los humedales, con o sin fuego, aunque este parece estimular la expansión de las poblaciones de *Ulex europaeus* en estas áreas [Shely, 1999]. En cuanto a la elevación de estos lugares, esta especie es encontrada en bajas elevaciones en las áreas costeras. *Ulex europaeus* puede ser encontrado desde el nivel del mar hasta los 1400 metros de altura [Tu, 2001].

Ulex europaeus se reproduce en regiones templadas en terrenos bajos y áreas costeras. No se desarrolla en climas áridos o en regiones continentales donde existe el calor y el frío extremo. Plantas maduras de esta especie pueden soportar, pero no prosperan en zonas con heladas severas y se establecen en zonas protegidas de los vientos fríos [University of Montana, 2001]. En países donde los inviernos bajan su temperatura a -20°C, las plantas maduras de esta especie sufren daños severos por la escarcha. Sin embargo, las plantas se recuperan después de 2 años [California Invasive Plant Council, 1999]. Óptimamente, *Ulex europaeus* crece en áreas donde las temperaturas mensuales sobre los 0°C y prefiere áreas

donde la temperatura media mínima diaria en el mes más frío es sobre los 2°C y donde la temperatura media del mes más cálido es la que fluctúa entre los 18° y los 20°C. Así como la germinación de esta especie es limitada en zonas de temperaturas extremas, la duración del día puede ser un factor clave en la distribución latitudinal de la planta. Si la cantidad de horas luz es inferior a 8 horas, se inhibe la maduración de la planta, tanto la formación de espinas como su floración [Ivens, 1978].

Ulex europaeus se desarrolla en las zonas costeras que se mantienen frescas y húmedas la mayoría del año y donde la lluvia se distribuye uniformemente durante todo el año en el rango de 650-900 mm. Esta especie también crece en lugares con veranos relativamente secos. Una de las cualidades de *Ulex europaeus* que le permitiría soportar periodos estacionales con déficit de lluvia, es su baja área foliar y su raíz pivotante [IGSS, 2004].

Revisiones en la literatura, indican que *Ulex europaeus* crece en todos los tipos de suelo, pero muy rara vez se desarrolla en los suelos muy calcáreos. El crecimiento es más prolífico en suelos que contienen menos calcio y tanto la germinación de semillas como el desarrollo de plántulas se redujo en los suelos muy calcáreos [McClintock, 1979]. Frecuentemente es encontrado en suelos arenosos y ha sido registrado creciendo en lugares serpenteados. *Ulex europaeus* es una especie pionera en áreas perturbadas de baja fertilidad [McCarter, 1981]. Esta planta es tolerante a pH bajo relativo en un rango de entre 3.5 y 4.5. Esta especie puede prosperar en suelos bien drenados y en áreas con un nivel freático alto, pero no puede tolerar condiciones de inundación [King, 1996].

Esta planta es a menudo una especie pionera en áreas donde la vegetación se ve perturbada por los incendios u otros acontecimientos que abren el dosel, como la tala o la minería [Arno, 2000]. La fijación de nitrógeno en esta planta facilita su establecimiento y persistencia en la sucesión temprana, ambientes perturbados, por lo que el nitrógeno y la materia orgánica se acumulan en los sitios invadidos así como la planta envejece [Brooks, 2004].

Una vez que la reproducción de varios individuos de *Ulex europaeus* se establecen, la especie puede excluir la instauración de la vegetación nativa y, por lo tanto, perpetuarse a si misma por muchos años. Su naturaleza perenne y la arquitectura que tiene el dosel de *Ulex europaeus*, limita la disponibilidad de luz a especies del sotobosque. En algunos sitios, la

invasión de *Ulex europaeus* y otras especies no nativas del lugar, pueden convertir los pastizales en matorral, indefinidamente [Bussan, 1999].

La dominancia de *Ulex europaeus*, puede ser mantenida en algunas áreas por la quema repetitiva. La estructura de esta especie, la regeneración por brotes y el establecimiento de plántulas, suele ser más prolífico después del fuego [Chavasse, 1976].

El desarrollo de plántulas es inhibida por la vegetación densa, por lo que generalmente exhibe baja tolerancia a la sombra. Bajo poca disponibilidad de luz, las plantas producen escaso follaje y pocas flores. La sobrevivencia de *Ulex europaeus* es mayor en áreas altamente iluminadas [Burrill, 1992].

Ulex europaeus es referido como una especie pirofítica en su hábitat nativo. Esta planta responde al fuego, brotando desde la región del tallo basal y por el establecimiento de las semillas almacenadas en el suelo. La regeneración post-fuego puede ser prolífica y rápida [Cochrane, 1962]. Mientras que la mayoría de las plantas de *Ulex europaeus* sobreviven al fuego, la grave carbonización de la tierra donde está emplazado, hace que desaparezca la materia orgánica del horizonte superficial y que como consecuencia la planta muera. Típicamente, el fuego acelera la germinación de semillas de esta especie, dependiendo de la profundidad y lo socavadas que estén las semillas, así como también la severidad del fuego. Dado que rara vez, las temperaturas letales penetran bajo 1 centímetro del suelo, la pérdida de semillas de *U. europaeus* desde el banco de semillas es debido principalmente a la germinación y no a la mortalidad de ellas [Hartley, 1982].

En cuanto a la inflamabilidad, está reportado que *Ulex europaeus* tiene una alta concentración de aceites volátiles en su follaje y en sus ramas y produce considerable biomasa con abundante material muerto en el centro de la planta. También, es comúnmente reportado, que las poblaciones de *U. europaeus* son altamente inflamables, quemándose rápidamente y con una alta intensidad, por lo que posee un grave riesgo de incendio [U.S. Department of Agriculture, 2006].

La mayoría de las plantas de esta especie pueden sobrevivir al fuego, y post-incendio brotan desde la región basal del tallo, como rebrote [Rolston, 1980]. En cuanto a las semillas de esta especie, al ser expuestas al fuego, pueden ser quemadas, escarificadas, reducidas o afectadas de algún modo por este, aunque dependerá de la intensidad del fuego. El grado de rebrote, el establecimiento de semillas y la relativa importancia de estas estrategias de

regeneración que presente esta planta en su ambiente post-incendio, va a depender de la estación del año en que se presente el fuego, su severidad, frecuencia, vegetación asociada y las interacciones con otras prácticas de manejo [Gaynor, 1981].

Uno de los tantos manejos que hacen los silvicultores para tratar la especie, es quemar las poblaciones existentes de *Ulex europaeus* en conjunto con aerosoles químicos para limpiar la maleza, a menudo dominada por esta planta, como sitio preparativo para cultivo de plantaciones forestales. Se ha encontrado que la mayoría de los individuos de *Ulex europaeus* crecen después de tal tratamiento, pero por germinación de las semillas y no por el rebrote del tallo, debido a la inhibición del rebrote por la aplicación del herbicida [Birdling, 1952].

El fuego por sí solo no controla las poblaciones de *Ulex europaeus*, debido a que se regenera desde el tallo y las semillas comienzan a germinar. Adicionalmente, Rees and Hill sugieren que le toma varios años a esta especie para desarrollar suficiente desecho orgánico y tallos secos para permitir que el fuego lo calcine; y un solo incendio puede permitir el establecimiento un parche denso de la especie que puede persistir por 30 años y desarrollar un banco de semillas importante que podría permanecer por incluso más tiempo. Sin embargo, la quema de esta especie ha sido usada para manejarla en muchas áreas por décadas. King *et al* sugiere que si esta práctica se hace en el tiempo adecuado, la quema reduciría la biomasa de *Ulex europaeus*, su banco de semillas, destruye las semillas que aún están en las legumbres de la planta, mata a las plántulas y reduce el número de tratamiento en años posteriores para agotar el banco de semillas.

El uso del fuego en conjunto con el control biológico es complicado, debido a que el fuego mata a los agentes del control biológico [Norambuena, 2000]. El pastoreo por caprinos en un lapsus de 2 a 3 años después del fuego, ha demostrado reducir las poblaciones de *Ulex europaeus* a niveles insignificantes en los terrenos [Pande, 2002].

En Francia, *Ulex europaeus* es cultivado como forraje de reserva para el ganado y fue introducido en Nueva Zelanda como forraje doméstico para ovinos y caprinos [Krause, 1988]. En cuanto a la palatabilidad y al valor nutricional que presenta, *Ulex europaeus* es espinoso y en su mayoría desagradable cuando está en su estadio maduro. Sin embargo, esta especie es fácilmente ingerida por cabras y ovejas domésticas en pruebas de preferencia en interiores, aunque en terreno solo *Ulex europaeus* en estadio juvenil es ingerido por ovejas. Intentos examinando la preferencia tanto de cabras como de ovejas, dos variantes o ecotipos de *Ulex*

europaeus fueron testeados: la variedad de “espina corta” que además posee un follaje más denso y la variedad “salvaje”. Caprinos y ovinos tuvieron una alta preferencia por la variedad de “espina corta” y una baja predilección por el *Ulex europaeus* “salvaje” [Radcliffe, 1990]. Igualmente, 11 especies de arbustos fueron evaluados por su potencial como especies para forraje y la variedad “salvaje” de *Ulex europaeus*, estuvo entre las 3 especies con más potencial como especie de forraje en Nueva Zelanda [Hartley, 1982].

Tabla 1. Nitrógeno y concentraciones de elementos en hojas y en tallos de *Ulex europaeus* L. comparando sus dos variantes.

Variedad	Parte de la Planta	N*	P	K	S	Ca	Mg	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	Si
<i>U. europaeus</i> “salvaje”	Hoja	1.9	0.11	1.0	0.13	0.32	0.13	0.25	3.8	91	64	43	7.6
	Tallo	1.3	0.08	0.9	0.11	0.28	0.12	0.28	4.6	84	43	48	10.7
<i>U. europaeus</i> “espina corta”	Hoja	2.2	0.12	1.1	0.15	0.43	0.22	0.55	5.9	119	107	42	7.8
	Tallo	1.3	0.09	0.7	0.13	0.47	0.20	0.44	5.9	75	52	31	16.8

* Las unidades están expresados en % de materia seca para los macro-elementos (N, P, K, S, Ca, Mg, Na) y mg/kg de materia seca para los micro-elementos.

De esta tabla se puede inferir que, los caprinos y los ovinos, prefieren la variante de la especie *Ulex europaeus* “espina corta” debido a sus altos niveles nutritivos, expresados en la cantidades existentes tanto en macro como en micro elementos.

En su área de distribución, esta especie ha sido cultivada por mucho tiempo como forraje para alimentar el ganado y para constituir cercos vivos [Matthei, 1995]. Se ha sugerido que *Ulex europaeus* es útil en sitios mineros en recuperación y como una planta nodriza para la regeneración del bosque nativo. Es una fuente de varios químicos usados para propósitos médicos [Holthöfer, 1982] y es una gran fuente de polen para la industria de la miel [Richardson, 1998]. Además, *Ulex europaeus* tiene un gran potencial como fuente de energía renovable [Nunez-Regueira, 1996].

Muchos estudios indican que una vez establecido, *Ulex europaeus* tiende a dominar un área, excluyendo la vegetación deseable e incluyendo algunas plantas amenazadas. En las áreas intervenidas, *Ulex europaeus* puede impedir el deseable crecimiento de plántulas de coníferas e interferir con las operaciones forestales [Norambuena, 2000]. Es imposible atravesar un matorral de *Ulex europaeus*, por lo que evita el acceso del ganado y de la vida salvaje a algunas áreas. Esta especie es muy difícil de controlar, y a menudo infesta hábitats sensibles y terrenos accidentados donde los tratamientos de control son un costo prohibitivo [Hill, 1986]. Donde el suelo está desnudo entre individuos de *Ulex europaeus*, la erosión del suelo puede aumentar en las laderas escarpadas.

Como especie fijadora de nitrógeno, *Ulex europaeus* tiene el potencial de incrementar la cantidad total de nitrógeno y de su ciclo en sistemas invadidos. El aumento de la disponibilidad de nitrógeno puede reducir la diversidad de especies o alterar la composición de la comunidad vegetal. Adicionalmente, los desechos ricos en nitrógeno que provienen desde *Ulex europaeus* pueden acidificar el suelo [Eugonjobi, 1969].

El método más efectivo para manejar las especies que tienen el carácter de invasivo, es prevenir su establecimiento y diseminación. Algunos métodos de prevención incluyen la dispersión limitada de semillas, conteniendo infestaciones locales, minimizando la perturbación del suelo, detectando y erradicando tempranamente la introducción de la maleza, y el establecimiento de plantas que sean deseables y competitivas. King *et al* recomienda prevenir la perturbación del suelo, erosión y otras degradaciones, además de prevenir el transporte de semillas.

Esta especie es muy difícil de controlar, debido a que las plantas adultas brotan desde el tallo y desde las raíces, seguido del daño de partes aéreas y porque se establece un gran banco de semillas del cual numerosas plántulas se desarrollan, especialmente después de una perturbación. Repetidos esfuerzos en el control de esta especie después de varios años suelen ser necesarios para suprimir a la planta. Objetivos eficaces para el manejo de esta especie son necesarias para el control de *Ulex europaeus* e incluyen la inhibición de la producción de semillas, causar la muerte de arbustos maduros y el agotamiento del banco de semillas [Rees, 2001]. Nuevas infestaciones deberían ser tratadas antes que las anteriores, debido a que las plantas jóvenes son más fáciles de remover y la erradicación temprana evita la construcción

del banco de semillas en el suelo. Se debe remover *Ulex europaeus* desde la orilla de las carreteras para evitar la diseminación de la especie por parte de los vehículos. La planta debe ser limpiada por lo menos 5 metros de los límites requeridos para evitar la propagación de las semillas de *Ulex europaeus* a las zonas colindantes.

Las plantas adultas de *Ulex europaeus* pueden ser efectivamente exterminadas tirándolas desde el suelo por sus raíces. Sin embargo, esto no es factible debido a las largas infestaciones por esta planta, ni es apropiado en áreas sensibles con especies en riesgo, ya que se crea una importante perturbación al suelo [Richardson, 1998]. Esta planta puede ser también liquidada cortando los tallos vivos 5 centímetros sobre el nivel del suelo, o tratando a los tocones con herbicidas [Rolston, 1983]. Las plantas tratadas deben ser monitoreadas para observar si hay rebrote y para que los nuevos tallos sean cortados antes de que produzcan semillas. Tanto las plantas cortadas como las desraizadas deben ser removidas desde el sitio para prevenir el riesgo de incendio.

El manejo en cuanto a la restauración de las plántulas es particularmente importante en malezas de larga vida como lo es *Ulex europaeus*. La gran aparición de plántulas debe ser anticipada siguiendo cualquier tipo de control, y a estas se le debe permitir brotar, con el fin de agotar el banco de semillas presente en el suelo. Las plántulas son más fáciles de liquidar que las plantas adultas y pueden ser erradicadas del suelo manualmente antes de que alcancen los 50 centímetros de alto (no cortadas, debido a que esto promueve el rebrote), comenzando el primer o segundo año después del tratamiento inicial, y con sus respectivas repeticiones después de varios años [Bussan, 1999]. El decrecimiento del banco de semillas puede tardar varios años [Gaynor, 1981].

El control de *Ulex europaeus* requiere un compromiso a largo plazo para monitorear y seguir los tratamientos para remover plantas adultas, rebrotes, plántulas y semillas dispuestas como banco en el suelo. Es importante el seguimiento de la distribución de esta especie para prevenir el establecimiento de nuevas poblaciones. Los caminos y las áreas tratadas deben ser objeto de supervisión a lo menos una vez por año.

Una variedad de controles físicos y mecánicos han sido usados para controlar a esta especie, desde el desraizamiento manual de las plántulas hasta remover con maquinaria pesada, grandes infestaciones de esta planta [Chavasse, 1976].

Plántulas de *Ulex europaeus* y plantas juveniles que midan menos de 1.5 metros pueden ser arrancadas desde el suelo manualmente, especialmente después de que la lluvia ha ablandado el suelo. La azada es también eficaz cuando las plantas son pequeñas. Este método corta el ápice de la planta o expone a las plántulas a la acción secante del sol [INIA, 2007]. La práctica de cubrir el suelo con una capa protectora, conocido también con el nombre de “*mulch*”, puede ser efectivo para el control de la aparición de plántulas de esta especie [Prasad, 2003].

Las plantas adultas de *Ulex europaeus* son mucho más difíciles de controlar con aproximaciones físicas y mecánicas, y cuando son efectivas pueden impactar severamente el suelo y liderar la erosión de éste, afectando y dañando a especies deseadas. La herramienta llamada picota puede ser efectiva para el desraizamiento de plantas más grandes. El corte de partes de la planta sobre el suelo es sólo marginalmente efectivo, debido al rebrote que presenta al cabo de unos días. El corte de la planta es una preparación útil para otros métodos, tales como el tratamiento con herbicidas del tallo previamente cortado, el cual puede ser verdaderamente efectivo. Cortes repetitivos pueden llegar a ayudar a terminar la reserva de alimento que suplen las raíces, y es aún más efectivo cuando las plantas están comenzando su periodo de floración [Hartley, 1982].

El gorgojo de la semilla de *Ulex europaeus*, *Exapion ulicis*, está establecido en cualquier región del mundo donde se encuentra esta especie vegetal. La larva se alimenta de la semilla en crecimiento, que se encuentra dentro de las legumbres de *Ulex europaeus* en el periodo de primavera y los nuevos adultos emergen durante el verano. Los individuos adultos se alimentan del tejido que se encuentra bajo la cutícula de las espinas de la planta y de los tallos, por lo que puede retardar la diseminación y la invasividad de la especie, pero no reduce su establecimiento ni la densidad de la población. La redistribución de este curculiónido es innecesaria, excepto donde amplias áreas de esta planta han sido destruidas por el fuego, después de los cual este insecto puede tomarse muchos años para recuperarse [Norambuena, 2000].

La araña roja de *Ulex europaeus*, *Tetranychus lintearius*, está también establecida en poblaciones de esta especie alrededor del mundo y prevalece en áreas abiertas lejos del océano [Norambuena, 2007]. Estos arácnidos adultos viven en grandes colonias en las ramas terminales y producen grandes cantidades de redes y telas propias. Las larvas penetran y

extraen el contenido celular desde las espinas y el tejido del tallo. Un gran daño por estas arañas rojas reduce la floración al siguiente año. Como resultado de predación por parte del ácaro *Phytoseiulus persimilis*, la araña roja se ha visto como un agente de control biológico inefectivo en la mayoría de las áreas [Hill, 2000].

Un controlador biológico accidental de *Ulex europaeus* es *Agonopterix nervosa*, que se alimenta de las flores de *Cytisus scoparius*, que también daña las ramas que van creciendo en la planta de *Ulex europaeus* causando retraso en el crecimiento a corto plazo y haciendo que las plantas se vean más frondosas y con forma de arbusto [Coombs, 2004].

El pastoreo por caprinos y ovinos ha sido utilizado para el control de *Ulex europaeus* en algunas áreas. En un estudio a largo plazo, el mejor control para esta planta ha sido logrado, en primer lugar por la quema de poblaciones de esta maleza, seguido por el pastoreo de cabras o una mezcla de 2:1 de cabras y ovejas a 25 o más animales por hectárea. Las ovejas por si solas no pueden controlar la planta. Una vez que las plantas de *Ulex europaeus* son erradicadas por los caprinos y pastos densos se establezcan, los ovinos por si solos podrían mantener el terreno libre de *Ulex europaeus* por alrededor de 5 años [Hartley, 1982].

Las plántulas de *Ulex europaeus* pueden ser susceptibles a ser controladas mediante el pastoreo cuando especies competitivas están presentes. Las plántulas parecen adaptarse a la defoliación produciendo pequeños brotes con un hábito rastrero. Una vez que las espinas se endurecen, el control por pastoreo es probablemente menos efectivo.

Los herbicidas son efectivos para controlar una nueva invasión, ya sea de pequeña envergadura o una infestación severa, pero rara vez son una solución completa a largo plazo en el control de especies invasivas [Krause, 1998]. Los herbicidas son más efectivos en grandes infestaciones cuando son incorporados en un plan de control a largo plazo que incluya el reemplazo de la maleza con especies deseables, teniendo precaución con el manejo del terreno y la prevención de nuevas infestaciones. El control con herbicidas es temporal, por lo que no cambia las condiciones que permiten que las invasiones ocurran.

Plantas maduras de *Ulex europaeus* son difíciles de exterminar con una sola aplicación de herbicida y aplicado por sí solo no es una solución para el control de esta especie. Sin embargo, muchos herbicidas pueden ser opciones efectivas para el control bajo ciertas circunstancias, a pesar de las características de la planta que no favorecen la absorción ni la

retención del herbicida. El rendimiento de la mayoría de los herbicidas ensayados se mejoró mediante la adición de un adyuvante [Burrill, 1992].

La aplicación de herbicidas que exterminen plantas de *Ulex europaeus* y otra vegetación, crean micrositios adecuados para la germinación de esta especie, lo que conduce a un aumento en el área cubierta por *Ulex europaeus* a menos que los herbicidas se apliquen con cierta frecuencia. Un éxito mayor en el control para esta especie es posible con una combinación de métodos, que incluye el aplastamiento, la tala y la quema [King, 1996]. Se debe destacar que las plántulas de *Ulex europaeus* son más susceptibles al control químico que las plantas adultas [Bussan, 1999].

Ulex europaeus puede ser suprimido por el rápido crecimiento del pasto y por el dosel de los árboles, una vez que estos lo sobrepasen. La resiembra de especies nativas y perennes después de una quema inicial o tratamiento químico de los tocones, puede ser efectivo. Una vez establecidas, estas especies pueden desplazar a *Ulex europaeus* por la competencia por el recurso hídrico o de nutrientes o por la sombra que estas proveen a *Ulex europaeus*, cuando ya lo hayan sobrepasado [Hoshovsky, 1989].

El éxito de las especies competitivas depende del manejo subsecuente. El fuego debe ser excluido para evitar la expansión de *Ulex europaeus*. La temprana introducción del pastoreo puede también resultar en una gran reducción en el número de plántulas de esta especie [Krause, 1988].

Esta planta es mucho mejor controlada por un programa de manejo integral incluyendo monitoreo, prevención, pastoreo por caprinos, remoción manual y mecánica, reforestación, quema controlada y tratamientos localizados con herbicidas. La elección de los métodos específicos, sincronización y sus combinaciones, dependen de las condiciones del sitio y de la naturaleza de la infestación [King, 1996]. Todos los tipos de control requieren una cierta combinación entre ellos para que sea efectivo.

1.2. Distribución General de *Ulex europaeus* L.

Ulex europaeus es nativo de Europa central y de las islas británicas, donde es un importante componente de la vegetación nativa. Es posible encontrarlo en terrenos abandonados y bosques perturbados en su hábitat nativo [McClintock, 1979].

Introducido al este de Estados Unidos como una planta ornamental y para ser utilizada como cerco vivo a principios del 1800. *Ulex europaeus* se estableció fuera de cultivo cerca del año 1900 [Hill, 2000]. Esta planta fue también introducida a Australia y Nueva Zelanda a mitad del siglo XIX como forraje para el ganado doméstico y como cercos vivos, y a principios del año 1900 fue declarado como maleza en esos países. Es considerada como maleza en Chile, Irán, Italia, España y Tasmania [Norambuena, 2000]. La mayoría de la literatura sobre la biología, ecología y manejo de esta especie proviene desde Nueva Zelanda.

Ulex europaeus está considerada como una de las “100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo”, según un estudio realizado por el Programa Mundial Sobre Especies Invasoras en asociación con The World Conservation Union en el año 2004.

El “espinillo” o “retama espinosa”, nombre común que se le otorga a *Ulex europaeus* en Chile, cuenta con una gran distribución en el país. De hecho, Clos en Gay (1847) es quien la menciona por primera vez para Chile y comenta: “*Este pequeño arbusto se halla en Concón, a donde la introdujo el Sr. Miers. Se puede emplear en varios casos y merece una especial atención. Además de ser propio para hacer cercos impenetrables, se usa en Francia como combustible para calentar los hornos, y en varios departamentos en el invierno le dan al ganado como forraje, después de machacarlo para quitarle las espinas*”. Reiche (1897) comenta sobre la especie y su distribución: “*Esta planta fue observada en la provincia de Valparaíso (Concón) en tiempos pasados. Actualmente en las provincias de Concepción, Valdivia, Llanquihue. En Chiloé sirve para hacer cercas impenetrables, pero por motivos de las semillas, que saltan elásticamente de las legumbres, se ha hecho una maleza tan común como molesta*” [Matthei, 1995].

En Chile, actualmente *Ulex europaeus* es encontrado entre los paralelos 33° y 43° de latitud sur y se ha convertido en una amenaza para diversas actividades productivas en el país [Matthei, 1995].

Por lo general, suele encontrarse en suelos pobres en nutrientes, así como en la arena y suelos arcillosos. No suele crecer en suelos húmedos y es una maleza muy común en bosques cultivables de zonas templadas.

Esta especie fue introducida a Chile en el siglo pasado para su utilización en cercos vivos y para control de dunas en suelos arenosos. Desde ahí su abundante presencia produce daño económico a varias actividades, dado su comportamiento invasor y sus propiedades

combustibles. El daño más significativo lo genera al invadir superficie dedicada a la ganadería, bordes de caminos y carreteras, y zonas forestales.

En el plano de la silvicultura, *Ulex europaeus*, infesta plantaciones de *Pinus radiata* y *Eucaliptus globulus* (Norambuena, 2000). Este dato no es menor, debido a como se enunció anteriormente, el riesgo de incendio es alto y las pérdidas económicas pueden ser cuantiosas. Además, *Ulex europaeus* es mal competidor por luz, por lo que el daño a estas especies cultivables en cuanto a competencia lumínica, no es significativo.

1.3. Generalidades acerca de los Alcaloides

Los alcaloides son un grupo de compuestos biológicamente activos y/o de marcada toxicidad. El término alcaloide fue utilizado por primera vez por W. Meissner en 1819 para designar algunos compuestos activos que se encontraban en los vegetales y que poseían carácter básico. Más tarde, Winterstein y Trier en 1910 definieron los alcaloides, en un sentido amplio, como compuestos básicos, nitrogenados, de origen vegetal o animal y que tienen importante acción insecticida [Waller, 1978].

El término “alcaloide” es aplicado a compuestos que contienen nitrógeno, que tienen una actividad farmacológica importante y son producidos principalmente en plantas superiores, pero también en organismos inferiores y en algunos animales. Ellos representan una de las más grandes y más diversas familias de compuestos naturales, y contienen algunas de las más complicadas estructuras moleculares [Saxton, 1975].

Los alcaloides fueron considerados por un largo tiempo como productos únicamente especializados del metabolismo de las plantas. Aún, en tiempos recientes los alcaloides también se han aislado de animales tanto vertebrados como invertebrados. Algunos alcaloides extraídos de animales pueden claramente ser correlacionados con la ingesta de hojas de plantas hecha por el animal. Como ejemplo, el alcaloide castoramina, aislado desde *Castor canadense*, se parecen a los alcaloides de *Nuphar spp.*, el cual sirve de alimento para los castores. Algunas orugas acumulan alcaloides desde las plantas de las cuales se alimentan de flores y hojas. Otros alcaloides, sin embargo, tales como los encontrados en sapos, salamandras, y en algunos peces, son verdaderos productos del metabolismo animal y son utilizados como defensa química.

Los alcaloides son las drogas más antiguas. Desde los tiempos de Hipócrates, extractos de plantas se han conocido para ser útiles como medicina para un alto número de enfermedades. Incluso, con el gran progreso de la Química Orgánica, el cual ha resultado en una enorme producción de drogas sintéticas, algunos de los remedios más poderosos son todavía de origen vegetal. Mientras las síntesis orgánica de moléculas complejas, es a menudo, extremadamente costoso, las plantas los producen con un aparente, fácil y pequeño costo, por lo tanto las plantas permanecen como importantes fuentes de alcaloides. Los alcaloides en medicina permanecen como importante fuente de drogas tanto para enfermedades físicas, así como también para enfermedades mentales [Waller, 1978].

Una clasificación sistemática en taxones superiores, por ejemplo, órdenes y clases de plantas, pueden estar basados no solo en un compuesto, sino en un número de compuestos. Tal intento fue hecho por Hegnauer (1962). Él estaba convencido que los alcaloides y otros productos naturales podrían ser de uso en la taxonomía vegetal. Esta visión es expresada por el lema citado de Linné al comienzo de su trabajo *Chemotaxonomie der Pflanzen*:

“Las plantas que corresponden al mismo género tienen también las mismas cualidades; aquellas que están en el mismo orden natural tienen propiedades similares” C. Linné, *Philosophia Botanica*, 1751.

De acuerdo a la sistemática de Cronquist y Takhtajan, la distribución de algunos alcaloides coincide con patrones citológicos y anatómicos. Durante la primera parte del siglo XX, un número importante de hipótesis sobre la biogénesis de los alcaloides fueron propuestas. La mayoría de los autores consideraron los aminoácidos como la llave precursora de los alcaloides. Algunos alcaloides son derivados de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y esteroides [Gleason, 1991].

En la actualidad, se conocen más de 6000 alcaloides, restringidos a un número corto de familias botánicas y se continúa investigando en la búsqueda de nuevos compuestos pertenecientes a este grupo. Su distribución es abundante en Angiospermas, especialmente Dicotiledóneas, siendo algunas familias como Apocynaceae, Asteraceae, Loganiaceae, Papaveraceae, Rubiaceae, Ranunculaceae, Solanaceae, muy ricas en alcaloides. Entre las Monocotiledóneas destaca su presencia en dos familias: Amaryllidaceae y Liliaceae. Aparecen raramente en hongos, Criptógamas y Gimnospermas [Robinson, 1968].

Desde el punto de vista químico, todos los alcaloides son compuestos nitrogenados, en donde en la mayoría de los casos el nitrógeno forma parte de un heterociclo y en algunas ocasiones forma parte de una cadena abierta. Están constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas, como sólidos y cristalizables, y raramente suelen contener azufre [Glasby, 1975].

Su clasificación es compleja pudiéndose acometer desde distintos puntos de vista. En el momento actual parece ser la clasificación biogenética la de elección, es decir, según su biosíntesis en el vegetal [Bruneton, 1996].

Así, puesto que una gran parte de los alcaloides derivan de unos pocos aminoácidos de cadena abierta, o aromáticos, la clasificación puede realizarse de la siguiente forma:

- Alcaloides derivados de ornitina y lisina: tropánicos, pirrolizidínicos, piperidínicos y quinolizidínicos.
- Alcaloides derivados del ácido nicotínico.
- Alcaloides derivados de fenilalanina y tirosina: feniletilamínicos e isoquinoleínicos.
- Alcaloides derivados del triptófano: indólicos y quinoleínicos.
- Alcaloides derivados de la histidina: imidazólicos
- Alcaloides derivados del ácido antranílico.
- Alcaloides derivados del metabolismo terpenico: diterpénicos y esteroídicos.
- Otros alcaloides: bases xánticas.

Si bien es cierto, la biosíntesis de alcaloides es gobernada por los genes, hay importantes fluctuaciones en las concentraciones y las cantidades de alcaloides producidos por planta debido a influencias medioambientales [Sepúlveda, 2003]. Las condiciones medioambientales afectan el crecimiento general de la planta, así como también la formación de alcaloides. Debido a que la mayoría de los alcaloides son formados en los estadios juveniles de la planta, en tejidos con crecimiento activo, algunos factores afectan el crecimiento de este tejido, tales como la influencia de la luz, suministro de nitrógeno, potasio, fósforo, y otros minerales, temperatura, humedad del suelo, y altura sobre el nivel del mar afectará la producción de alcaloides. Dado que la producción de alcaloides envuelve varias vías metabólicas diferentes, muchas de las cuales no son completamente conocidas, un factor

medioambiental puede alterar la biosíntesis o la degradación de los alcaloides de diversos orígenes; este mismo factor puede incrementar la producción de alcaloides en una especie y decrecer en otra.

Las células vegetales son menos especializadas que las células animales en sus habilidades metabólicas. Una célula animal puede desarrollar o perder algunas propiedades metabólicas dependiendo del tejido; sin embargo este proceso es mayoritariamente irreversible. Esto también se aplica a las células vegetales; usualmente una célula vegetal de hoja, realiza el metabolismo de la hoja, mientras que una célula de raíz realiza sólo metabolismo de raíz. Bajo ciertas condiciones, es posible cambiar las propiedades metabólicas.

Mientras que los alcaloides de las Solanáceas son sintetizados predominantemente en raíces y convertidos a otros compuestos o degradados en partes aéreas de la planta, lo opuesto se ve en las Fabáceas, los cuales son sintetizados y acumulados en partes aéreas de la planta [Hesse, 1978]. En las Fabáceas, la legumbre acumula un alto nivel de alcaloides cuando tiene la oportunidad de obtenerlos. Algunos estudios evidencian que los alcaloides producidos en Fabáceas son sintetizados en las partes verdes de las plantas. Análisis microquímicos de tejidos de lupino confirman la presunción que los alcaloides son transportados por el floema y por lo tanto pueden ser fácilmente detectados en tejidos vasculares de la raíz, incluso cuando la raíz no está sintetizando alcaloides [Saxton, 1975]. Una examinación electro-microscópica de células de *Baptista* confirmó la suposición que los alcaloides de las Fabáceas son acumulados en las vacuolas [Waller, 1978].

Un número importante de plantas que producen alcaloides, generan semillas que no los poseen. Esto sucede en *Nicotiana*, *Hyoscyamus*, *Papaver* y muchas otras especies. En contraste, las semillas de plantas leguminosas poseen un alto contenido de alcaloides; algunas especies de lupinos, en la especie *Ricinus communis* y *Crotalaria* pueden acumular alcaloides hasta un 6% de la materia seca. Se ha demostrado que las semillas que no poseen alcaloides comienzan a producirlos inmediatamente después del comienzo de la germinación. Por el contrario, las semillas ricas en alcaloides de las leguminosas pierden los alcaloides durante la primera semana que sigue a la germinación. La nueva síntesis de alcaloides no comienza desde una semana a 10 días después de la germinación; embriones sin cotiledones no sintetizan alcaloides. Incluso cuando los cotiledones se separan y aumentan en tamaño, no

podrían sintetizar alcaloides. Por lo tanto, se puede concluir que se necesita de toda la planta para la síntesis de alcaloides. Se ha establecido que el comienzo de la producción de alcaloides coincide con la desaparición de la mayoría de las proteínas almacenadas en la semilla [Saxton, 1975].

Las Fabáceas tienden a acumular alcaloides durante la maduración. Las semillas que no poseen alcaloides comienzan la síntesis de alcaloides simultáneamente con la germinación, mientras que las semillas ricas en alcaloides tardan en sintetizar alcaloides. Los procesos que aceleran el crecimiento, usualmente incrementan la producción de alcaloides [Wink, 1994].

Los roles propuestos para los alcaloides en el metabolismo, catabolismo o fisiología de la planta son (1) productos finales del metabolismo o productos residuales, (2) almacenamiento de reserva de nitrógeno, (3) agentes protectores de la planta contra el ataque de predadores, (4) reguladores de crecimiento, o (5) sustitutos de los minerales en plantas, como por ejemplo el potasio y el calcio [Waller, 1978].

En cuanto a los alcaloides como estimuladores e inhibidores del crecimiento, se puede decir que la similitud estructural de algunos alcaloides con hormonas del crecimiento, estimulan la idea que a lo menos algunos alcaloides pueden jugar un rol como reguladores del crecimiento de la planta. Aunque la idea es un poco antigua, los obstáculos metodológicos son enormes, y el rol de los alcaloides en regulación del crecimiento fue probado en sólo algunos casos. Como regla, las plantas ricas en alcaloides crecen más lentamente que las especies que son pobres en ellos, pero esta regla tiene un número de excepciones. En adición a esto, es muy común que las especies que son ricas en alcaloides crecen bajo condiciones desfavorables y que la abundancia de alcaloides es causada por otros factores, los cuales no tienen efecto en el crecimiento, pero esta abundancia preserva las plantas de los animales herbívoros. La tasa de lento crecimiento es una adaptación al ambiente desfavorable, el cual no permite un crecimiento de elementos no vitales para la planta. Una planta en un medio ambiente óptimo, si es pastoreada, puede rápidamente regenerarse y producir semillas, mientras que una planta que está creciendo en un área árida, especialmente si un alto porcentaje de su follaje es destruido, no se puede recuperar. Crecimiento y depredación están tan entrelazados que es difícil juzgar cual es la causa y cuál es el efecto. Cuando se comparan plantas pertenecientes a una familia, se encuentra muy a menudo especies de lento crecimiento y géneros que son ricos en alcaloides creciendo en condiciones desfavorables; en contraste, se pueden encontrar

plantas emparentadas a estas creciendo en mejores condiciones, en mejores ambientes, pero tienen un contenido muy bajo de alcaloides. Por ejemplo, las plantas de la tribu Genisteae, que es rica en alcaloides son usualmente encontradas en áreas áridas, mientras que las plantas de la tribu Viciae son encontradas en áreas húmedas. Una explicación es que la planta rica en alcaloides, encuentra menos competencia por el sol, por lo que no necesita crecer tan rápidamente para evitar ser opacada por la sombra de otras plantas, y por lo tanto un tipo de planta xerófila de lento crecimiento es selectivamente favorecida. Otras explicaciones plausibles, tales como la disponibilidad de humedad del suelo y los niveles de nutrientes podrían también ser importantes.

Un alcaloide común para una familia vegetal o una unidad taxonómica similar, lo más probable es que se haya generado junto con el grupo de las especies. La edad de la mayoría de estas familias se remonta a la era Cretácica superior, por lo que los alcaloides deben tener la misma edad.

En cuanto a función de los alcaloides se trata, la noción más común es que los alcaloides son productos de desecho que juegan un papel no preponderante como compuestos protectores de la planta y se acumulan en la planta porque la planta carece de un órgano excretor comparable a los riñones animales. Sin embargo, las plantas sorprendentemente sí tienen un sistema efectivo de excreción, la abscisión, y es curioso que ese sistema no haya sido ampliamente reconocido [Saxton, 1975]. Cada planta, sin excepción, produce nuevas hojas y bota las antiguas mientras crece. Antes de que la hoja esté lista para ser desechada, todos los metabolitos que pueden ser útiles son translocados y sólo los verdaderos residuos permanecen. Si los alcaloides fueran residuos, estarían concentrados en las hojas muertas o convertidos en otra forma, como ocurre con los alcaloides introducidos e inusuales compuestos biosintéticos. Parece más convincente que, desde que el carácter alcaloideo es bien establecido en algunas plantas, es necesario para esas especies producir y almacenar algunos alcaloides en, por ejemplo, las semillas, como también en trazas en otras partes. Un sistema ineficiente hace mucho tiempo habría sido erradicado por selección [Hesse, 1978]. El rol singular de algunos alcaloides puede ser diferente en distintas plantas, y este rol en una planta libre de alcaloides, puede ser cumplido por otros compuestos, pero la función protectora, tanto en el presente como en el pasado, puede ser la razón de existir de la mayoría de los alcaloides.

En 1973, Fairbairn *et al* mostraron que el pellet obtenido por la centrifugación del látex de *Papaver somniferum* era capaz de llevar a cabo reacciones biosintéticas y dar como producto a la morfina. El pellet consistía en partículas vacuolares, y el nombre propuesto para estas partículas fue “Vesícula alcaloidal”. A estas vesículas alcaloidales les fueron atribuidas las siguientes funciones: (1) almacenamiento de alcaloides (95-99%), (2) biosíntesis y catabolismo de los alcaloides, y (3) translocación de los alcaloides. Es realmente notable que un organelo específico en la planta le haya sido atribuido estas tres funciones. Ellos descubrieron que los alcaloides parecen ser almacenados en el contenido de la vesícula en vez de su membrana; la evidencia indica que tanto el látex como las vesículas del tallo son translocadas en una cápsula durante su rápida expansión después que el pétalo cae.

Roddick en 1976, aisló tejido pericárpico de tomates verdes (*Lycopersicon esculentum*) homogenizados y separados en fracciones de organelos por centrifugación diferencial. Encontró que la α -tomatina fue principalmente localizada en los 105 gramos de sobrenadante, con pequeñas cantidades en los microsomas. Él sugirió que la tomatina se acumula en las vacuolas y/o en la fase soluble del citoplasma, también llamado citosol.

De este modo, la evidencia implica que la vacuola contiene a los alcaloides y posee algunas enzimas requeridas para la biosíntesis de alcaloides.

1.4. Alcaloides en *Ulex europaeus* L.

El género *Ulex* pertenece a la familia Fabaceae, que como características presenta alcaloides del tipo quinolizidínicos [Wink, 1994]. El género *Ulex*, y en especial la especie *europaeus*, posee alcaloides del tipo quinolizidínicos, que son los derivados de la ornitina y la lisina. En este grupo se consideran una serie de compuestos que derivan de la lisina y que poseen una estructura de un heterociclo bicíclico nitrogenado, por lo que se diferencian de otras estructuras alcaloideas en las que coexiste la quinolizidina con otra estructura nitrogenada diferente. Son especialmente abundantes en la familia Fabaceae, aunque también se han encontrado e identificado en plantas de las familias Solanaceae, Berberidaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae y Chenopodiaceae.

Por lo general, pueden considerarse como sustancias tóxicas, ya sean hepatotóxicas, neurotóxicas y teratógenas, y muchas tienen propiedades insecticidas [Bruneton, 1996].

Excepto por ocurrencias aisladas en las familias Chenopodiaceae, Berberidaceae, y Solanaceae, los alcaloides quinolizidínicos binarios, terciarios y cuaternarios son encontrados sólo en tribus de la subfamilia Faboideae de la familia Fabaceae (Sophoreae, Genisteae, Podalyrieae y raramente en Dalbergieae y Galegeae). Aunque algunos alcaloides, tales como lamprolobina y retamina (1) parecen ser restringidos en distribución, la lupinina (2), citisina (3) y esparteína (4) son de distribución amplia en las tribus Sophoreae, Genisteae y Podalyrieae [Saxton, 1975].

Cranmer y Turner en 1967, presentaron argumentos sobre la existencia de alcaloides quinolizidínicos en las tribus de la subfamilia Faboideae. Estos argumentos sugieren que los alcaloides se habrían originado de un linaje ancestral común que contenía un *pool* de genes para la síntesis de estos compuestos. Ciertamente, las asombrosas similitudes en la química de los alcaloides en los géneros que pertenecen a las tribus Sophoreae, Genisteae, Podalyrieae apoyan este punto de vista.

En la siguiente tabla, se dan a conocer la distribución de los alcaloides quinolizidínicos en la tribu Genisteae.

Tabla 2. Distribución de los alcaloides quinolizidínicos en la tribu Genisteae.

Tribu	Lupinine	Cytisine	Caulophylline	Sparteine	Lupanine	Anagyrine	Retamine	Sophoramine
Genisteae								
<i>Adenocarpus</i>				+				
<i>Argyrolobium</i>		+	+					
<i>Cytisus</i>		+	+	+	+	+	+	
<i>Genista</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hovea</i>				+				
<i>Laburnum</i>		+	+					
<i>Lupinus</i>	+		+	+	+			
<i>Petteria</i>		+	+		+	+		
<i>Spartium</i>		+	+			+		
<i>Templetonia</i>		+		+				
<i>Ulex</i>		+	+			+		

De acuerdo a esta tabla se puede llegar a la conclusión que el género *Ulex* posee sólo tres alcaloides en su composición: (1) Citisina, (2) N-Metil-citisina o Caulofilina y (3) Anagirina.

En el trabajo de Máximo *et al* el año 2006, realizaron un estudio quimiotaxonómico basado en los alcaloides quinolizidínicos presentes en seis especies del género *Ulex*, esto con el fin de establecer una clasificación quimiotaxonómica de las especies del género que crecen en Portugal. Las especies estudiadas fueron *U. airensis*, *U. australis*, *U. densus*, *U. europaeus* L., *U. jussiaei* y *U. minor*.

Uno de los resultados relevantes fue que dentro de los alcaloides encontrados en *Ulex europaeus* L. está la Citisina, la Caulofilina, 5,6-dehidrolupanina, Rombifolina, Lupanina, N-formilcitisina, N-acetilcitisina, Anagirina, Baptifolina y Jussiaeiinas. En cuanto a concentraciones de alcaloides destaca la Citisina con 83.8 ppm/peso seco y Anagirina con 32.6 ppm/peso seco de la planta. Además, cabe mencionar que los demás alcaloides se encuentran en menores concentraciones.

Tabla 3. Composición de alcaloides Quinolizidínicos en 19 poblaciones de *Ulex* L.

Especies	Población	Alcaloides																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>U. airensis</i>	3/98		X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X			
<i>U. australis</i>	2/97	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X
<i>U. densus</i>	1/95	X		X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X
<i>U. europaeus</i>	1.3/94				X	X	X	X	X		X	X	X				X	
<i>U. jussiaei</i>	1.1/94			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>U. minor</i>	1.2/94	X			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X

Nomenclaturas alcaloides:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. Esparteína | 10. N-formilcitisina |
| 2. B-isoesparteína | 11. N-acetilcitisina |
| 3. Jussiaeiine A | 12. Anagirina |
| 4. Caulofilina | 13. Jussiaeiine C |
| 5. Citisina | 14. Jussiaeiine D |
| 6. 5,6-dehidrolupanina | 15. Pohakulina |
| 7. Rombifolina | 16. Baptifolina |
| 8. Lupanina | 17. Epibaptifolina |
| 9. Jussiaeiine B | |

En relación a la Citisina ($C_{11}H_{14}N_2O$) es un alcaloide que ha sido descrito como baptitoxina, sophorina y ulexina, y aparece ampliamente distribuido entre varias especies de la familia Fabaceae. Es un alcaloide terciario y fue descubierto en el género *Ulex* por Gerrard en 1886. Es una base fuertemente alcalina que forma sales cristalinas aunque por lo general son de carácter soluble [Glasby, 1975]. La citisina, está en el mismo grupo farmacológico que la nicotina y es un poderoso veneno, causante de náuseas, luego convulsiones y muerte, debido a una falla respiratoria. La citisina ha sido comercializada para controlar el tabaquismo. Este alcaloide también es fuente de la síntesis de la varenicilina, hoy empleado para el mismo uso. Se caracteriza por ser un agonista ganglionar con alta afinidad por el receptor nicotínico [Pabreza, 1990].

En cuanto a la N-Metil-citisina o también denominada Caulofilina, es un alcaloide terciario cristalino de fórmula $C_{12}H_{16}N_2O$. Fue descrito por primera vez en 1965 para el género *Ulex* por Faugeras y Paris, en 1965. Este alcaloide es incoloro, inodoro y casi insípido. Se cristaliza con dificultad. Tienen propiedades emenagogas, diuréticas y antiespasmódicas.

Es conocido por ser utilizado en el tratamiento contra el reumatismo y por ser usado como expectorante cuando existe bronquitis [Glasby, 1975].

Por su parte, el alcaloide cuaternario Anagirina ($C_{15}H_{20}N_2O$), también denominado Termopsina, forma sales cristalinas. Fue reportado para la especie *Ulex europaeus* por Clemo y Raper, en 1935. Posee propiedades eméticas y al ser ingerida por bovinos produce malformaciones congénitas en terneros. En terneros nacidos de madres que han consumido grandes cantidades de herbáceas ricas en este alcaloide entre los 40 y 75 días de gestación, se describe una malformación llamada “enfermedad del ternero torcido” caracterizada por artrogriposis, tortícolis, xifosis, escoliosis y paladar hendido, en diversas combinaciones lesionales. La Anagirina no parece producir este efecto en ovinos [López, 1999].

1.5. Otros metabolitos secundarios presentes en *Ulex europaeus* L.

Los brotes, semillas y flores de *Ulex europaeus* han sido el sujeto de sin número de investigaciones y ha sido posible aislar alcaloides, aminoácidos, glucósidos y flavonoides. Se han reportado además carotenoides, hentriacontano, sitosterol y esterol. Posteriores investigaciones dan a conocer que la planta contiene β -amirina, lupeol y β -sitosterol y Soyasapogenol C [McLean, 1963].

1.6. El éxito de especies introducidas como plantas invasoras.

Uno de los misterios en ecología es cómo algunas plantas exóticas que se encuentran en bajas densidades en su rango nativo, llegan a poseer una alta densidad en el rango introducido. Cuando algunas plantas son introducidas a nuevos hábitats por humanos, algunas de estas especies llegan a ser mucho más invasoras o dominantes. Esto es primariamente atribuido al escape de consumidores especialistas de la planta. En cuanto al despojo de estos depredadores, se piensa que conduce a la evolución de una capacidad competitiva mayor, impulsada por una disminución en la planta a la asignación de recursos a su defensa y un aumento en la asignación al tamaño o a la fecundidad de esta. Por lo tanto, se discute una nueva teoría para el éxito en la invasividad, “*The Novel Weapons Hypothesis*” [Callaway, 2004]. En esta hipótesis se propone que algunas plantas invasoras se transforman, ya que

poseen nuevas armas bioquímicas o antimicrobianas que funcionan inusualmente como poderosos agentes alelopáticos o como mediadores entre las interacciones de la planta y el suelo y organismos microbianos. En otras palabras las “nuevas armas” de algunas especies invasoras les proveen una ventaja que pudiera surgir de las diferencias en las trayectorias regionales coevolutivas de las comunidades vegetales. Además, la ventaja de poseer una “nueva arma” puede resultar en la rápida evolución de esa arma. La selección directa de características competitivas proporciona una alternativa a la de “crecer frente a defender”, equilibrios que sustentan la teoría de la evolución de la incrementada habilidad competitiva [Callaway, 2004]. Un gran número de explicaciones para este éxito de invasión han sido propuestos [Mack, 2000], pero una hipótesis basada en los depredadores predomina, la “*Natural Enemies Hypothesis*” y en una reciente expansión de esta, se presenta “*The Evolution of Increased Competitive Ability*” (EICA) [Blossey, 1995; Müller - Schärer, 2004]. La hipótesis de los enemigos naturales, atribuye el éxito de plantas exóticas al hecho de que, debido a una introducción muchas de estas plantas son liberadas de sus herbívoros y patógenos especialistas. Según esta hipótesis, se cree que estas plantas poseen una considerable ventaja debido a que sus poblaciones ya no son directamente suprimidas por los consumidores y patógenos especialistas de la especie y por lo tanto obtienen una mayor ventaja competitiva sobre las especies nativas que pueden sufrir desproporcionadamente del ataque de sus enemigos naturales [Callaway, 2004].

La hipótesis EICA que las plantas exóticas liberadas de sus enemigos especialistas nativos, deberían perder los altos costos generados que les ayudaron a resistir a sus enemigos. Al evolucionar y asignar menos recursos para contrarrestar esa resistencia a sus enemigos naturales que en el rango introducido, las plantas invasoras pueden usar más recursos para rasgos que proveen una gran ventaja competitiva, como el tamaño de la planta o su fecundidad. Aunque la hipótesis EICA sólo se refiere a una habilidad competitiva, fue explícitamente desarrollada en el contexto de “crecer o defenderse” [Herms, 1992].

La “hipótesis de las nuevas armas” que se propone, plantea que algunas especies exóticas que son débiles en su rango nativo se transforman en plantas invasoras, exudando bioquímicos que son altamente inhibitorios en plantas o en microorganismos del suelo en comunidades invadidas, pero relativamente inefectivas contra sus depredadores naturales que se han adaptado a través de tiempo [Rabotnov, 1982]. La posesión de nuevas armas por

algunas plantas invasoras les provee una ventaja, que surge de diferencias regionales en trayectorias coevolutivas [Thompson, 1999]. La definición de “Nuevas Armas” es limitada a la liberación de bioquímicos de plantas invasoras que afectan a las plantas nativas o la vida nativa del suelo, y con la que las plantas nativas interactúan. Las plantas invasoras, pueden liberar bioquímicos que alteran el suelo en orden de perjudicar a la flora nativa del lugar [Callaway, 2004].

Una manifestación de las diferentes trayectorias evolutivas regionales, puede ser el gran número de productos bioquímicos producidos por las plantas. Hasta el momento, una amplia gama de más de 100.000 productos naturales de baja masa molecular han sido identificados, muchos de los cuales son específicos para cada especie [Bais, 2002]. Esta rica diversidad es probablemente debida a presiones de selección para diferentes trabajos de la planta, incluyendo la adquisición de nutrientes desde el suelo, defensa contra herbivoría, comunicación entre raíces y protección antimicrobiana [Callaway, 2004].



1.7. Hipótesis

Las hipótesis que se pusieron a prueba en esta investigación son las siguientes:

Hipótesis N° 1:

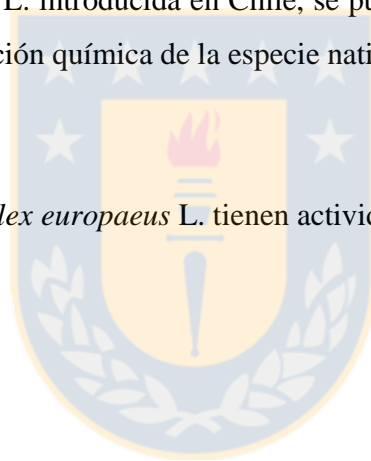
La especie *Ulex europaeus* L. introducida en Chile, posee un menor número de alcaloides que la especie nativa de Europa, debido a que utiliza su energía en producción de biomasa, en vez de gastar recursos en defensas, ya que no se encuentra en su rango nativo con sus controladores biológicos naturales.

Hipótesis N° 2:

En la especie *Ulex europaeus* L. introducida en Chile, se pueden encontrar algunos alcaloides que coinciden con la composición química de la especie nativa de Europa.

Hipótesis N° 3:

Los alcaloides de la especie *Ulex europaeus* L. tienen actividad insecticida.



1.8. Objetivos

El objetivo general planteado es el siguiente:

Objetivo General:

Determinar la composición cualitativa y cuantitativa de alcaloides en plantas de *Ulex europaeus* L. naturalizadas en Chile y evaluar su actividad biológica.

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

Objetivo Específico N° 1:

Obtener extractos alcaloideos a partir de semillas y tallos de la especie *Ulex europaeus*.

Objetivo Específico N° 2:

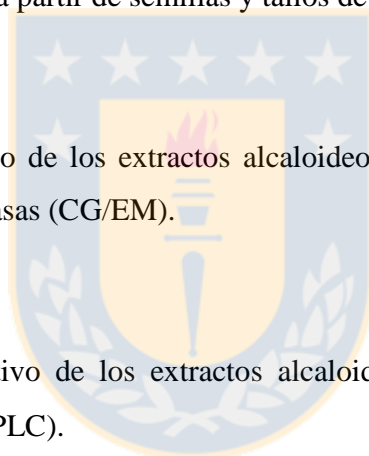
Realizar un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía de Gas con Espectrometría de Masas (CG/EM).

Objetivo Específico N° 3:

Efectuar un análisis cuantitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Objetivo Específico N° 4:

Determinar el grado de acción insecticida que tiene el extracto alcaloideo de *Ulex europaeus* en larvas de *Drosophila melanogaster* (Díptera: Drosophilida).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal de *Ulex europaeus* L. se colectó en cinco regiones del país; estas fueron la región del Maule, Biobío, Araucanía, Los Ríos y Los Lagos. Esta colecta se realizó durante la temporada de otoño del año 2011. Por otro parte, se colectaron 115 gramos de semillas provenientes de la región del Biobío, durante la temporada de verano del año 2011. Una muestra de cada planta se incorporó al Herbario de la Universidad de Concepción (CONC).

La metodología que se empleó para obtener los alcaloides está basada en la de Peña & Cassels, 1996, y se efectuó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, en la Facultad de Ciencias Biológicas y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, ubicada en la ciudad de Concepción, Chile.

115 gramos de semilla molidos de *Ulex europaeus* L., se extrajeron con metanol. Se concentró el extracto a sequedad en evaporador rotatorio y se disolvió en 1% de ácido sulfúrico. Luego se alcalinizó con amoníaco y se sometió a separación líquido/líquido con acetato de etilo; ambos extractos se concentraron a sequedad. La misma técnica se empleó para extraer los alcaloides de los tallos de la especie. En este caso, la cantidad de material vegetal fue de 1 kilo por muestra.

2.1. Detección de alcaloides

2.1.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con sílica gel 60 F254 (Merck, Alemania). Para la separación de los alcaloides se utilizó como fase móvil cloroformo: metanol (80:20). La detección de los alcaloides se llevó a cabo mediante revelado con reactivo de Dragendorff.

2.1.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)

Las fracciones obtenidas fueron resuspendidas en diclorometano 100ul y filtradas. Para realizar la cromatografía de gases capilar-espectrometría de masas se inyectó 1µl del extracto a un cromatógrafo de gases capilar Agilent Technologies 7890 System VLMSD, con columna capilar HP-5MS (30mx0, 25mm d.i.), acoplado a un espectrómetro de masas con detector HP Model.5975. El gas de arrastre fue helio con un flujo de 1ml/min. Las temperaturas del inyector y el detector fueron 250°C y 300°C, respectivamente. El programa de temperatura fue de 100°C 2min, isotérmica de 100°C-280°C a 8°C/min, 280°C ,40 min. Rango barrido de masas 100-500 AMU.

La abundancia relativa de alcaloides se calculó considerando las áreas de los picos del cromatograma, mientras que la identificación de los alcaloides se llevó a cabo comparando los espectros de masas obtenidos con los de la biblioteca del software y con los reportados en la literatura. Además, se obtuvo el fraccionamiento para cada molécula con esqueleto quinolizidínico.

2.1.3. Cromatografía líquida de alta Resolución (HPLC) Preparativo

El análisis se desarrolló con un equipo HPLC preparativo KNAUER con detector UV, pump 1800, Columna Kromasil 50X250mm. La muestra antes de inyectarse se filtró a través de un acrodisco de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA), inyectando un volumen de 500ul. Se usó como sistema de solventes: diclorometano: metanol (90:10). La velocidad de flujo fue 20 ml/ min. La detección de los alcaloides realizó a 310 nm a temperatura ambiente.

2.1.4. Cromatografía líquida de alta Resolución (HPLC) Analítico

El análisis se desarrolló con un equipo HPLC analítico Shimadzu con DAD, modelo 10AD-VP. Se empleó como fase estacionaria una columna Kromasil C-18 (250X4.6mm i.d) 5µm y como fase móvil un mezcla isocrática de acetonitrilo: agua (18:82) pH 6 a 40°C. Se obtuvieron los espectros UV para los alcaloides encontrados.

2.2. Ensayo Biológico: Determinación del grado de acción insecticida del extracto alcaloideo de *Ulex europaeus* L. en larvas de *Drosophila melanogaster* (Díptera: Drosophilidae)

El ensayo para medir la actividad insecticida del extracto alcaloideo de *Ulex europaeus* se realizó en la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío-Bío, Campus Fernando May, Chillán, Chile y fue adaptado del método descrito por Alarcón et al. (2011). Cuatro concentraciones (10.0, 25.0 y 50.0 ppm de muestra) fueron usados para determinar los valores de la LC_{50} . Las muestras del test fueron disueltas en 50 microlitros de Etanol y mezclados en 1 ml de dieta artificial (60 g de levadura de cerveza, 80 g de glucosa, 12 g de agar y 8 ml de ácido propiónico en 1 L de agua). Una dieta control fue tratada con 50 microlitros de sólo Etanol. Alrededor de 100 adultos que provenían de colonias de *Drosophila melanogaster*, fueron introducidos en una nueva botella de cultivo, en la cual la dieta artificial se vertió en una cápsula de Petri y permitiendo que ovopositen a 25°C y con una humedad relativa mayor que 60% por 3 horas. La dieta fue sacada de la botella, y 10 nuevos huevos fueron colectados y traspasados a cada dieta (1ml) en tubos de vidrio y criados a 25°C con una humedad relativa mayor que 90% por 8 días. Un día después del traspaso, los huevos eclosionaron y las larvas fueron alimentadas con la dieta artificial en cada extracto del test. A los 25°C, las larvas generalmente cambian a pupa después de 7 días. En cada instancia, el estadio de desarrollo fue observado y el número de pupas contabilizado y comparadas con las del control. Diez nuevos huevos fueron usados en cada uno de los tres replicados. La LC_{50} , la concentración que produce 50% de mortalidad, fue determinada por análisis log-PROBIT.

3. RESULTADOS

3.1.Obtención de extractos alcaloideos a partir de semillas y tallos de la especie *Ulex europaeus*.

Tabla 4. Cantidad de extracto obtenido en relación al peso seco de la muestra y su rendimiento.

Parte de la Planta	Peso de la muestra (g)	Extracto total (mg)	Rendimiento (%)
Semillas	115	440	0.380
Tallos Verdes Parral	1000	335.3	0.033
Tallos Verdes Concepción	1000	944.7	0.094
Tallos Verdes Temuco	1000	125.1	0.012
Tallos Verdes Valdivia	1000	179.4	0.018
Tallos Verdes Pto. Montt	1000	877.1	0.087

3.2.Realización de un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía de Gas con Espectrometría de Masas (CG/EM).

3.2.1. Semillas de *Ulex europaeus* L.

Una vez obtenidos los extractos alcaloideos a partir de semillas de *Ulex europaeus*, el análisis mediante Cromatografía de Gas con Espectrometría de Masas (CG/EM), dio como resultado la presencia de tres alcaloides en semillas de *Ulex europaeus*, tal como lo indica la siguiente tabla:

Tabla 5. Alcaloides en semillas de *Ulex europaeus* L.

Alcaloide	T.R. (min)	M.M	Abundancia (%)	mg/peso seco
Caulofilina	16.26	204	5.84	0.223
Citisina	16.86	190	42.8	1.635
Anagirina	20.14	244	0.18	0.0069

En el estudio realizado a las semillas de *Ulex europaeus* se determinó la presencia de tres alcaloides quinolizidínicos característicos de esta especie. Los métodos cromatográficos resultaron ser útiles en la determinación de la abundancia relativa de estos alcaloides quinolizidínicos, resultando Citisina el que presenta mayor abundancia, un 42.8% en el extracto analizado, a diferencia de la Caulofilina con una abundancia del 5.84% y la Anagirina con una abundancia de 0.18%.

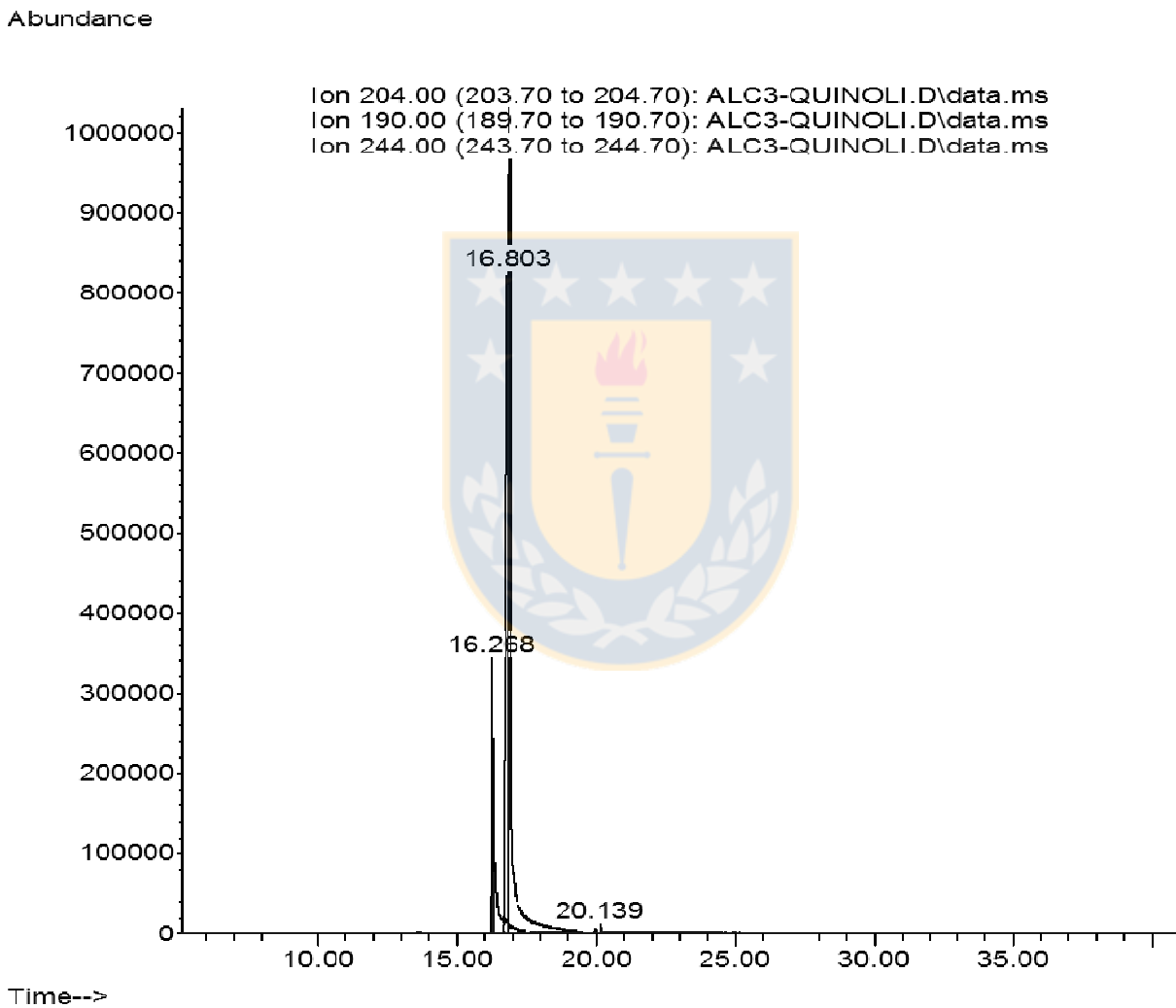


Figura 5. Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados en semillas de *Ulex europaeus* L.

3.2.2. Tallos de *Ulex europaeus* L.

Ya conseguidos los extractos alcaloideos a partir de tallos, considerando además otras partes aéreas de la planta, el análisis mediante Cromatografía de Gas con Espectrometría de Masas (CG/EM), dio como resultado la presencia de alcaloides en tallos de *Ulex europaeus*, tal como lo indica la siguiente tabla:

Tabla 6. Alcaloides en tallos de *Ulex europaeus* L.

Región	Alcaloide	T.R. (min)	M.M	Abundancia (%)	mg/peso seco
Maule (Parral)	Lupanina	18.21	248	8.84	0.030
	Anagirina	20.32	244	76.31	0.256
Biobío (Concepción)	Caulofilina	16.44	204	25.79	0.244
	Citisina	16.99	190	38.84	0.367
	Anagirina	20.21	244	19.25	0.182
Araucanía (Temuco)	Lupanina	18.20	248	15.54	0.019
	Anagirina	20.24	244	77.18	0.096
Los Ríos (Valdivia)	Lupanina	18.21	248	14.06	0.025
	Anagirina	20.25	244	73.71	0.132
Los Lagos (Pto. Montt)	Anagirina	20.23	244	41.55	0.364

En el estudio realizado a los tallos de *Ulex europaeus* de diferentes localidades, se logró determinar la presencia de cuatro alcaloides quinolizidínicos. El Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas detectó en esta oportunidad, un alcaloide que no está presente en las semillas de la especie estudiada, como se puede observar en la Tabla N° 6. A continuación, se muestran los espectros CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados en tallos de *Ulex europaeus* y los espectros de fragmentación respectivos de los alcaloides quinolizidínicos de la especie por CG-MS.

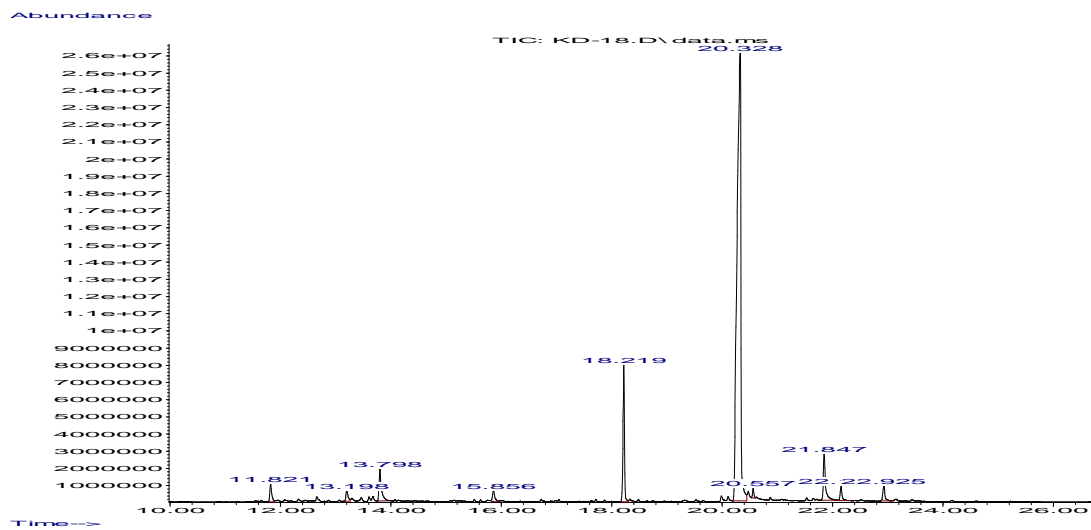


Figura 6. Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de *Ulex europaeus* de la localidad de Parral, región del Maule.

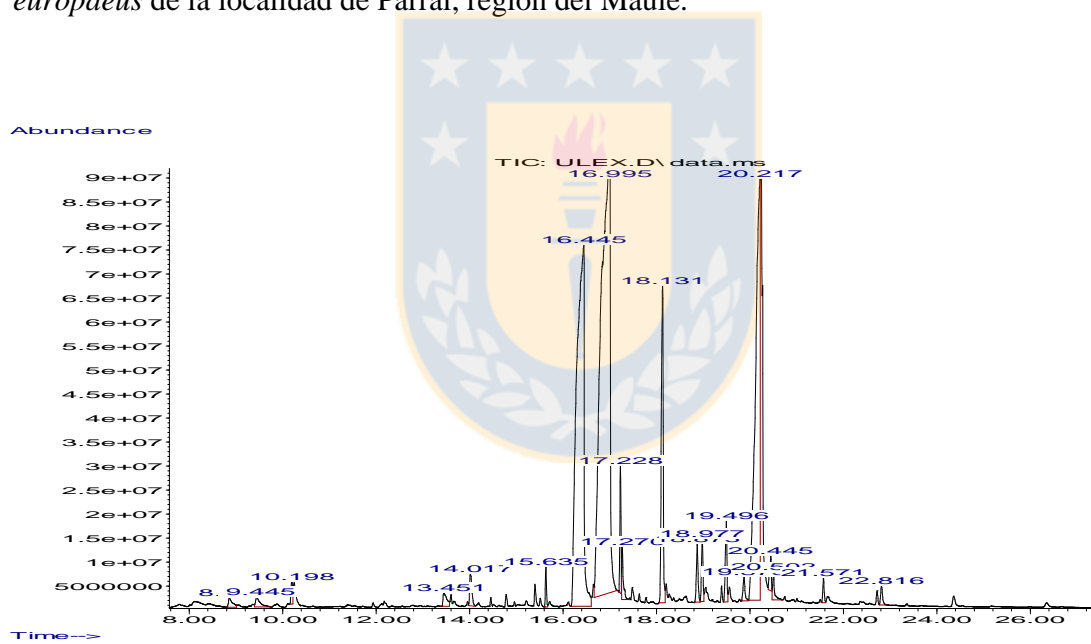


Figura 7. Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de *Ulex europaeus* de la localidad de Concepción, región del Biobío.

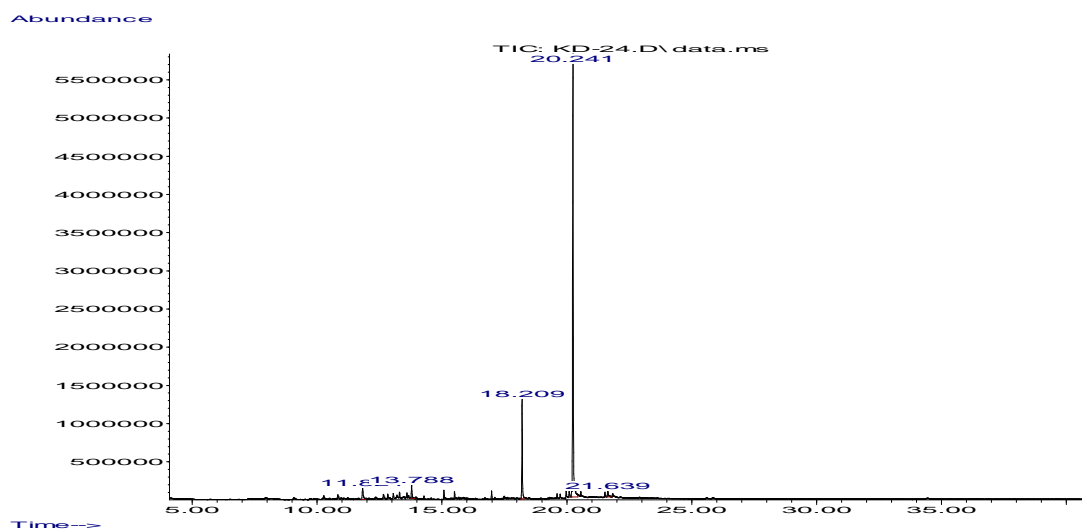


Figura 8. Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de *Ulex europaeus* de la localidad de Temuco, región de la Araucanía.

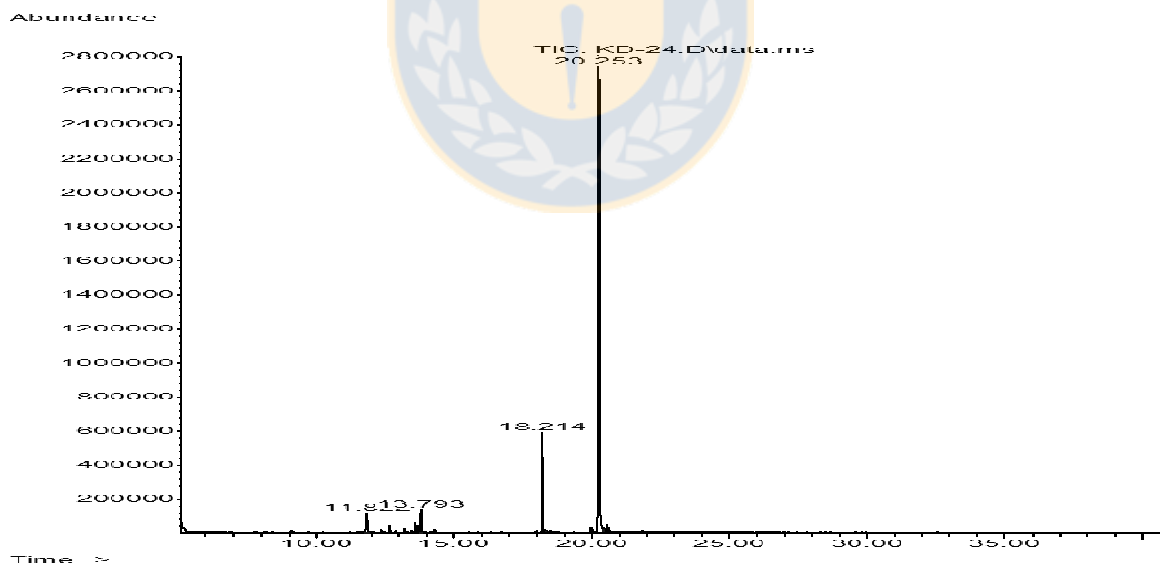


Figura 9. Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de *Ulex europaeus* de la localidad de Valdivia, región de Los Ríos.

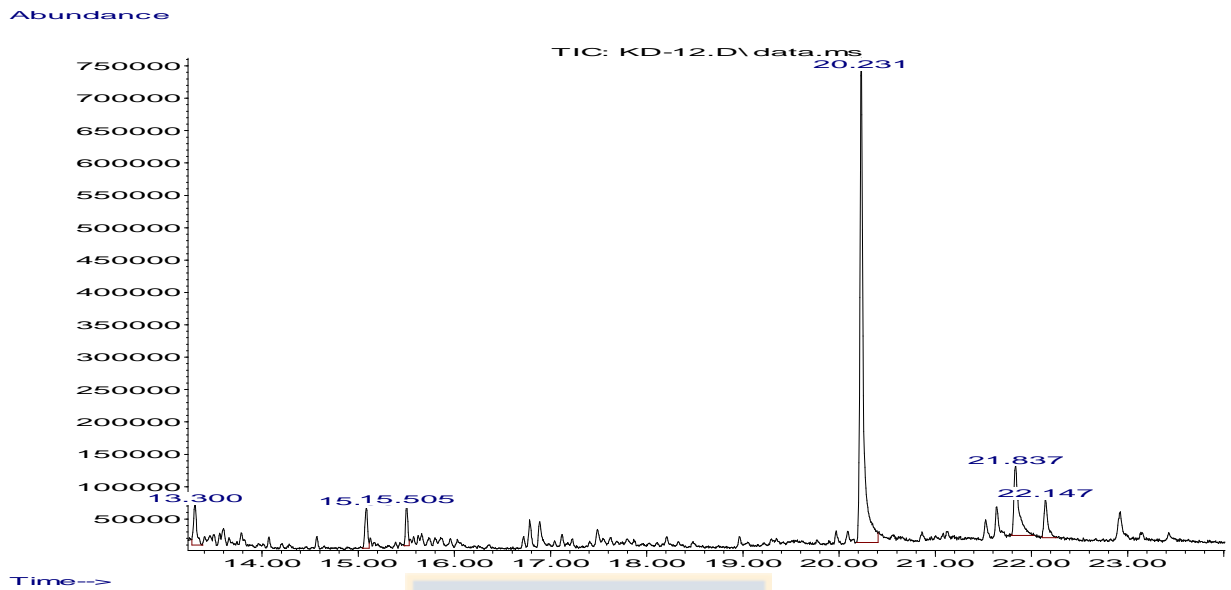


Figura 10. Espectro CG-MS para los alcaloides Quinolizidínicos analizados de tallos de *Ulex europaeus* de la localidad de Puerto Montt, región de Los Lagos.

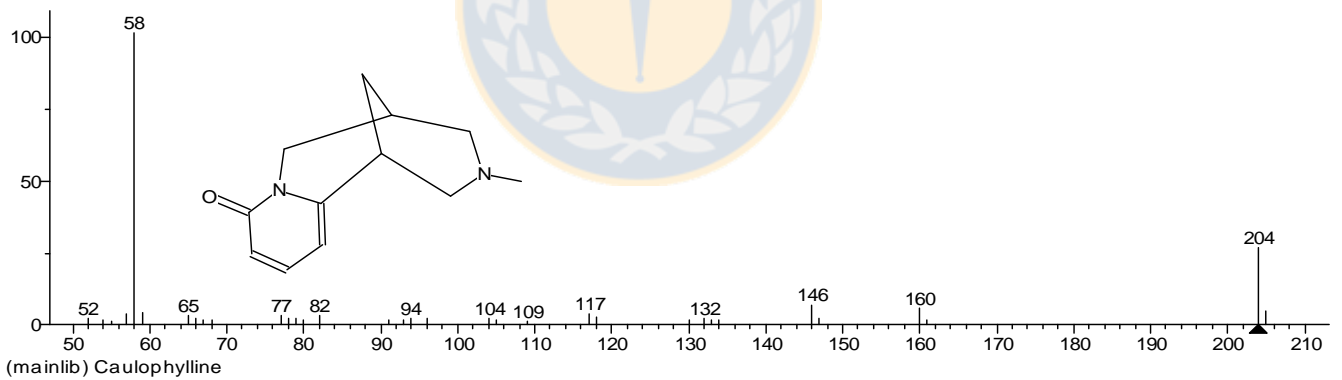


Figura 11. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Caulofilina de *Ulex europaeus* por CG-MS.

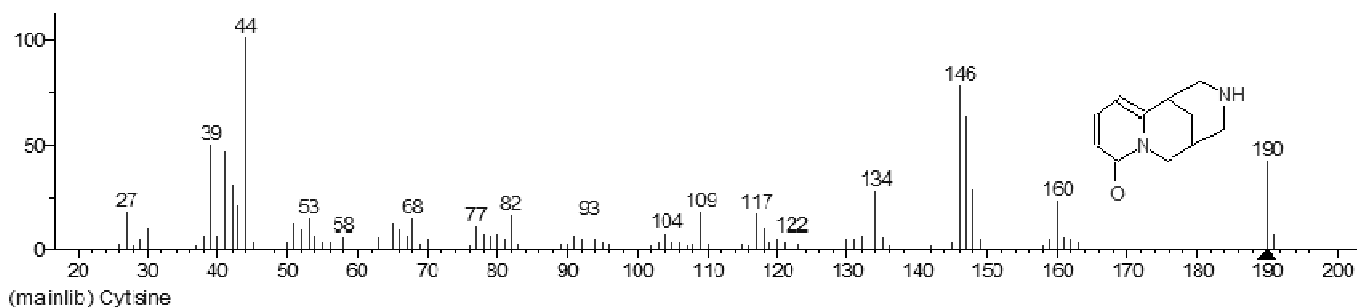


Figura 12. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Citisina de *Ulex europaeus* por CG-MS.

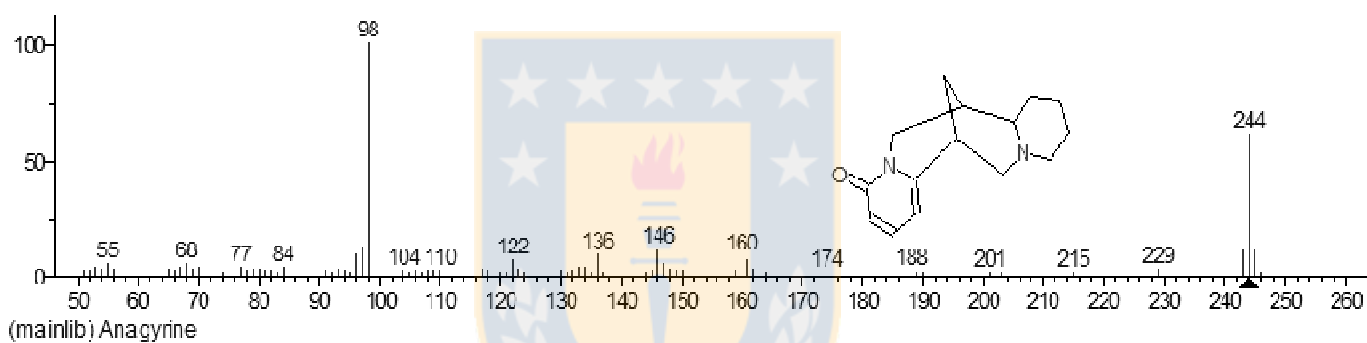


Figura 13. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Anagrina de *Ulex europaeus* por CG-MS.

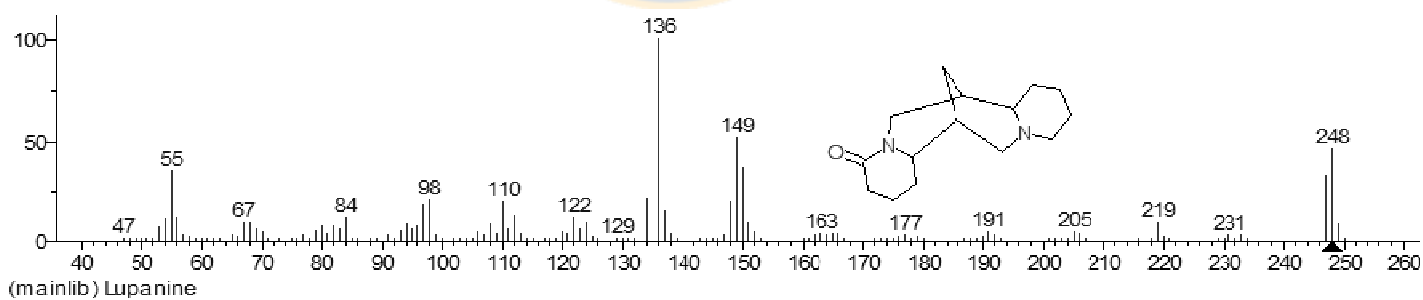


Figura 14. Espectro de fragmentación respectivo del alcaloide quinolizidínico Lupanina de *Ulex europaeus* por CG-MS.

3.3. Realización del análisis cuantitativo de los extractos alcaloideos mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Se logró determinar los perfiles cromatográficos de Caulofilina y Citisina mediante HPLC determinando las máximas longitudes de onda para cada alcaloide. Anagirina y Lupanina no pudieron ser detectados por esta técnica cromatográfica debido a su baja concentración en la muestra analizada.

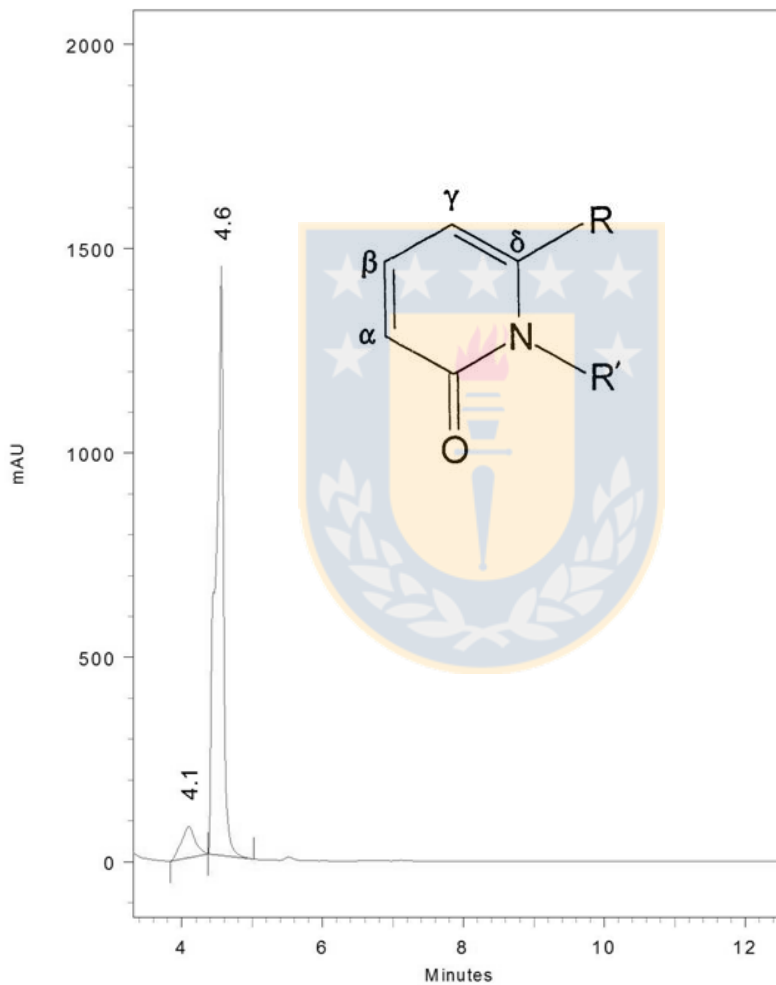


Figura 15. Cromatograma de los extractos alcaloideos de *Ulex europaeus* analizados mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC Analítico).

Tabla 7. Alcaloides analizados mediante HPLC, donde se muestra el tiempo de retención, su abundancia en la muestra y su máxima longitud de onda expresada en nanómetros.

Alcaloide	R.T. (min.)	Abundancia %	Max λ nm
Caulofilina	4.1	77.26	305
Citisina	4.6	7.19	305
Anagirina	N.D	----	----
Lupanina	N.D	----	----

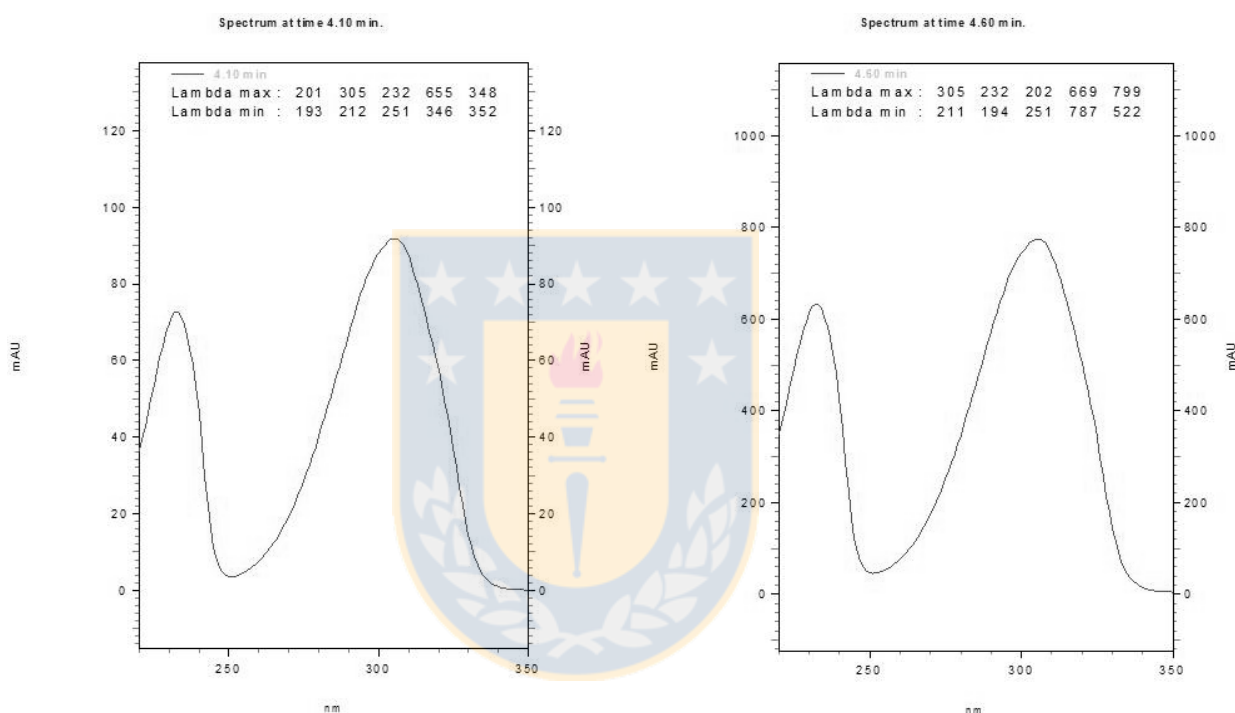


Figura 16. Espectro Ultravioleta del alcaloide Caulofilina de la muestra *Ulex europaeus* analizados mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Figura 17. Espectro Ultravioleta del alcaloide Citisina de la muestra *Ulex europaeus* analizados mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

3.4. Determinación del grado de acción insecticida del extracto alcaloideo de *Ulex europaeus* L. en larvas de *Drosophila melanogaster* (Díptera: Drosophilidae)

Tabla 8. Mortalidad de Larvas de Mosca *D. melanogaster* tratadas con extracto de semillas de *Ulex europaeus* L.

Mortalidad de Larvas de Mosca <i>D. melanogaster</i> tratadas con extracto de semillas de <i>Ulex europaeus</i> L.									
Dosis	10 µg./ml. De compuesto en la dieta			25 µg./ml. De compuesto en la dieta			50 µg./ml. De compuesto en la dieta		
	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Fracción 1	6.6 ± 1.15	73.3 ± 2.08	93.3 ± 1.15	13.3 ± 1.57	83.3 ± 1.15	96.6 ± 0.57	20.0 ± 2.0	86.6 ± 1.52	96.6 ± 0.57
Fracción 2	0 ± 0	83.3 ± 1.15	96.6 ± 0.57	26.6 ± 2.3	60.0 ± 2.0	96.6 ± 0.57	26.6 ± 2.3	96.6 ± 0.5	96.6 ± 0.57
Gedunin	22.0 ± 0.8	37 ± 0.2	69 ± 0.6	45.5 ± 0.3	59 ± 0.9	100 ± 1.0	73.5 ± 0.6	89 ± 0.4	100 ± 1.0

Valores promedio del % de mortalidad de las larvas de moscas con su desviación estándar en base a n=30

A partir de la tabla anterior, se puede observar que a los 3 días de administrado el extracto alcaloidal de semillas de *Ulex europaeus* L., de ambas fracciones, la mortalidad de larvas de la mosca *Drosophila melanogaster* aumenta considerablemente y bordea el 96.6%, independientemente de la dosis empleada.

Tabla 9. Porcentaje de pupas emergidas y porcentaje de mortalidad en moscas adultas.

Dosis	Porcentaje de pupas emergidas			Porcentaje de mortalidad en moscas adultas		
	72 hrs. de iniciado el ensayo			72 hrs. de iniciado el ensayo		
Extracto	10 µg./ml.	25 µg./ml.	50 µg./ml.	10 µg./ml.	25 µg./ml.	50 µg./ml.
Control	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Fracción 1	56.6 ± 1.52	53.3 ± 1.52	46.6 ± 1.54	90.0 ± 1.0	40.0 ± 1.0 *	50.0 ± 1.0 *
Fracción 2	46.6 ± 1.15	46.6 ± 0.5	26.6 ± 2.5	60.0 ± 3.6	56.6 ± 2.5 *	66.6 ± 5.7
Gedunin	15 ± 0.5	13 ± 0.5	0 ± 0	75.0 ± 1.0	86.0 ± 2.0	100 ± 0.0

Valores del % promedio tanto de emergencia como de mortalidad de las larvas de moscas con su desviación estándar en base a n=10 ensayo realizado por triplicado

*= el asterisco indica deformaciones en las alas

Una vez que las larvas de *Drosophila melanogaster* pasan al estadio de pupa, se puede observar que, el mayor porcentaje de individuos que logran completar este estadio fluctúa entre 26% y el 56% en ambas fracciones, mientras que el porcentaje de mortalidad de moscas adultas va desde un 40% a un 90%, encontrando en ellas deformaciones en las alas.

Tabla 10. Porcentaje promedio de larvas, pupas y moscas adultas muertas con su LD50 respectivo.

Dosis	% promedio de larvas muertas				% promedio de pupas muertas				% promedio de moscas adultas muertas			
	72 hrs. de iniciado el ensayo				72 hrs. de iniciado el ensayo				72 hrs. de iniciado el ensayo			
Extracto	10 µg./ml.	25 µg./ml.	50 µg./ml.	LD 50	10 µg./ml.	25 µg./ml.	50 µg./ml.	LD50	10 µg./ml.	25 µg./ml.	50 µg./ml.	LD50
Control	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	
Fracción 1	93	96	96	3.77	43	47	53	2.49	40	50 *	90 *	20.03
Fracción 2	96	100	100	3.55	53	53	74	9.17	40	60 *	70	14.88
Gedunin	69	100	100	8.6	85	87	100	3.82	75	86	100	5.23

Valores del % promedio tanto de emergencia como de mortalidad de las larvas de moscas con su desviación estándar

en base a n=10 ensayo realizado por triplicado

*= el asterisco indica deformaciones en las alas

Como se muestra en la tabla anterior a 72 horas de iniciado el ensayo, la LC50 del promedio de larvas muertas de la fracción 1 es de 3.77 µg./ml, mientras que la LC50 de la fracción 2 es 3.55 µg./ml En cuanto a promedio de pupas muertas a 72 horas de iniciado el ensayo, fue de 2.48 µg./ml para la fracción 1, mientras que para la fracción 2 fue de 9.17 µg./ml. Para el promedio de moscas adultas muertas a 72 horas de iniciado el ensayo la LC50 fue de 20.03 µg./ml y 14.88 µg./ml, para la fracción 1 y 2, respectivamente.

Cálculo LD50

Se realizó un análisis sigmoïdal y en base a este se calculó la LD50 con el uso del programa Origin 6.1.

Leyenda:

- Cuadrados negros corresponden a la fracción 1.
- Círculos rojos corresponden a la fracción 2.
- Triángulos verdes corresponden a Gedunin.

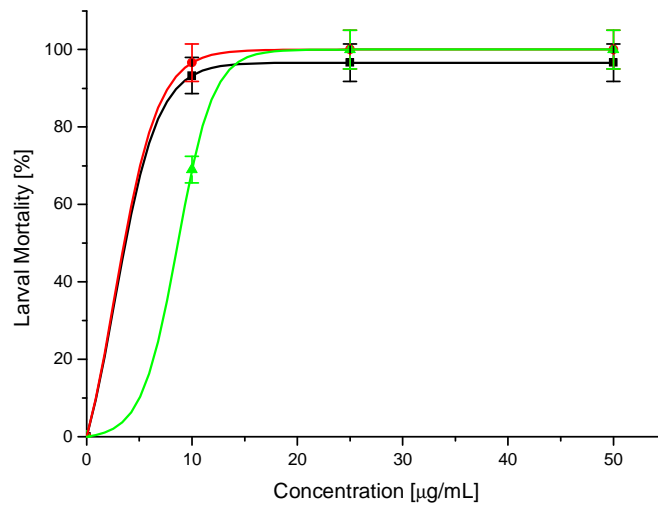


Figura 18. Gráfico que representa el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Drosophila melanogaster* en relación a la concentración del extracto de semillas de *Ulex europaeus* L.

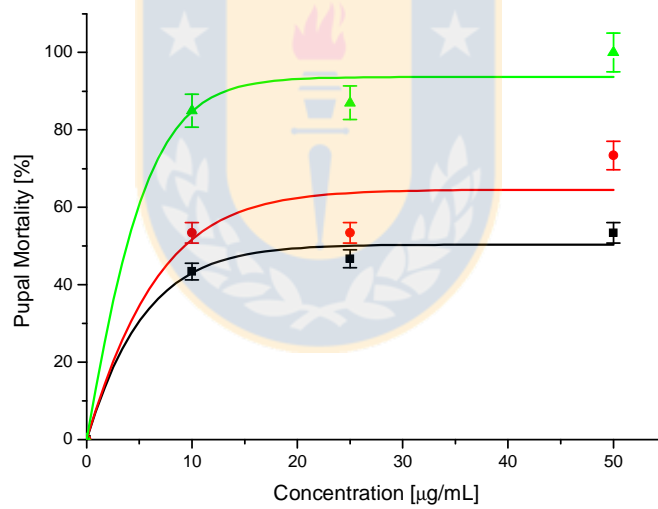


Figura 19. Gráfico que representa el porcentaje de mortalidad de las pupas de *melanogaster* en relación a la concentración del extracto de semillas de *Ulex europaeus* L.

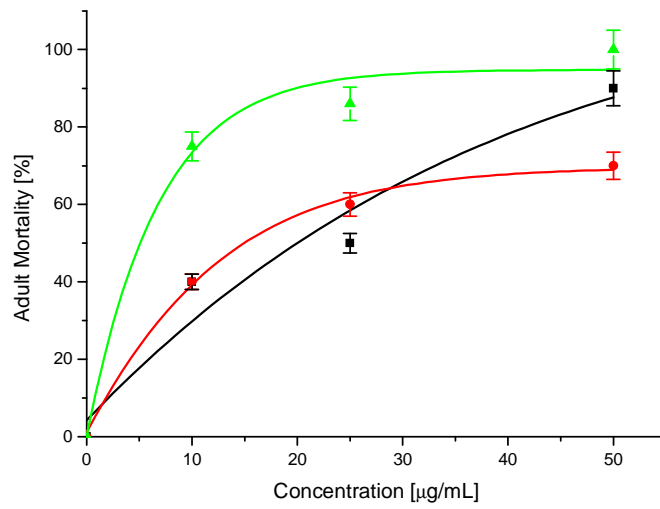


Figura 20. Gráfico que representa el porcentaje de mortalidad de adultos de *Drosophila melanogaster* en relación a la concentración del extracto de semillas de *Ulex europaeus* L.



4. DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos planteados, se logró obtener extractos alcaloideos a partir de semillas y tallos de la especie *Ulex europaeus* L. Con dichos extractos totales, se realizó un análisis cualitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía de Gas con Espectrometría de Masas (GC/MS) y se efectuó un análisis cuantitativo de los extractos alcaloideos mediante una Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), cuyos resultados arrojaron la composición alcaloidea de la planta *Ulex europaeus* L. introducida en Chile. Se recomienda obtener muestras tanto de semillas como de tallos verdes de la misma localidad y en el periodo estival, para así tener una comparación más amplia de los alcaloides a obtener y tener la posibilidad de trabajar con flores y primordios foliares. Además, se recomienda trabajar con alrededor de entre 8 a 10 kilos de muestra de tallos verdes de la planta y alrededor de 200 gramos de semillas para obtener un rendimiento adecuado y así poder realizar más de una vez las acciones descritas anteriormente.

Al haber obtenido dichos extractos alcaloideos, se procedió a evaluar la actividad insecticida. A pesar de que hubo resultados, se recomienda purificar y aislar dichos alcaloides para realizar este ensayo. Si bien es cierto, al utilizar extractos totales los alcaloides pueden potenciarse, es de suma importancia su purificación y aislamiento, debido a que se debe saber cuál de todos los alcaloides es el que realiza la actividad de insecticida. Es recomendable realizar estos ensayos insecticidas en la época de primavera, ya que es en esta fecha que los individuos tienen una mayor tasa de reproducción y así, facilita el trabajo.

De acuerdo a los análisis anteriormente descritos y realizados, cabe destacar que la especie *Ulex europaeus* L. introducida en Chile posee un menor número de alcaloides que la especie nativa de Europa, por lo que se confirma la hipótesis n° 1 planteada en esta tesis, de acuerdo a la “Hipótesis de las nuevas armas” (“*The Novel Weapons Hypothesis*”).

El éxito de algunas especies de plantas invasoras puede deberse a la posesión de nuevas armas, bioquímicos que en las especies nativas jamás han sido encontrados. Esta hipótesis plantea la posibilidad de la coevolución entre plantas en diferentes regiones de la Tierra, y esta mezcla de especies desde diferentes regiones incrementa las posibilidades de la interrupción de los procesos ecológicos que llevan a las especies a la coexistencia y a una gran diversidad de comunidades. Las nuevas armas sugieren un mecanismo alternativo para la

evolución del incremento de la habilidad competitiva en plantas invasoras. Si estas invasoras poseen armas aleloquímicas que les proveen grandes ventajas competitivas en sus nuevos hábitats que en sus originales rangos de distribución, luego la selección puede actuar directamente en aquellos rasgos.

Respecto a la hipótesis n° 2 de la presente tesis, se confirma, ya que todos los alcaloides de la especie *Ulex europaeus* L. radicada en Chile, son compartidos por la especie nativa de Europa, aunque esta última lo sobrepasa en número.

Dos fracciones de extracto total de semillas de *Ulex europaeus* L., poseen actividad insecticida por lo que también se confirma la hipótesis n° 3. Llama la atención que ambas fracciones que son extractos totales, con alcaloides no purificados ni tampoco aislados, hayan producido en moscas adultas deformaciones en las alas, haciendo que estas no pudieran volar. Es de suma importancia seguir examinando estos alcaloides quinolizidínicos y los efectos que pueden tener en insectos para así buscar en ellos alguna aplicación comercial.



5. CONCLUSIONES

1. Los alcaloides principales, presentes en semillas de *Ulex europaeus* L. introducido en Chile, son los siguientes: Anagirina, Caulofilina y Citisina.
2. Los alcaloides principales, presentes en tallos verdes de *Ulex europaeus* L. introducido en Chile, son los siguientes: Anagirina, Caulofilina, Citisina y Lupanina.
3. Según la región del país donde se tomaron las muestras, los resultados variaron. Es así como en la región del Maule, Araucanía y Los Ríos, se obtuvo a partir de los tallos verdes de *Ulex europaeus* L. sólo los alcaloides Anagirina y Lupanina.
4. En la región del Biobío, se obtuvieron los alcaloides Anagirina, Caulofilina y Citisina, al igual que las semillas a las que se le realizó el análisis y que también provienen de la región del Biobío.
5. En la región de Los Lagos sólo se obtuvo un alcaloide a partir del análisis de tallos verdes de *Ulex europaeus* L. Este es la Anagirina.
6. Se determinaron los perfiles cromatográficos de los alcaloides Caulofilina y Citisina, determinando las máximas longitudes de onda para cada alcaloide. Los alcaloides Anagirina y Lupanina no pudieron ser detectados debido a su baja concentración de la muestra analizada.
7. El extracto de semillas obtenido de *Ulex europaeus* L. tuvo acción insecticida en larvas, pupas e individuos adultos de *Drosophila melanogaster*. Se observó que a los 3 días de administrado el extracto alcaloidal de semillas de *Ulex europaeus* L., de 2 fracciones alcaloidales, la mortalidad de larvas de la mosca *Drosophila melanogaster* aumenta considerablemente y bordea el 96.6%, independientemente de la dosis empleada. Una vez que las larvas de *Drosophila melanogaster* pasan al estadio de pupa, se pudo observar que, el mayor porcentaje de individuos que logran completar este estadio fluctúa entre 26% y el 56% en ambas fracciones, mientras que el porcentaje de mortalidad de moscas adultas va desde un 40% a un 90%, encontrando en ellas deformaciones en las alas. Al cabo de 72 horas de iniciado el ensayo, la LC50 del promedio de larvas muertas de la fracción 1 es de 3.77 µg./ml, mientras que la LC50 de la fracción 2 es 3.55 µg./ml En cuanto a promedio de pupas muertas a 72 horas de iniciado el ensayo, fue de 2.48 µg./ml para la fracción 1, mientras que para la fracción 2 fue de 9.17 µg./ml. Para el promedio de moscas adultas

muertas a 72 horas de iniciado el ensayo la LC50 fue de 20.03 $\mu\text{g./ml}$ y 14.88 $\mu\text{g./ml}$, para la fracción 1 y 2, respectivamente.

8. De acuerdo a estos resultados, la hipótesis n° 1 se confirma debido a que la planta naturalizada en Chile posee alrededor de 4 alcaloides, aunque el número de cada población varía según la región del país donde se encuentre, en contraposición de la especie nativa de Europa que posee 10 alcaloides. Esto hace pensar, que la planta guarda energías para producir biomasa en vez de producir defensas bioquímicas, debido a que no posee controladores biológicos naturales en Chile.
9. Los alcaloides de la planta radicada en Chile comparten los 4 alcaloides que poseen con la especie nativa de Europa, por lo que la hipótesis n° 2 se confirma.
10. Dos fracciones obtenidas del extracto total de la especie radicada en Chile, tiene un efecto insecticida por lo que la hipótesis n° 3 se confirma.



6. REFERENCIAS

Alarcon, J., Molina, S., Villalobos, N., Lillo, L., Lamilla, C., Cespedes, C.L., Seigler, D.S., 2011. Insecticidal activity of Chilean Rhamnaceae: *Talguenea quinquenervis* (Gill et Hook). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10, 383–388.

Arno, Stephen F. 2000. Fire in western forest ecosystems. In: Brown, James K.; Smith, Jane Kapler, eds. *Wildland fire in ecosystems: Effects of fire on flora*. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-42-vol. 2. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station: 97-120.

Bais, H.P.; Walker, T.S.; Stermitz, F.R *et al.* 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiol* 128: 1173–79.

Baker, H. G. 1986. Patterns of plant invasion in North America. In: Mooney, Harold A.; Drake, James A., eds. *Ecology of biological invasions of North America and Hawaii*. Ecological Studies 58. New York: Springer-Verlag: 44-57.

Balneaves, John; Perry, Chas. 1982. Long-term control of gorse/bracken mixtures for forest establishment in Nelson. *New Zealand Journal of Forestry*. 27(2): 219-225.

Birdling, J. 1952. A farmer's experience in gorse control. *Proceedings, New Zealand Weed and Pest Control Conference*. 5: 43-48.

Blossey, B and Nötzold R. 1995. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *J Ecology* 83: 887–89.

Brooks, Matthew L.; D'Antonio, Carla M.; Richardson, David M.; Grace, James B.; Keeley, Jon E.; DiTomaso, Joseph M.; Hobbs, Richard J.; Pellant, Mike; Pyke, David. 2004. Effects of invasive alien plants on fire regimes. *Bioscience*. 54(7): 677-688.

Bruneton, J. 1996. *Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. Lavoisier Tec Doc. Paris.

Burrill, Larry C.; Cannon, Lynn E.; Duddles, Ralph E.; Poole, Arthur P. 1992. Effect of adjuvants on herbicide activity on gorse. In: Lym, Rodney G., ed. *Proceedings, Western Society of Weed Science; 1992 March 10-12; Salt Lake City, UT*. Volume 45. Western Society of Weed Science: 60-65.

Bussan, Alvin J.; Dyer, William E. 1999. Herbicides and rangeland. In: Sheley, Roger L.; Petroff, Janet K., eds. *Biology and management of noxious rangeland weeds*. Corvallis, OR: Oregon State University Press: 116-132.

- California Invasive Plant Council.** 1999. The CalEPPC list: Exotic pest plants of greatest ecological concern in California, [Online]. California Exotic Pest Plant Council (Producer). Available: http://groups.ucanr.org/ceppc/1999_Cal-IPC_list [2004, December 3]. [50172]
10. Carey, Andrew B. 2002. Globalization of flora: inviting worldwide ecosystem disaster. *Renewable Resources Journal*. 20(1): 13-17.
- Callaway**, Ragan M.; Ridenour, Wendy M.; 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Front Ecol Environ* 2004; 2(8): 436–443.
- Chavasse**, C. G. R. 1976. Alternatives to herbicides - the limitations of burning. In: The use of herbicides in forestry in New Zealand. F.R.I. Symposium No. 18. Rotorua, New Zealand: New Zealand Forest Service: 305-307.
- Clements**, David R.; Peterson, David J.; Prasad, Raj. 2001. The biology of Canadian weeds. 112. *Ulex europaeus* L. *Canadian Journal of Plant Science*. 81(2): 325-337.
- Clemo**, G.; Raper, R. 1935. *Journal of the Chemical Society*, 10. In Harbone, J.B.; Boulter, D.; Turner, B.L. 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Chapter III “Alkaloids in the Leguminosae”. Academic Press, London. U.K. pp. 73 – 176.
- Clos**, D. 1847. En Gay, *Flora Chilena* 2. Leguminosas, pp. 46 – 256.
- Cochrane**, G. Ross; Burnard, Sally; Philpott, Jennifer M. 1962. Land use and forest fires in the Mount Lofty Ranges, South Australia. *Australian Geographer*. 8(4): 143-160.
- Coombs**, E. M.; Markin, G. P. 2004. *Exapion ulicis*. In: Coombs, Eric M.; Clark, Janet K.; Piper, Gary L.; Cofrancesco, Alfred F., Jr., eds. *Biological control of invasive plants in the United States*. Corvallis, OR: Oregon State University Press: 179-181.
- Coombs**, E. M.; Markin, G. P.; Pratt, P. D.; Rice, B. 2004. *Gorse*. In: Coombs, Eric M.; Clark, Janet K.; Piper, Gary L.; Cofrancesco, Alfred F., Jr., eds. *Biological control of invasive plants in the United States*. Corvallis, OR: Oregon State University Press: 178-179.
- Coombs**, E. M.; Pratt, P. D.; Markin, G. P.; Rice, B. 2004. *Tetranychus lintearius*. In: Coombs, Eric M.; Clark, Janet K.; Piper, Gary L.; Cofrancesco, Alfred F., Jr., eds. *Biological control of invasive plants in the United States*. Corvallis, OR: Oregon State University Press: 181-183.
- Cranmer**, M. F.; Turner, B. L. 1967. Systematic significance of lupine alkaloids with particular reference to *Baptisia* (Leguminosae). *Evolution* 21: 508-517.
- D'Antonio**, Carla M.; Haubensak, Karen. 1998. Community and ecosystem impacts of introduced species. *Fremontia*. 26(4): 13-18.
- DiTomaso**, Joseph M. 1998. The biology and ecology of brooms and gorse. *Proceedings, California Weed Science Society*. 50: 142-148.

Egunjobi, J. K. 1969. Dry matter and nitrogen accumulation in secondary successions involving gorse (*Ulex europaeus* L.) and associated shrubs and trees. *New Zealand Journal of Science*. 12(2): 175-193.

Egunjobi, J. K. 1971. Ecosystem processes in a stand of *Ulex europaeus* L. I. Dry matter production, litter fall and efficiency of solar energy utilization. *Journal of Ecology*. 59(1): 31-38.

Ehrlich, P. R.; Raven, P.H. 1964. Evolution, 18, 586. In Waller, George R.; Nowacki, Edmund K. 1978. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Plenum Press, London.

Ehrlich, P. R.; Raven, P.H. 1967. *Sci. Am.* 216, n° 6 (June), 104. In Waller, George R.; Nowacki, Edmund K. 1978. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Plenum Press, London.

Fairbairn, J. W.; Hakim, F.; Dickenson, P. B. 1973. *J. Pharm. Pharmac.* 25, 113. In Waller, George R.; Nowacki, Edmund K. 1978. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Plenum Press, London.

Faugueras, G; Paris, R. 1965. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 77. In Harbone, J.B.; Boulter, D.; Turner, B.L. 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Chapter III "Alkaloids in the Leguminosae". Academic Press, London. U.K. pp. 73 – 176.

Gaynor, D.L., MacCarter, L.E. 1981. Biology, ecology, and control of gorse (*Ulex europaeus* L.) *New Zealand J. Agricultural Res.* 24: 123-137.

Gerrard, A. 1886. *Pharm. J.* 17 (3), 101. In Harbone, J.B.; Boulter, D.; Turner, B.L. 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Chapter III "Alkaloids in the Leguminosae". Academic Press, London. U.K. pp. 73 – 176.

Glasby, J.1975. *Encyclopedia of the Alkaloids*. Volumen I (A-H). ICI (Organics Division) Ltd. Plenum Press. Ayrshire, Scotland.

Gleason, Henry A.; Cronquist, Arthur. 1991. *Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada*. 2nd ed. New York: New York Botanical Garden. 910 p.

Harbone, J.B.; Boulter, D.; Turner, B.L. 1971. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Chapter III "Alkaloids in the Leguminosae". Academic Press, London. U.K. pp. 73 – 176.

Hartley, M.J. 1982. Control of young gorse plants by grazing. *In Proc. 35th N.Z. Weed and Pest Control Conf.* M.J. Hartley (editor). Palmerston North, N.Z., pp. 135–137.

Hartley, M.J., A.I. Popay. 1982. Gorse control by stump treatment. *In Proc. 35th N.Z. Weed and Pest Control Conf.* M.J. Hartley (editor). Palmerston North, N.Z., pp. 149–151.

Hartley, M.J, A.I. Popay. 1982. Control of gorse seedlings by low rates of herbicides. *In Proc. 35th N.Z. Weed and Pest Control Conf.* M.J. Hartley (editor). Palmerston North, N.Z., pp. 138-140.

Hegi, G. 1906. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. IV Band. J.F. Lehmanns Verlag. München, Germany, pp. 1190-1192.

Hegnauer, R. 1962. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Band 1. Thallophyten, Bryophyten, Pteridophyten und Gymnospermen. Basel and Stuttgart. 517 pp.

Hely, Christelle; Forgeard, Françoise. 1998. Heterogeneity of a highland *Ulex europaeus* heath in relation to fire propagation (Bretagne, France). *Canadian Journal of Botany*. 76(5): 804-817.

Hermann, Richard K.; Newton, Michael. 1968. Tree planting for control of gorse on the Oregon Coast. Research Paper 9. Corvallis, OR: Oregon State University, School of Forestry, Forest Research Laboratory. 12 p.

Hermis, DA and Mattson WJ. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67: 283-335.

Hesse, M. 1978. *Alkaloid Chemistry*. Georg Thieme Verlag. New York.

Hilgendorf, F.W., J.W. Calder. 1967. *Weeds of New Zealand and how to eradicate them*. Witcombe and Tombs Ltd., Christchurch, N.Z.

Hill, R.L., Gourlay, AH., Fowler SV. 2000. The biological control programme against gorse in New Zealand. In: Spencer, Neal R, ed . *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4-14 July 1999, Bozeman, Montana, USA: Montana State University, 909-917.

Hill, R. L.; Gourlay, A. H.; Barker, R. J. 2001. Survival of *Ulex europaeus* seeds in the soil at three sites in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 39(2): 235-244.

Hill, R.L., Gourlay, AH., Martin L. 1991. Seasonal and geographic variation in the predation of gorse seed, *Ulex europaeus* L., by the gorse seed weevil *Apion ulicis* Forst. in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 18:37-43

Hill, R. L.; Gourlay, A. H.; Lee, W. G.; Wilson, J. B. 1996. Dispersal of seeds under isolated gorse plants and the impact of seed-feeding insects. In: *Proceedings, 49th New Zealand plant protection conference; 1996 August 13-15; Nelson, New Zealand*. 114-118.

Hill R.L., Sandrey, RA. 1986. The costs and benefits of gorse. *Proceedings of the 39th New Zealand Plant Protection Conference*: 70-73.

Holthöfer, H.; Virtanen, I.; Kariniemi, A. L.; Hormia, M.; Linder, E.; Miettinen, A. 1982. *Ulex europaeus* I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology. 47(1):60-66.

Hoshovsky, M. 1989. Element Stewardship Abstract For *Ulex europaeus*. ©THE NATURE CONSERVANCY. California Field Office, 785 Market Street, San Francisco, CA. 25 pp.

Hoshovsky, Marc C. 2000. *Ulex europaeus* L. In: Bossard, Carla C.; Randall, John M.; Hoshovsky, Marc C., eds. Invasive plants of California's wildlands. Berkeley, CA: University of California Press: 317-321.

IGSS. 2004. The Invasive Species Specialist Group. Global Invasive Species Database: *Ulex europaeus* L. <http://www.issg.org/database/welcome/>

INIA. 2007. Estrategia para el control del espinillo. Informativo n° 58. Gobierno de Chile. Centro Regional de Investigación Remehue. www.inia.cl.

ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2005. Online Database *Ulex europaeus* L.

Ivens, G.W., Mlowe, F. 1980. A study of competition between seedlings of gorse (*Ulex europaeus* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) by means of a replacement series experiment. Weed Research, 20:183-191.

Ivens, G. W. 1978. Some aspects of seed ecology of gorse. Proceedings, 31st New Zealand Weed and Pest Control Conference. 53-57.

Ivens, G. W. 1982. Seasonal germination and establishment of gorse. In: Hartley, M. J., ed. Proceedings of the 35th New Zealand weed and pest control conference. Palmerston North, New Zealand: New Zealand Weed and Pest Control Society: 152-156.

Ivens, G. W. 1983. The influence of temperature on germination of gorse (*Ulex europaeus* L.). Weed Research. 23(4): 207-216.

King, Shawn; Drlik, Tanya; Simon, Laurie; Quarles, William. 1996. Integrated weed management of gorse. The IPM Practitioner. 18(10): 1-9.

Krause, M.A., A.C. Beck, J.B. Dent. 1988. Control of gorse in hill country: an economic assessment of chemical and biological methods. Agriculture Systems 26:35-49.

Lee, W.G., Allen R.B., Johnson P.N. 1986. Succession and dynamics of gorse (*Ulex europaeus* L.) communities in the Dunedin Ecological District South Island New Zealand. New Zealand Journal of Botany, 24:279-292.

Linné, C. 1751. Philosophia Botanica. Stockholm, Sweden. In Waller, George R.; Nowacki, Edmund K. 1978. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Press, London.

- Lopez, T.;** Cid, M.; Bianchini, M. 1999. Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) Alkaloids and their acute and chronic toxicity in livestock. A review. *Toxicon* 37, 841-865.
- Mack, Richard N.** 2003. Plant naturalizations and invasions in the eastern United States: 1634-1860. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 90(1): 77-90.
- Mack, Richard N.;** Simberloff D.; Lonsdale WM, *et al.* 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecol Appl* 10: 689–710.
- MacCarter L.E.,** Gaynor DL. 1981. Gorse: a subject for biological control in New Zealand. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 8:321-330.
- McClintock, Elizabeth.** 1979. The weedy brooms--where did they come from? *Fremontia*. 6(4): 15-17.
- McLean, J.;** Thomson, J.B. 1963. Some Constituents of *Ulex europaeus* L. *Phytochemistry*. Pergamon Press Ltd. England. U.K. Volume 2:179-181.
- Manske, R.H.F.** 1960. The Alkaloids. Chemistry and Physiology. Volume VII. Dominion Rubber Research Lab. Guelph, Ontario, Canadá. pp. 254 – 311.
- Marcano, D.;** Hasegawa, M. 1991. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.
- Matthei, J.O.** 1995. Manual de las malezas que crecen en Chile. Alfabeta Impresores. Santiago de Chile, pp. 258-261.
- Máximo, P.;** Lourenço, A.; Tei, A.; Wink, M. 2006. Chemotaxonomy of Portuguese *Ulex*: Quinolizidine alkaloids as taxonomical markers. *Phytochemistry* 67, pp. 1943-1949.
- Müller-Schärer H,** Schaffner U, and Steinger T. 2004. Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends Ecol Evol* 19: 417–22.
- Norambuena, H.;** Escobar, S.; Rodríguez, F. 2000. The Biocontrol of Gorse, *Ulex europaeus*, in Chile: A Progress Report. Proceedings of the X Internacional Symposium on Biological Control of Weeds. Montana State University, Bozeman, Montana, USA, Neal R. Spencer [ed.], pp. 955-961.
- Norambuena, H.,** Martínez, G., Carrillo, R., Neira, M. 2007. Host specificity and establishment of *Tetranychus lintearius* (Acari:Tetranychidae) for biological control of gorse, *Ulex europaeus* (Fabaceae) in Chile. *Biological Control* 40:204-212.
- Norambuena, H. y** Piper, G. 2000. Impact of *Apion ulicis* Forster on *Ulex europaeus* L. Seed Dispersal. *Biological Control* 17:267-271.

- Nunez-Regueira**, Lisardo; Rodrigues Anon, J. A.; Proupin Castinersa, J. 1996. Calorific values and flammability of forest species in Galicia. Coastal and hillside zones. *Bioresources and Technology*. Oxford, U.K.: Elsevier Science Limited. 57(3): 283-289.
- Pabreza**, L.; Dhawan, S.; Kellar, J. 1990. [3H]cytisine binding to nicotinic cholinergic receptors in brain. *Mol Pharmacol* January 1990 39, 9-12.
- Pande**, R. S.; Kemp, P. D.; Hodgson, J. 2002. Preference of goats and sheep for browse species under field conditions. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 45(2): 97-102.
- Pemberton**, Robert W.; Irving, Delilah W. 1990. Elaiosomes on weed seeds and the potential for myrmecochory in naturalized plants. *Weed Science*. 38(6): 615-619.
- Peña**, R.C. & Cassels, B.K. 1996. Phylogenetic relationships among Chilean *Sophora* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 725-733.
- Prasad**, Raj. 2003. Management and control of gorse and Scotch broom in British Columbia. Technology Transfer Note Number 30. Victoria, BC: Canadian Forest Service, Natural Resources Canada, Pacific Forestry Centre, Forestry Research Applications. 6 p.
- Puentes**, Aurora; Basanta, Margarita. 2002. Architecture of *Ulex europaeus*: changes in the verticle distribution of organs in relation to plant height and season. *Journal of Vegetation Science*. 13(6): 793-802.
- Pauchard**, Aníbal; Quiroz, Constanza L.; Marticorena, Alicia; Cavieres, Lohengrin A. 2009. Manual de Plantas Invasoras del Centro-Sur de Chile. Laboratorio de Invasiones Biológicas (LIB). Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile.
- Rabotnov** T.A. 1982. Importance of the evolutionary approach to the study of allelopathy. *Ékologia* No 3: May–June: 5–8.
- Radcliffe**, J. E. 1990. Gorse control by goats: effective strategies in Canterbury. In: Bassett, C.; Whitehouse, L. J.; Zabkiewicz, eds. *Alternatives to the chemical control of weeds: Proceedings of an international conference; 1989 July; Rotorua, New Zealand*. FRI Bulletin 155. Rotorua, New Zealand: Forest Research Institute: 144-149.
- Rees**, M.; Hill, R. L. 2001. Large-scale disturbances, biological control and the dynamics of gorse populations. *Journal of Applied Ecology*. 38(2): 364-377.
- Reiche**, C. 1897. Estudios críticos sobre la Flora de Chile. *Anales Universidad de Chile* 98: 117-497.
- Richardson**, R. G.; Hill, R. L. 1998. The biology of Australian weeds. 34. *Ulex europaeus* L. *Plant Protection Quarterly*. 13(2): 46-58.

- Robinson**, T. 1968. *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. "The Biochemistry of Alkaloids" Volume III. Springer – Verlag. New York, U.S.A. pp. 48-53.
- Rolston**, M. P.; Talbot, J. 1980. Soil temperatures and regrowth of gorse burnt after treatment with herbicides. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. 8(1): 55-61.
- Rolston**, M.P., B.P. Devantier. 1983. Alternative herbicides to 2,4,5-T for gorse control. *N.Z. J. of Exp. Agric.* 11:91–94.
- Saxton**, J.E. 1975. "The Alkaloids" Volumen V. *Specialist Periodical Reports*, The Chemical Society. Burlington House, London. pp. 93-102.
- Sepúlveda**, G.; Porta, H.; Rocha, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21, 355-363.
- Sheley**, Roger; Manoukian, Mark; Marks, Gerald. 1999. Preventing noxious weed invasion. In: Sheley, Roger L.; Petroff, Janet K., eds. *Biology and management of noxious rangeland weeds*. Corvallis, OR: Oregon State University Press: 69-72.
- Takhtajan**, A.L. 1997. *Diversity and classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press. New York, USA.
- Thompson** J.N. 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *Am Nat* 153: 1–14.
- Tu**, Mandy; Hurd, Callie; Randall, John M., eds. 2001. *Weed control methods handbook: tools and techniques for use in natural areas*. Davis, CA: The Nature Conservancy. 194 p.
- U.S. Department of Agriculture**, Natural Resources Conservation Service. 2006. PLANTS database (2006), [Online]. Available: <http://plants.usda.gov/>.
- University of Montana**, Division of Biological Sciences. 2001. INVADERS Database System, [Online]. Available: <http://invader.dbs.umt.edu/> [2001, June 27].
- Waller**, George R.; Nowacki, Edmund K. 1978. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Plenum Press, London.
- Wink**, M. 1994. Quinolizidine alkaloids. In: Waterman, P.G. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 8. Academic Press, London, pp. 197-239.
- Zabkiewicz**, J. A. 1976. The ecology of gorse and its relevance to New Zealand forestry. In: *The use of herbicides in forestry in New Zealand: F.R.I. Symposium No. 18: Proceedings; 1975 October 20-23; Rotorua, New Zealand*. Rotorua, New Zealand: New Zealand Forest Service, Forest Research: 63-68.

Zabkiewicz, J. A.; Gaskin, R. E. 1978. Effect of fire on gorse seeds. Proceedings, 31st New Zealand Weed and Pest Control Conference. [Unknown]: 47-52.

