



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Variación geográfica de caracteres
defensivos en *Datura stramonium*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología ambiental)

P R E S E N T A

GUILLERMO RAÚL CASTILLO SÁNCHEZ

DIRECTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN NÚÑEZ-FARFÁN

MÉXICO, D.F.

MAYO DE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

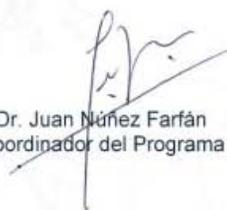
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **CASTILLO SANCHEZ GUILLERMO RAUL** con número de cuenta **97201201** con la tesis titulada **"VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE CARACTERES DEFENSIVOS EN *Datura stramonium*."**, realizada bajo la dirección del: **DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN.**

Presidente: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI
Vocal: DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
Secretario: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
Suplente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Suplente: DR. CESAR MATEO FLORES ORTIZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de mayo de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para estudios de Maestría de Febrero 2008 a Enero de 2010.

Al apoyo económico brindado por parte del parte del Proyecto CONACYT 81490 "Evolución de la defensa en plantas contra sus enemigos naturales".

A la beca del programa de fomento a la titulación otorgada por la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la UNAM.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Ken Oyama Nakagawa y al Dr. César Mateo Flores Ortiz.

Agradecimientos extendidos

A la UNAM, por formarme humana y académicamente.

Al Dr. Juan Núñez Farfán, no sólo por dirigir esta tesis sino por apoyarme dentro y fuera del laboratorio.

Al laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, UNAM en donde se realizó esta tesis y especialmente a la M. en I. B. B. Rosalinda Tapia López por el apoyo logístico y su colaboración en el trabajo de laboratorio.

Al jurado revisor: Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Juan Fornoni Agnelli, Dr. Pedro Luis Valverde Padilla, Dr. Ken Oyama Nakagawa y Dr. César Mateo Flores Ortiz, por sus valiosos comentarios.

Al laboratorio de Alelopatía, del Instituto de Ecología, UNAM por la asesoría en la preparación de extractos y uso de su infraestructura. Particularmente a la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava y a la Q. A. Blanca Estela Hernández Bautista

Al laboratorio de Biogeoquímica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, donde se realizó la cuantificación de alcaloides. En especial al Dr. César Mateo Flores Ortiz, al Biól. Luis Barbo Hernández Portilla y a la M. en C. Martha Arcelia Urzúa Meza.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán por su ayuda en la identificación de tricomas mediante MEB.

Al M. en C. Johnattan Hernández Cumplido y a la M. en C. Laura Lorena Cruz Rodríguez por todo su tiempo y dedicación a este proyecto. Este trabajo es también suyo.

A mi madre, la persona más valiente que conozco.

Con dedicatoria a

Al Dr. Juan Núñez Farfán en quien he encontrado un gran apoyo y de quien he aprendido muchísimo.

A los compañeros del laboratorio: Mariana, Pilar, Jorge, Vania, Iván, Rosalinda, Alfredo, Rafa, Lau Lo, Mariana, Pilar, Edson, Armando y Lilibeth. Gracias por hacer del Instituto un lugar especial.

A Daniel, Fernanda, Eugenio, Johnattan, Ana, Miriam y Armando quienes me ayudaron a coleccionar el material que se quemó en Navidad.

A las jirafonas del mal. Las quiero mucho.

A Johnatton, gracias por todo.

A mis homies: Mariana, Ileana, Berenice, Pili, Alejandro, Eugenio, Raúl, Xóchitl, Fernanda, Elis, Daniel, Eugenio, Robert, Luis, Arturo, Alejandra, Johnatton, Abraham, Bianca, Romi, Chak, Lola, Sil, Diana, Ángela, Silvia, Lilo, Poncho, Carlitos, Diego, Mague, Germán, Sam, Rossella, José, Gil, Amane, Huitzi, Chacho, Miguel, Andrea, y Stella. ¡Manténgalo real!

¡A todos los que seguro se me olvidan!

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción..... | 3 |
| Antecedentes..... | 6 |
| Los tricomas como carácter defensivo..... | 6 |
| Tricomas foliares como carácter de defensa en <i>Datura stramonium</i> | 7 |
| Alcaloides como atributo de defensa..... | 8 |
| Alcaloides defensivos en <i>Datura stramonium</i> | 10 |
| Evidencia de la variación geográfica en tricomas y compuestos químicos..... | 11 |
| Objetivos..... | 14 |
| Hipótesis..... | 15 |
| Sistema de estudio..... | 16 |
| Método..... | 20 |
| Colecta de Campo..... | 20 |
| Técnicas de análisis de alcaloides..... | 22 |
| Trabajo de laboratorio..... | 22 |
| Daño foliar..... | 22 |
| Densidad de tricomas..... | 23 |
| Cuantificación de alcaloides..... | 24 |
| Variables ambientales..... | 26 |
| Análisis de datos..... | 26 |
| Resultados..... | 29 |
| Variación poblacional en el daño foliar y en caracteres defensivos..... | 29 |
| Variación intrapoblacional en caracteres defensivos..... | 33 |
| Correlaciones fenotípicas entre caracteres defensivos..... | 35 |
| Patrón geográfico en la defensa..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| Discusión..... | 39 |
| Variación poblacional en el daño foliar y en caracteres defensivos..... | 39 |
| Variación intrapoblacional en caracteres defensivos..... | 40 |
| Correlación fenotípica entre caracteres defensivos..... | 41 |
| Patrón geográfico en la defensa..... | 42 |
| Conclusión..... | 47 |
| Referencias..... | 48 |
| Anexo 1..... | 59 |

Resumen

Las plantas han evolucionado diferentes caracteres defensivos que les permiten evitar el daño impuesto por sus herbívoros. En un contexto geográfico se puede esperar que el resultado de la interacción planta herbívoro varíe geográficamente debido a las diferentes características bióticas y abióticas de cada población. En este sentido, la teoría del mosaico geográfico de coevolución propone que los caracteres que median una interacción variarán geográficamente debido a la existencia de un mosaico de selección. Los tricomas foliares y los alcaloides tropánicos han sido considerados tradicionalmente caracteres defensivos en contra del ataque de los herbívoros en la planta ruderal *Datura stramonium*. En base a estudios previos este trabajo analiza la variación geográfica del daño foliar provocado por herbívoros así como en la densidad de tricomas foliares y concentración de alcaloides tropánicos en 28 poblaciones de *D. stramonium* del centro de México. Si los alcaloides tropánicos y los tricomas foliares son componentes de la resistencia a los herbívoros, entonces existirá una relación poblacional entre dichos componentes y la cantidad de daño foliar impuesto por los herbívoros. Adicionalmente, si el ambiente físico (temperatura o precipitación) condiciona la expresión de los atributos defensivos se esperaría que la variación geográfica en el daño foliar se explique en parte por la interacción entre el ambiente y la expresión de la defensa. Los resultados indican que existe un patrón geográfico que relaciona el daño foliar con los tricomas foliares y con la concentración de atropina. En poblaciones con mayor daño foliar existe mayor inversión en defensa (tricomas y atropina) y en poblaciones más productivas la interacción planta herbívoro se maximiza. Además, la variación en el daño también se explica mediante la interacción de caracteres defensivos y la disponibilidad de agua en cada población. En este estudio se encontró que en *D. stramonium* un solo carácter defensivo no explica por sí solo el daño foliar en una población, sino que los caracteres defensivos están actuando en conjunto y con el ambiente abiótico sobre el daño que se presenta en una población. Estos resultados son relevantes ya que representan evidencia de que a gran escala la interacción planta herbívoro tiene un papel relevante en el moldeado de la variación geográfica del daño impuesto por herbívoros en *D. stramonium*.

Abstract

Plants have evolved different defensive traits that allow them to avoid foliar damage imposed by herbivores. In a geographic context it is expected that the outcome of the plant herbivore interaction varies due to the different biotic and abiotic conditions inherent to each population. In this sense, the geographic mosaic theory of coevolution (GMTC) proposes that traits that mediate an interaction will geographically vary because of the existence of a selection mosaic. Leaf trichomes and tropanic alkaloids have been considered defensive traits against herbivores in the ruderal weed *Datura stramonium*. Based on previous work this research studies the geographic variation of foliar damage, trichome density and tropanic alkaloids concentration in 28 natural populations of *D. stramonium*. If tropanic alkaloids and trichomes are a resistance component against herbivores, there will be a population relationship between these traits and foliar damage. Additionally, if physic factors (temperature or precipitation) constrain the defensive traits expression it should be expected that geographic variation in foliar damage could be partially explained by the interaction between defensive traits and physic factors. We found a geographic pattern which relates foliar damage with trichome density and atropine concentration. In populations with greater leaf damage there is more investment in defense (trichomes and atropine) and in most productive populations the plant herbivore interaction is maximized. Furthermore, the variation in damage was also explained by the interaction between defensive traits and the water availability in each population. Our results indicate that in *D. stramonium* a single trait does not explain the leave damage of a population, but defensive traits are acting jointly and with abiotic factors on the damage present in a population. These findings are relevant because they represent evidence of plant herbivore interaction acting at a large scale which plays an important role in shaping the geographical variation of leaf damage imposed by herbivores on *D. stramonium*.

Introducción

La evolución de los caracteres defensivos de las plantas en contra de sus enemigos naturales es un tema de interés creciente en la ecología evolutiva (Mauricio *et al.* 1997, Fornoni *et al.* 2004a, Leimu y Koricheva, 2006). La teoría coevolutiva entre plantas y herbívoros propuesta por Ehrlich y Raven (1964) propone la evolución de adaptaciones defensivas (p. ej, metabolitos secundarios) por parte de las plantas para limitar el acceso a sus enemigos, y de contra-defensas (p. ej, oxidasas de función múltiple) por parte de los herbívoros para vencer esas barreras. Este tipo de evolución conjunta y secuencial se ha denominado “carrera armamentista” (Janzen, 1980). Para que ésta ocurra, es necesario que las especies interactuantes afecten recíprocamente su adecuación a través de adaptaciones que medien su interacción. De este modo, el desarrollo de rasgos de defensa posibilita el escape de las plantas de sus enemigos al evitar que sean consumidas (Ehrlich y Raven, 1964). Así, esta predicción supone que la defensa de las plantas afecta negativamente el desempeño de los herbívoros.

En general, las plantas poseen una amplia gama de caracteres defensivos para evitar a sus herbívoros. Estos pueden ser de tipo morfológico o químico. Los caracteres de tipo morfológico evitan el daño por herbívoros de manera física mediante espinas, ceras, dureza del tejido, resinas o tricomas. Por otro lado, los caracteres de defensa química son compuestos químicos tales como terpenos, glucósidos, taninos, flavonoides, proteínas o alcaloides. La presencia de estos caracteres evita el daño provocado por herbívoros al impactar negativamente la preferencia y desempeño de los insectos (antibiosis),

manteniendo o incrementando la adecuación de las plantas en un entorno hostil (Schaller, 2008).

Las defensas químicas y físicas de las plantas no siempre son constitutivas (siempre presentes) sino que pueden inducirse y expresarse después de recibir el daño provocado por los herbívoros (Karban y Baldwin, 1997). Debido a que presentar caracteres defensivos puede ser costoso y a que las plantas suelen estar expuestas a diferentes tipos de ambiente biótico este mecanismo se ha interpretado como una manera de minimizar el costo de defenderse al inducir atributos defensivos sólo cuando hay certeza de recibir daño por herbívoros (Karban *et al.*, 1999, Boege, *en prensa*). Hay evidencia del valor adaptativo de esta respuesta plástica (Agrawal 1998, Baldwin, 1998), sin embargo la inducción de caracteres defensivos puede estar limitada por restricciones genéticas, bioquímicas o ecológicas lo que puede condicionar sus costos o su valor adaptativo (Agrawal, 2004, Adler *et al.* 2006).

A nivel geográfico se espera que exista variación en la defensa como resultado de las interacciones planta-herbívoro entre poblaciones debido a: i) diferencias ambientales específicas de cada población, ii) diferencias en las áreas de distribución de los interactuantes, iii) la abundancia de especies interactuantes varía geográficamente y a que viii) las poblaciones tienen diferente variabilidad genética, lo que promueve o limita la respuesta evolutiva (Thompson, 1999a).

En el mismo contexto la teoría del mosaico geográfico de la coevolución postula que la existencia de mosaicos de selección promueve la diferenciación poblacional en los caracteres involucrados en las interacciones interespecíficas. También, debido a que sólo ocurre selección recíproca en algunas localidades los caracteres que median la interacción estarán ajustados o desajustados en diferentes poblaciones, ocasionando casos de maladaptación local; por lo que se predice que ningún carácter se vería favorecido en todas las poblaciones de una especie (Thompson, 1999b, 2005). De esta manera puede hipotizarse que el papel evolutivo de los caracteres de defensa varíe geográficamente.

Con base en estudios previos, este trabajo evalúa la variación geográfica de dos caracteres de defensa al daño por herbívoros: (i) la densidad de tricomas foliares y (ii) la concentración de metabolitos secundarios, en particular de atropina y de escopolamina en diferentes poblaciones de la hierba anual *Datura stramonium*.

Antecedentes

Los tricomas como carácter defensivo

Se conoce como tricoma a cualquier proyección epidérmica que sobresale de la superficie de los órganos vegetales. A pesar de que los tricomas más comunes son los pilosos, el término comprende tanto formaciones sencillas (*papilas*) como complicadas (escamas), siempre y cuando se originen a partir de células epidérmicas (Font Quer, 1993).

La densidad de tricomas se ha considerado tradicionalmente como un mecanismo de defensa en contra de los herbívoros (Levin, 1973; Marquis, 1992; Rodríguez *et al.*, 1984). Existe abundante evidencia que respalda esta idea (Wagner, 1991; Baur *et al.*, 1991; Rausher, 2001), sin embargo, la expresión de este carácter puede también verse afectada por factores ambientales tales como la disponibilidad de agua o la temperatura (Bell, 1997; Roy *et al.*, 1999). Si esto sucede la densidad de tricomas no estaría determinada exclusivamente por la selección impuesta por los herbívoros sino también por factores abióticos que inciden directamente sobre su expresión (Levin, 1973). Además, la expresión de tricomas puede también verse limitada o promovida por presiones selectivas actuando sobre otros caracteres con los que esté correlacionada genéticamente. En este sentido, si la densidad de tricomas está correlacionada genéticamente con otras características de la hoja, se esperaría que una presión de selección ejercida sobre dichas características produzca cambios en la densidad de tricomas (Björkman y Anderson, 1990; Roy *et al.*, 1999). Como consecuencia, la expresión y función defensiva de los tricomas no sólo dependerá de la selección impuesta por los herbívoros sino también por las características ambientales locales que pueden estar

actuando directamente sobre los tricomas o indirectamente a través de otros caracteres correlacionados (Geber y Griffen, 2003).

Tricomas foliares como carácter de defensa en *Datura stramonium*

Diversos estudios respaldan la idea de que los tricomas son un carácter defensivo contra los herbívoros en la familia Solanaceae (Thurston, 1970; Duffey y Isman, 1981; Kennedy y Sorenson, 1985; Wilkens *et al.*, 1996) y en especies del género *Datura* (Elle, *et al.*, 1999; van Dam *et al.*, 1990, Valverde *et al.*, 2001) y en *Datura*.

Valverde *et al.* (2001) analizaron el papel de los tricomas como carácter defensivo al ataque por herbívoros en diferentes poblaciones de *D. stramonium* en el centro de México, encontrando que la densidad de tricomas es un componente de resistencia y que afecta la adecuación de las plantas mediante su asociación con la resistencia. En dicho estudio se detectó selección direccional positiva para la resistencia a los herbívoros. Sin embargo, esta relación no se cumple en todas las poblaciones estudiadas (sólo en tres de seis), lo que nos sugiere la existencia de otros factores además de la densidad de tricomas que pueden estar determinando la resistencia a nivel interpoblacional. En un experimento de jardín común determinaron que la densidad de tricomas es un carácter plástico susceptible a efectos ambientales aunque tiene base genética. Recientemente Kariñho-Betancourt (2009) encontró que hay heredabilidad, variación genética y selección direccional positiva para la densidad de tricomas en *Datura stramonium*. Por lo que es posible la evolución de este carácter por selección natural.

Alcaloides como atributo de defensa

Los alcaloides tropánicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas con la capacidad de producir un efecto fisiológico o tóxico si son ingeridos por vertebrados o insectos. Estos compuestos presentan una estructura bicíclica hidroxilada, esterificada con ácidos orgánicos, originada por la condensación de un anillo pirrolidínico y otro piperidínico, que comparten un átomo de nitrógeno y dos de carbono (Fig. 1). La disposición espacial del grupo alcohol situado sobre el tercer carbono, determina la existencia de dos tipos de estructuras tropánicas: 3- α -hidroxitropano o tropanol (hiosciamina, atropina, escopolamina) y 3- β -hidroxitropano o pseudotropanol (cocaína, tropococaína). El grupo amino, común en todos los alcaloides generalmente se encuentra metilado (Lounasmaa y Tamminen, 1993; Alexander *et al.*, 2008). Los alcaloides tropánicos afectan la actividad del Acetil-colina al evitar por competencia que este neurotransmisor se una con sus receptores muscarínicos de membrana (Roddick, 1991). Esto tiene un efecto negativo en diferentes especies de insectos (Shonle, 1999 en Shonle y Bergelson, 2000). Se ha propuesto que los metabolitos secundarios de las plantas han evolucionado en respuesta al ataque de herbívoros (Ehlich y Raven, 1964). La evolución y diversidad de metabolitos secundarios ha sido explicada (al igual que otros caracteres de resistencia) mediante la analogía de la carrera armamentista entre las plantas y sus herbívoros (Janzen, 1980).

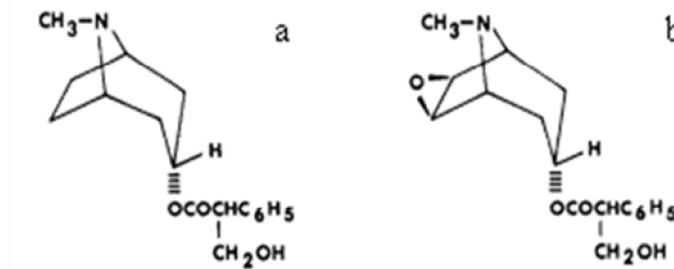


Figura 1. Estructura molecular de los alcaloides analizados. a) Atropina y b) escopolamina.

En este contexto coevolutivo se esperaría que los compuestos secundarios que hayan evolucionado recientemente en una misma ruta biosintética sean más efectivos o potentes, es decir escalamiento (Agrawal, 2007), como defensa en contra de los insectos actuales (Berembaum, 1983). Esto puede observarse en la tendencia de encontrar alcaloides más tóxicos en grupos de plantas más derivados (Levin y York, 1978; Gottlieb, 1990). Si esto sucede, los metabolitos secundarios intermediarios se conservarían sólo como intermediarios precursores de otros alcaloides más recientes y que no han sido removidos por selección (Jones y Firn 1991) o debido a que tengan alguna función en el metabolismo primario (Seigler y Price, 1976; Gottlieb, 1990). A pesar de esto, dado que la defensa química es costosa entonces la producción de metabolitos secundarios debe ser muy regulada y estar fuertemente correlacionada con la defensa en contra de los herbívoros (Shonle y Bergelson, 2000). De este modo, la presencia individual de metabolitos secundarios debería ser mantenida por selección impuesta por parte de los diferentes herbívoros que consumen las plantas (Marquis, 1992; Shonle y Bergelson, 2000). Adicionalmente, la presencia de más de un metabolito secundario podría actuar de

modo sinérgico, y potenciar el efecto defensivo de los alcaloides (Berembaum *et al.*, 1991).

Alcaloides defensivos en *Datura stramonium*

La familia Solanaceae es rica en alcaloides tropánicos. En el género *Datura* el alcaloide más común es la hiosciamina. Otro compuesto, la escopolamina (también conocida como hioscina) es el tropano más importante en especies como *Datura metel*, *D. wrightii* y *D. ferox* (Alexander *et al.*, 2008). En *Datura* los alcaloides son sintetizados en la raíz para después ser almacenados en vacuolas de donde pueden ser exportados a la parte aérea de la planta (Conklin, 1976). La biosíntesis de alcaloides tropánicos ha sido descrita en detalle en diferentes publicaciones (Cordell, 1981; Leete, 1989; Robins y Walton, 1993; Humphrey y O'Hagan, 2001).

Aunque la hiosciamina y la escopolamina son los alcaloides predominantes en las especies de *Datura*, hasta 30 diferentes alcaloides son producidos (aunque en menores cantidades) en especies como *D. ceratocaula*, *D. inoxia* o *D. stramonium* (Berkov y Zayed, 2004; Berkov *et al.*; 2006).

En *D. stramonium* es posible encontrar principalmente dos alcaloides: hiosciamina y escopolamina (Shonle y Bergelson, 2000). Adicionalmente se forma por racemización la atropina, que posee las mismas propiedades farmacológicas que la hiosciamina, pero requiere el doble de dosis para lograr el mismo efecto (Alexander *et al.*, 2008). Para esta especie hay evidencia de selección impuesta por los herbívoros insectos sobre los alcaloides (escopolamina e hiosciamina) y se ha encontrado variación genética para la

concentración de ambos caracteres (Shonle y Bergelson, 2000). No se ha encontrado evidencia de que en esta especie ambos alcaloides actúen de manera sinérgica por lo que cada alcaloide está sujeto a una presión de selección independiente. En el mismo estudio sólo la hiosciamina actuó como carácter de resistencia y se encontró que estaba bajo selección estabilizadora. La escopolamina por su parte estuvo sujeta a selección direccional negativa, por lo que puede pensarse que este alcaloide actúa más como un fitofagoestimulante (Shonle y Bergelson, 2000).

Evidencia de variación geográfica en tricomas y compuestos químicos.

Distintos trabajos han analizado la variación geográfica tanto de estructuras pubescentes como los tricomas y/o compuestos químicos como terpenoides o aceites esenciales, ya sea desde un punto de vista puramente taxonómico, topográfico o climático. Vokou *et al.* (1994) estudiaron la variación geográfica de aceites esenciales en 23 poblaciones de *Origanum vulgare* (*Lamiaceae*), encontrando que la concentración, y la diversidad de aceites, varía entre poblaciones y que factores ambientales como la altitud y la eficiencia térmica influyen en la producción y variedad de aceites. En otro trabajo con la misma especie, se analizó la variación geográfica de diferentes tipos de estructuras pubescentes (tipos de tricomas glandulares y no glandulares) y de aceites esenciales en diferentes localidades a lo largo de Grecia. En este estudio se determinó que existe una tendencia a que en localidades ubicadas en zonas climáticas mediterráneas, las hojas presenten glándulas sésiles ricas en aceites esenciales, mientras que las poblaciones situadas en zonas climáticas continentales poseen menos glándulas y son pobres en aceites esenciales

(Kokkini *et al.* 1994). Ambos estudios señalan el papel del medio ambiente como generador de los patrones geográficos observados. Sin embargo, no analizan si estos atributos juegan un papel defensivo en contra del ataque por herbívoros y si dicho papel varía en diferentes poblaciones de una misma especie.

Loe *et al.* (2007) analizaron la significancia funcional de la presencia de tricomas en 30 poblaciones de *Arabidopsis lyrata*, encontrando que en poblaciones polimórficas los individuos que presentaban tricomas presentan significativamente menos daño en comparación con individuos glabros, lo que sugiere que los tricomas foliares son un componente de la resistencia a herbívoros en esta especie.

En una solanácea, *Datura wrightii*, se ha documentado la existencia de variación entre poblaciones en la frecuencia de plantas que producen tricomas glandulares y se ha encontrado la existencia de costos asociados a la producción de éste tipo de tricomas respecto a plantas que no los producen incluso en presencia de herbívoros. La detección de estos tipos de costos permitiría predecir que la frecuencia de plantas con tricomas glandulares en poblaciones naturales declinara (Hare y Elle, 2000). A la fecha existen pocos estudios que analicen explícitamente el papel defensivo de la densidad de tricomas foliares en un contexto geográfico y no existen trabajos que estudien el rol de la concentración de alcaloides a gran escala en otras especies del género *Datura*.

El estudio de la variación fenotípica de caracteres que median las interacciones en especies de amplia distribución y a gran escala nos permite observar la evolución en progreso y es el primer paso para identificar y determinar la importancia relativa de los factores que promueven la diferenciación fenotípica (e.g. Boyd, 2002; Herrera *et al.*, 2002; Mascó *et al.*, 2004; Herrera, 2005 en Chalcoff *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

1. Describir la variación geográfica en el daño foliar provocado por herbívoros y en la densidad de tricomas y tropano alcaloides en poblaciones de *D. stramonium* en el centro de México.
2. Determinar una relación entre la expresión de caracteres de defensa y el nivel de daño foliar provocado por los herbívoros a nivel intrapoblacional.
3. Determinar la asociación a nivel geográfico entre el daño foliar provocado por herbívoros, la expresión de caracteres defensivos (tricomas foliares y tropano alcaloides) y variables climáticas (temperatura, precipitación y altitud).

Hipótesis

Si los alcaloides tropánicos y los tricomas foliares son componentes de la resistencia a los herbívoros en *D. stramonium*, entonces existirá una relación poblacional entre dichos componentes y la cantidad de daño foliar impuesto por los herbívoros.

Adicionalmente, si el ambiente físico (temperatura, precipitación y altitud) actúa como un agente de selección o condiciona la expresión de los atributos defensivos se esperaría que la variación geográfica en el daño foliar se explique en parte por la interacción entre el ambiente y la expresión de la defensa.

Sistema de estudio

Datura stramonium (Solanaceae) conocida coloquialmente como "Toloache" (Fig. 2), es una hierba anual de hábitos ruderales y amplia distribución que crece en las orillas de los caminos y en ambientes perturbados (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Valverde., *et al*, 2001, Shonle y Bergelson, 2000) (Fig. 2). Presenta un tipo de ramificación dicotómica, las ramas principales se originan como bifurcaciones del tallo que las precede (Cabrales, 1991). Los tallos son huecos, erectos, de hasta 2 m de altura y pueden presentar coloraciones que van desde tonos verdes hasta púrpuras. Las hojas tardías son alternas y pecioladas, los peciolo pueden medir más de 12 cm de largo; la lámina foliar mide de 5 a 25 cm de largo y 4 a 25 cm de ancho, presentando formas que varían de oval a elíptica, de cuneada a subcordada en la base con bordes lobulados. La superficie de la lámina puede ser glabra o puberulenta, siendo de un color verde más oscuro en el envés. Las hojas son generalmente muy olorosas (Weaver y Warwick, 1984). Sus flores son hermafroditas y autocompatibles, de color blanco o lila, de corola tubular y presentan separación espacial y temporal en la función macho y hembra. La flor dura sólo un día, abriendo por la noche y cerrándose en la madrugada del día siguiente (Motten y Antonovics 1992; Stowe, 2000). Los son polinizadores principales son lepidópteros de la familia Sphingidae, aunque también suelen ser visitadas por abejas pequeñas (Halictidae) y *Apis mellifera* (Motten y Antonovics 1992).



Figura 2. *Datura stramonium*, conocida popularmente como "Toloache".

Varias especies de insectos se encuentran asociadas al toloache y comúnmente es consumida por tres herbívoros especialistas (*Lema trilineata*, *Epitrix párvula* y *Manduca sexta*) y un generalista (*Sphenarium purpurascens*). Cada uno de estos insectos consume las hojas de *D. stramonium* de manera diferente (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Valverde., et al, 2001).

Lema trilineata (Kogan y Goeden, 1970; Peterson y Dively, 1981) y *Epitrix parvula* son coleópteros de la familia Chrysomelidae (Fig. 3a y 3b). En un principio *E. parvula* consume la hoja del toloache cuando es todavía una plántula y perfora las hojas dejando orificios pequeños en la lámina foliar (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994). Posteriormente, la hembra de *L. trilineata* ovoposita en el envés de las hojas y las larvas una vez que emergen se alimentan de ellas (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994); estas larvas producen orificios de mayor tamaño a los hechos por *E. parvula*. Por otro lado, las larvas de *Manduca sexta* (Lepidóptera) también son folívoras especialistas de *Datura*, pero a pesar de ser más voraces son generalmente solitarias (Valverde, 2001).

Por su parte, el consumidor generalista *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera) (Fig. 3c), es muy abundante en la región central de México y puede provocar daños severos en el tejido foliar de *D. stramonium* (Valverde *et al*, 2001).

Finalmente, *D. stramonium* se encuentra asociada también a un insecto especialista consumidor de semillas: *Trichobaris soror* (Fig. 3d). Las hembras de *T. soror* ovipositan en el ovario de las flores o en frutos jóvenes, una vez que eclosionan, las larvas se alimentan de las semillas inmaduras y de parte del fruto. La magnitud del daño ocasionado por este depredador de semillas dependerá del tamaño alcanzado por el fruto y la cantidad de larvas que contenga (Cabrales, 1991).

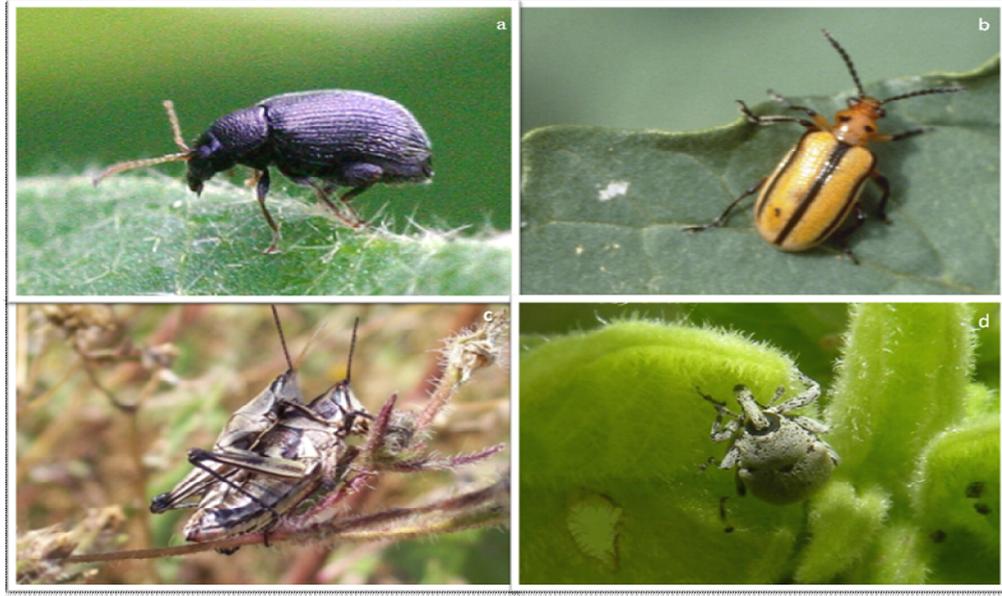


Figura 3. Insectos comúnmente asociados a *D. stramonium*. a) *Epitrix párvula*, b) *Lema trilineata*, c) *Sphenarium purpurascens* y d) *Trichobaris soror*.

Debido a la amplia distribución geográfica del toloache la especie tiene que confrontar tanto diferentes condiciones ambientales como diferentes herbívoros. Es por esto que es un sistema idóneo para estudiar la evolución de los caracteres de defensa contra herbívoros en un contexto geográfico (Thompson, 1995b).

Método

Colecta de campo

Durante septiembre y octubre de 2007 se visitaron 28 poblaciones de *D. stramonium* en la zona Centro y Este de México (Fig. 4), abarcando la mayoría de hábitats en las que la especie se distribuye (Cumplido, 2009). En cada población se seleccionaron diez individuos al azar de los que se colectaron aleatoriamente diez hojas completamente desarrolladas. Al momento de la colecta todos los individuos seleccionados se encontraban en fase de fructificación, esto para evitar el sesgo en los datos por efecto de la edad de la planta (Avery, *et al.*, 1959; Núñez-Farfán, 1991), adicionalmente se contó el número de ramificaciones por cada planta con el objetivo de tener un estimador del tamaño de planta y el vigor de la población. La ubicación y características climáticas de cada población se resumen en el Anexo 1.

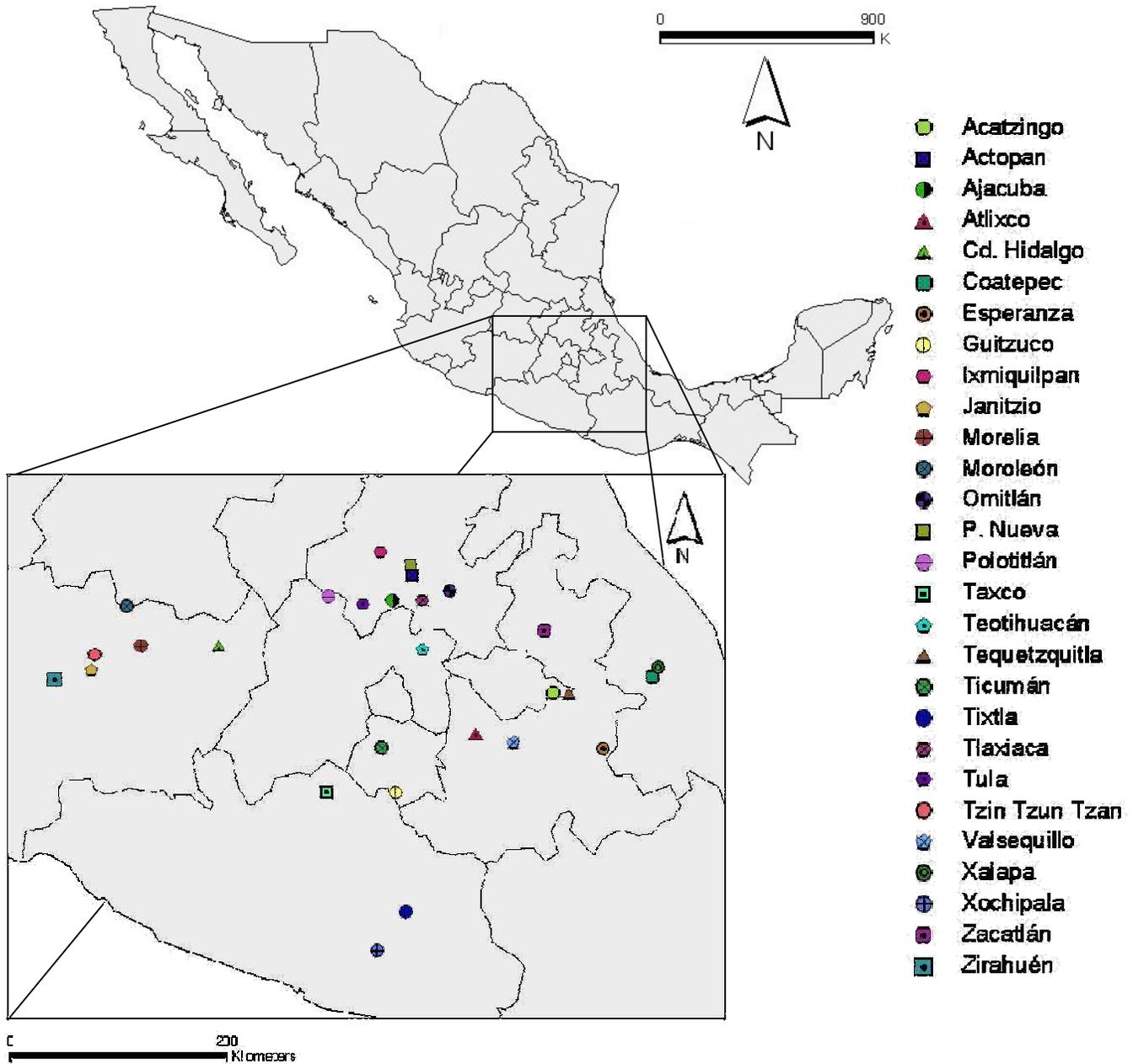


Figura 4. Poblaciones de *D. stramonium* colectadas en septiembre y octubre de 2007.

Técnicas de análisis de alcaloides

Debido a la relevancia médica de los alcaloides tropánicos, se han desarrollado diversos métodos para analizar estos compuestos. Las técnicas de extracción usadas para obtener muestras representativas para cuantificar alcaloides incluyen extracciones líquidas, sólido-fase o de intercambio de columnas (Papadoyannis *et al.*, 1993). El método de extracción puede inducir la racemización de hiosciamina a atropina durante el aislamiento o el almacenaje de muestras, por lo que la elección de la técnica de extracción correcta es crucial en la obtención de datos precisos cualitativa y cuantitativamente (Dräger, 2002).

En un principio la cromatografía de gases fue la técnica más utilizada para cuantificar alcaloides. Este método tiene la ventaja de ser muy preciso, pero debido a que las muestras son expuestas a altas temperaturas existe el riesgo de que algunos alcaloides se desnaturalicen (Papadoyannis, 1995). Actualmente, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), que utiliza columnas de fase reversa, es considerada la mejor técnica para cuantificar alcaloides (Friedman y Levin, 1989; Kursinszki *et al.* 2005).

Trabajo de laboratorio

Daño foliar

La proporción de daño foliar por individuo se estimó de la siguiente manera:
$$D_i = \frac{\sum_{t=1}^{10} A_d}{\sum_{t=1}^{10} A_t}$$
,

donde D_i es la proporción de daño recibida por individuo, $\sum_{t=1}^{10} A_d$ es la sumatoria del daño foliar recibido en 10 hojas de un individuo y $\sum_{t=1}^{10} A_t$ es la sumatoria del área foliar total de las mismas 10 hojas. El área foliar dañada y total por hoja se calculó con la ayuda de un

analizador de imágenes Win-Dias (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK). La proporción de daño foliar por población se estimó mediante el promedio de 10 individuos por población.

Densidad de tricomas

Se encontraron dos tipos de tricomas diferentes: tricomas foliares filamentosos (Fig. 5 a) y aparentemente glandulares (Fig.5 b). En este trabajo se analizó exclusivamente el papel defensivo de los tricomas foliares filamentosos debido a que los tricomas glandulares no son evidentes mediante microscopía óptica.

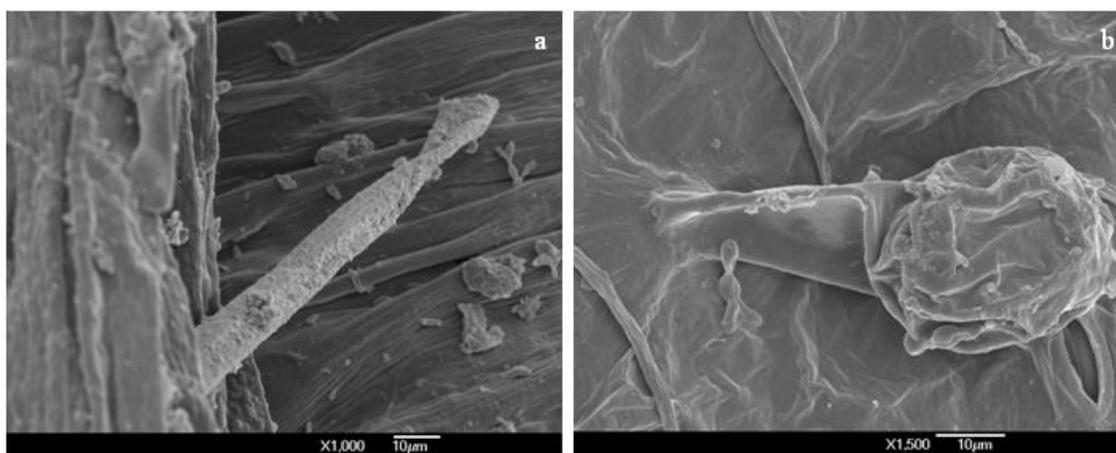


Figura 5. Tipos de tricomas foliares en *D. stramonium* vistos con microscopía electrónica de barrido. a) Filamentoso y b) aparentemente glandular.

Se obtuvo la densidad de tricomas filamentosos por individuo, para ello se promedió el número de tricomas existentes en 2.5mm^2 de 10 hojas por individuo. La densidad de tricomas por hoja se estimó como el promedio del número de tricomas en 5 campos de 2.5mm^2 que se ubicaron en diferentes regiones de la hoja: 1) Base de la venación central, 2) borde inferior derecho, 3) borde inferior izquierdo, 4) borde superior

derecho y 5) borde superior izquierdo, de modo que quedaran representadas diferentes regiones de la superficie foliar (Fig. 6).



Figura 6. Hoja de *D. stramonium* en la que se muestran los campos de observación empleados en la estimación de la densidad de tricomas.

Adicionalmente se midió con un vernier el largo de cada hoja con la finalidad de controlar el efecto del tamaño de la hoja en los análisis estadísticos.

Cuantificación de alcaloides

Se cuantificó la concentración de alcaloides (escopolamina y atropina) por individuo de cada población. Para esto se determinaron los alcaloides presentes en 10 hojas por individuo mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El protocolo de extracción fue el siguiente: Las hojas secas se maceraron en 20 ml de metanol (MeOH), donde se mantuvieron por un periodo de 12 hrs. A continuación se filtró el sobrenadante y se evaporó el MeOH a 60°C hasta llegar a sequedad. Posteriormente se agregaron 10 ml

de ácido clorhídrico (HCl) 0.1N y se enjuagó dos veces con 10 ml de cloroformo (CHCl_3), recuperando la fase acuosa. Se neutralizó el HCl con 0.8166g de bicarbonato de sodio y se enjuagó nuevamente dos veces con 10 ml de CHCl_3 , en esta ocasión se recuperó la fase orgánica. Finalmente se evaporó el cloroformo a 65% hasta la sequedad. Las muestras secas se resuspendieron en 1 ml antes de ser inyectadas al aparato de HPLC.

Las muestras se inyectaron en un aparato HP/Agilent 1100. Se utilizó una columna Discovery C-18 (Supelco Analytical) de fase reversa. La temperatura de la columna fue de 23 °C. El volumen de inyección fue de 30 μL y el flujo fue de 1ml por minuto, el tiempo de duración de cada corrida fue de 25 min. La fase móvil consistió en una solución de acetonitrilo, metanol 30mM y una solución *buffer* de KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (815:185g/g) a pH 6.00 (12:7.9:80.1, v/v/v). Se utilizó un lector DAD con una longitud de 210nm. Las curvas que se obtuvieron en cada corrida se compararon con los de una solución estándar de concentración conocida, el estándar usado es una solución de atropina y escopolamina (laboratorios Sigma-Aldrich) 0.001gr/ml.

Adicionalmente se obtuvo la proporción de ambos alcaloides que se calculó como el cociente de la concentración de escopolamina sobre la concentración de atropina. Proporciones más grandes se obtienen en individuos con mayor concentración de escopolamina y menor de atropina; por el contrario, proporciones pequeñas se encuentran en individuos con menor concentración de escopolamina y mayor de atropina.

Variables ambientales

Se obtuvo la temperatura, precipitación media anual y la altitud para cada una de las localidades. Estas variables se obtuvieron de la base de datos de Wordclim (Hijmans *et al*, 2006); la temperatura se reporta en grados Celsius, la precipitación en mm y la altitud en metros sobre el nivel del mar.

A partir de estas dos variables para cada población se calculó el *índice de aridez de Lang*, como el cociente de la precipitación media anual dividida entre la temperatura media anual, obteniendo valores cercanos a cero en lugares secos y valores altos en lugares húmedos (Oliver, 2005).

Análisis de datos

Cuando fue necesario y con el objetivo de cumplir los supuestos de las pruebas paramétricas, la densidad de tricomas se transformó a su raíz cuadrada y la proporción de daño foliar (p) se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada ($\text{ArcoSen}\sqrt{p}$). La concentración de alcaloides así como la proporción entre ambos se transformó a su logaritmo (Sokal y Rohlf, 1981). Los análisis estadísticos se realizaron con JMP versión 8 (SAS, 2008).

Variación poblacional en el daño foliar y en caracteres defensivos

Para detectar diferencias en la densidad de tricomas foliares, la concentración de alcaloides y el porcentaje de daño foliar entre poblaciones se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada variable, considerando el término población como factor predictivo.

Variación intrapoblacional en caracteres defensivos

Con la finalidad de determinar si la relación de los tricomas foliares y el daño foliar difiere entre poblaciones se realizó un ANCOVA incluyendo los términos densidad de tricomas, población y su interacción como factores predictivos y el daño foliar como variable de respuesta. Un efecto significativo en la interacción *densidad de tricomas × población* nos indicaría que la relación de la densidad de tricomas y el daño foliar difiere entre poblaciones. Posteriormente, para cada población se hizo una regresión del daño foliar como función de la densidad de tricomas y la concentración de cada alcaloide con el daño foliar, con el fin de analizar el sentido e intensidad de la relación entre estas variables.

Para determinar si la relación entre los dos alcaloides medidos (así como de su proporción) y el daño foliar difiere entre poblaciones se realizó un ANCOVA para cada una de estas tres variables químicas (atropina, escopolamina y su proporción). Cada ANCOVA incluyó una variable química, la población y su interacción como factores predictivos y el daño foliar como variable de respuesta. Un efecto significativo en la interacción de alguna de estas variables químicas con el término población nos indicaría que la relación entre dicha variable y el daño foliar difiere entre poblaciones.

Correlaciones fenotípicas entre caracteres defensivos

Mediante correlaciones de Spearman se determinó la existencia de correlaciones entre las medias poblacionales de los caracteres de defensa (densidad de tricomas, concentración de atropina y concentración de escopolamina).

Patrón geográfico en la defensa

Finalmente, para evaluar si la cantidad de daño que recibieron las poblaciones puede ser explicado por la variación geográfica en tricomas, alcaloides y variables ambientales se realizó una regresión múltiple que incluyó como variables predictivas, la densidad de tricomas, concentración de atropina y escopolamina, el índice de Lang, la altitud y el tamaño promedio de la planta. Esto último se utilizó como un estimador de la disponibilidad de recursos de la población. El modelo sólo incluyó interacciones de segundo orden debido al tamaño de muestra.

Resultados

Variación poblacional en el daño foliar y en caracteres defensivos

Daño foliar - La proporción promedio de daño foliar ($\bar{x} \pm D.E.$) fue de 0.22 ± 0.12 con un coeficiente de variación de 54.96 (Tabla 1 a y Fig. 7 a). El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre poblaciones en la proporción de área foliar removida. ($F = 10.44, p = <0.0001$) (Tabla 2a, Fig. 8).

Densidad de tricomas - La densidad promedio de tricomas ($\bar{x} \pm D.E.$) fue de 7.28 ± 1.95 tricomas en 2.5mm^2 con un coeficiente de variación de 26.87 (Tabla 1 b). El análisis de varianza detectó que hay diferencias significativas en la densidad de tricomas foliares entre poblaciones ($F = 6.56, p = <0.0001$) (Tabla 2 b y Fig. 7 b).

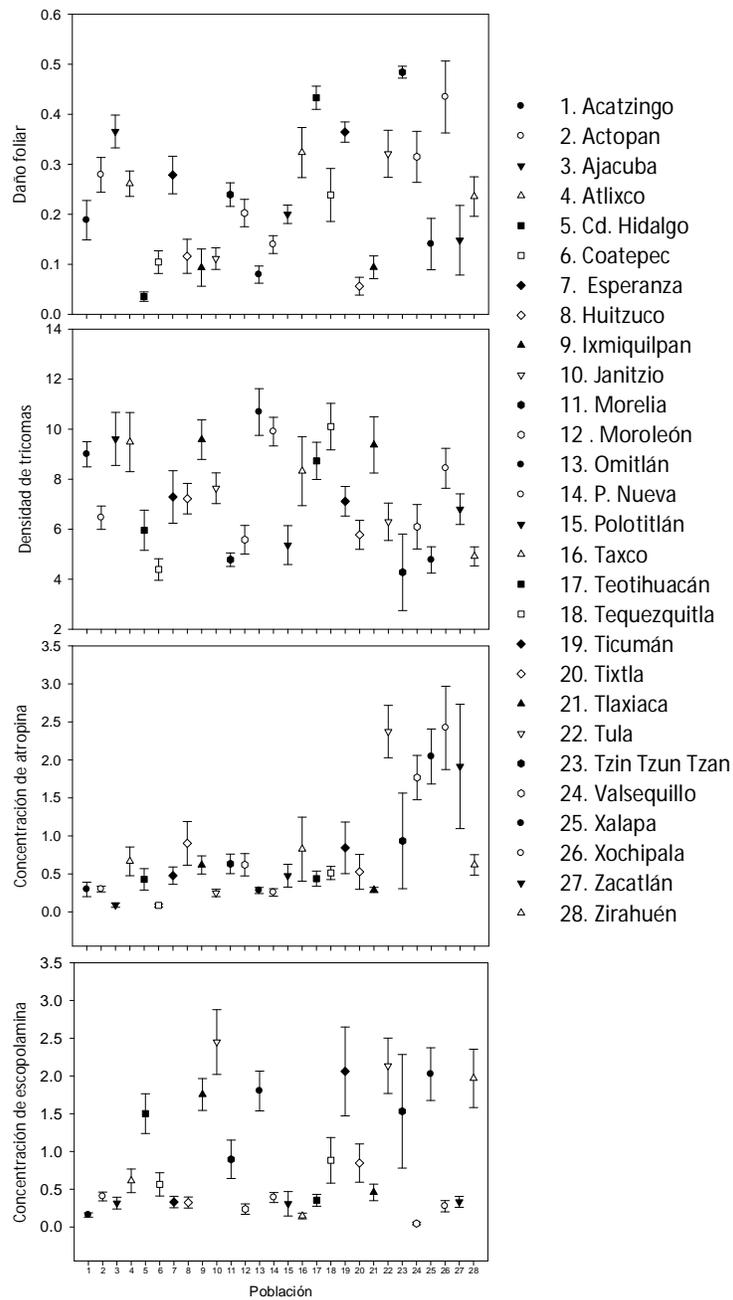


Figura 7. Promedios poblacionales del a) daño foliar, b) densidad de tricomas foliares, c) concentración de atropina y d) concentración de escopolamina en 28 poblaciones de *Datura stramonium*.

Concentración de alcaloides – La concentración promedio de atropina ($\bar{x} \pm D.E.$) fue de $0.78 \text{ mg/g} \pm 0.67$ (Tabla 1 c), mientras que la de escopolamina fue de $0.89 \text{ mg/g} \pm 0.75$ (Tabla 1d). El ANOVA detectó diferencias significativas entre poblaciones, tanto para la atropina (Tabla 2c y Fig. 7 c) como para la escopolamina (Tabla 2 d y Fig. 7 d). La proporción (escopolamina/atropina) promedio fue de 1.99 ± 2.28 (Tabla 1 e). En este caso también se encontraron diferencias significativas entre poblaciones (Tabla 2 e).

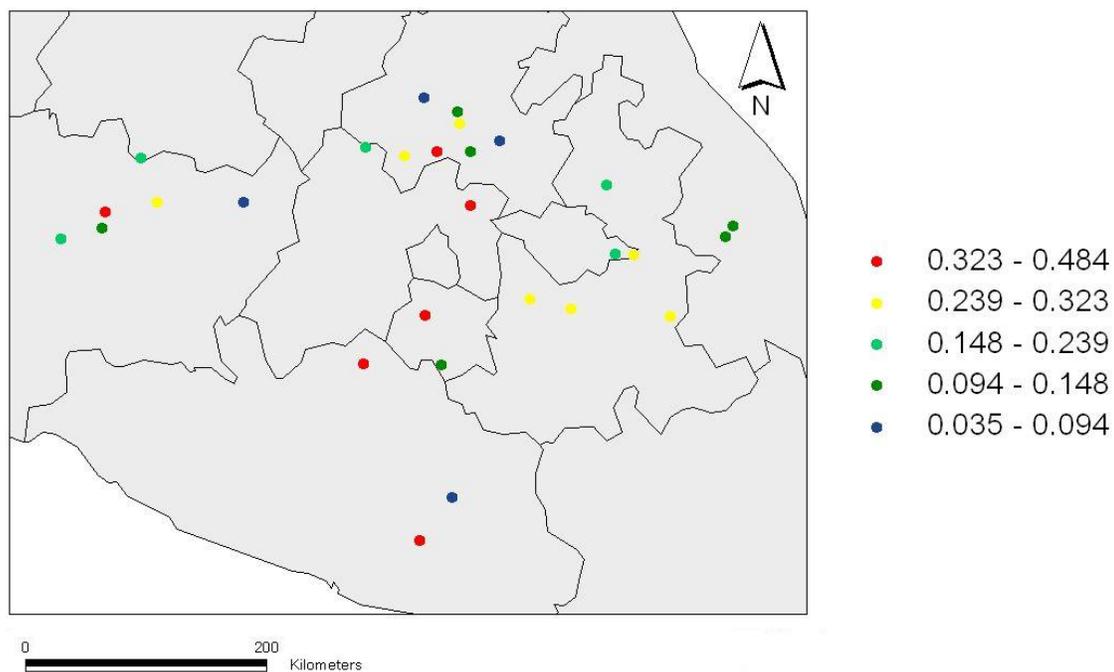


Figura 8. Mapa de la zona central de México en donde se muestra la distribución geográfica de los niveles de daño foliar para las 28 poblaciones de *D. stramonium* incluidas en este trabajo.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de la a) densidad de tricomas foliares, b) proporción de daño foliar c) concentración de atropina, d) concentración de escopolamina y e) proporción de alcaloides en 28 poblaciones de *D. stramonium* en México.

| Variable | \bar{X} | Rango | S² | CV (%) |
|-------------------------|-----------|---------------|----------------------|---------------|
| a. Daño foliar | 0.22 | 0.035 – 0.48 | 0.12 | 54.96 |
| b. Densidad de tricomas | 7.28 | 4.26 – 10.68 | 1.95 | 26.87 |
| c. Atropina (mg/g) | 0.78 | 0.084 – 2.41 | 0.67 | 86.31 |
| d. Escopolamina (mg/g) | 0.89 | 0.044 – 3.19 | 0.75 | 84.59 |
| e. Proporción | 1.99 | 0.0299 - 9.82 | 2.28 | 114.23 |

Tabla 2. Variación poblacional en el daño foliar y caracteres defensivos incluidos en *D. stramonium*. Resultados de los análisis de varianza por variable considerando el término población como fuente de variación. a) Densidad de tricomas, b) daño foliar, c) atropina, d) escopolamina y e) proporción de alcaloides.

| a. Fuente de variación (d. f.) | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 5.8376 | 0.216207 | 10.4422 | <.0001 | 0.51 |
| Error | 212 | 4.389485 | 0.020705 | | | |
| C. Total | 239 | 10.227085 | | | | |

| b. Fuente de variación (d. t.) | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 156.10241 | 5.78157 | 6.5665 | <.0001 | 0.38 |
| Error | 212 | 186.65727 | 0.88046 | | | |
| Total | 239 | 342.75968 | | | | |

| c. Fuente de variación (atr) | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 29.507076 | 1.09285 | 6.9125 | <.0001 | 0.4 |
| Error | 211 | 33.358884 | 0.1581 | | | |
| C. Total | 238 | 62.865959 | | | | |

| d. Fuente de variación (esc) | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 47.948768 | 1.77588 | 16.1476 | <.0001 | 0.63 |
| Error | 211 | 23.205286 | 0.10998 | | | |
| C. Total | 238 | 71.154054 | | | | |

| e. Fuente de variación (prop) | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 430.37476 | 15.9398 | 23.0847 | <.0001 | 0.71 |
| Error | 211 | 145.69371 | 0.6905 | | | |
| C. Total | 238 | 576.06847 | | | | |

Variación intrapoblacional en caracteres defensivos

El análisis de covarianza indicó diferencias significativas en la proporción de daño foliar entre poblaciones. No se detectó un efecto dependiente de los tricomas sobre la variable de respuesta pero si a través de la interacción con la población (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de covarianza del daño foliar poblacional como función de la densidad, utilizando como covariables las poblaciones de *Datura stramonium*. $r^2 = 0.51$.

| Fuente de variación | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|----------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------------|----------------------|
| Densidad de tricomas | 1 | 0.0143077 | 0.0143077 | 0.7266 | 0.3951 | 0.51 |
| Población | 27 | 3.806106 | 0.1409669 | 7.1593 | <.0001* | |
| D. de tricomas × Población | 27 | 0.7403044 | 0.0274187 | 1.5108 | 0.0462* | |
| Error | 186 | 3.6623616 | 0.01969 | | | |
| Total | 241 | 9.7740397 | | | | |

El análisis de regresión independiente para cada población indicó que sólo en dos poblaciones se encontró una relación significativa entre la densidad de tricomas y el daño foliar. En Tequezquitla (Tlaxcala), se encontró una relación negativa entre la densidad de tricomas y el daño foliar ($R^2 = 0.52$, $p = 0.0109$). Por el contrario en Janitzio (Michoacán), se encontró una relación positiva entre ambas variables ($R^2 = 0.69$, $p = 0.0017$).

Los análisis de covarianza que utilizaron el término población, un alcaloide y su interacción como factores predictivos del daño foliar detectaron diferencias significativas entre poblaciones en la proporción de daño foliar (Tabla 4). En ningún caso se encontró un efecto significativo de los alcaloides de sobre el daño foliar. Tampoco se detectó un efecto significativo de la interacción de alguno de los alcaloides o su proporción en el término población.

Tabla 4. Resultados de los ANOVA de la variación geográfica del efecto de los alcaloides tropánicos sobre el daño foliar. a) Atropina, b) escopolamina, c) proporción de alcaloides en *Datura stramonium*.

| a. Fuente de variación | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 2.8460294 | 0.1054085 | 4.9789 | <.0001 | 0.49 |
| Atropina | 1 | 0.0036015 | 0.0036015 | 0.1701 | 0.6805 | |
| Población × Atropina | 27 | 0.4995657 | 0.0185024 | 0.8739 | 0.6482 | |
| Error | 183 | 3.874324 | 0.021171 | | | |
| Total | 238 | 10.06746 | | | | |

| b. Fuente de variación | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 27 | 3.1130212 | 5.7854 | <.0001 | 0.52 |
| Escopolamina | 1 | 1 | 0.0244675 | 1.2277 | 0.2693 | |
| Población × Escopolamina | 27 | 27 | 0.7204723 | 1.339 | 0.1343 | |
| Error | 183 | 3.647029 | 0.019929 | | | |
| Total | 238 | 10.06746 | | | | |

| c. Fuente de variación | g. l. | S. C. | C.M. | F | p | r² |
|-------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------|----------|----------------------|
| Población | 27 | 27 | 2.7114638 | 4.8728 | <.0001 | 0.51 |
| Proporción | 1 | 1 | 0.0008172 | 0.0397 | 0.8424 | |
| Población × Proporción | 27 | 27 | 0.5922813 | 1.0644 | 0.3869 | |
| Error | 183 | 3.771451 | 0.020609 | | | |
| Total | 238 | 10.06746 | | | | |

Correlaciones fenotípicas entre caracteres defensivos

Las correlaciones entre la densidad de tricomas y ambos alcaloides (atropina y escopolamina) no resultaron significativas. La correlación entre escopolamina y atropina fue positiva aunque tampoco resultó significativa (Tabla 5).

Tabla 5. Correlaciones de Pearson entre la densidad de tricomas, la concentración de atropina y la de escopolamina en *Datura stramonium*, N = 28.

| Variable 1 | Variable 2 | Correlación | p |
|----------------------|-------------------|--------------------|----------|
| Densidad de tricomas | Atropina | -0.178 | 0.3648 |
| Densidad de tricomas | Escopolamina | -0.0303 | 0.8783 |
| Escopolamina | Atropina | -0.0836 | 0.6722 |

Patrón geográfico en la defensa

El modelo de regresión múltiple fue significativo ($F = 4.44$, $p = 0.0065$) y logró explicar 65% de la variación en el daño foliar (Tabla 6). Se detectó un efecto significativo de la densidad de tricomas foliares ($t = 3.42$, $p = 0.0051$) y de la concentración de atropina ($t = 5.11$, $p = 0.0003$). También se detectó un efecto de la interacción de la densidad de tricomas × Índice de Lang ($t = 3.58$, $p = 0.0038$), densidad de tricomas × atropina ($t = 2.89$, $p = 0.0136$) y densidad de tricomas × tamaño ($t = 3.01$, $p = 0.0051$) (Fig. 9). Finalmente se encontró un

efecto significativo de las interacciones escopolamina × tamaño ($t = -2.92$, $p = 0.0128$) y atropina × tamaño ($t = -2.8$, $p = 0.0159$) (Fig. 10).

Tabla 6. Resultados de la regresión múltiple que evalúa la relación de los caracteres defensivos, del índice de Lang y del tamaño de planta sobre el daño foliar en 28 poblaciones de *D. stramonium*.

ANOVA del modelo

| Fuente de variación | g. l. | S. C. | C. M. | F | p | R2 |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|----------|---------------|-----------|
| Modelo | 15 | 0.34767967 | 0.023179 | 4.4434 | 0.0065 | 0.65 |
| Error | 12 | 0.06259735 | 0.005216 | | | |
| Total | 27 | 0.41027702 | | | | |

| Efecto | Estimado | t | p |
|-------------------------------------|-----------------|----------|---------------|
| Intercepto | -0.354811 | -1.37 | 0.1959 |
| Densidad de tricomas | 0.0602143 | 3.42 | 0.0051 |
| Lang | -0.002707 | -1.17 | 0.2658 |
| Escopolamina | -0.561325 | -0.78 | 0.45 |
| Atropina | 4.4231915 | 5.11 | 0.0003 |
| Tamaño | -0.001862 | -0.2 | 0.8433 |
| Escopolamina × Atropina | 14.677077 | 1.47 | 0.1674 |
| Densidad de tricomas × Escopolamina | 0.518153 | 1.66 | 0.1231 |
| Densidad de tricomas × Atropina | 0.9447418 | 2.89 | 0.0136 |
| Atropina × Tamaño | -0.370103 | -2.8 | 0.0159 |
| Escopolamina × Tamaño | -0.322029 | -2.92 | 0.0128 |
| Densidad de tricomas × Tamaño | 0.0100151 | 3.01 | 0.0109 |
| Lang × Densidad de tricomas | 0.0020897 | 3.58 | 0.0038 |
| Lang × Atropina | -0.164403 | -3.54 | 0.0041 |
| Lang × Escopolamina | 0.0181042 | 0.64 | 0.5323 |
| Lang × Tamaño | 0.0004148 | 1.03 | 0.3225 |

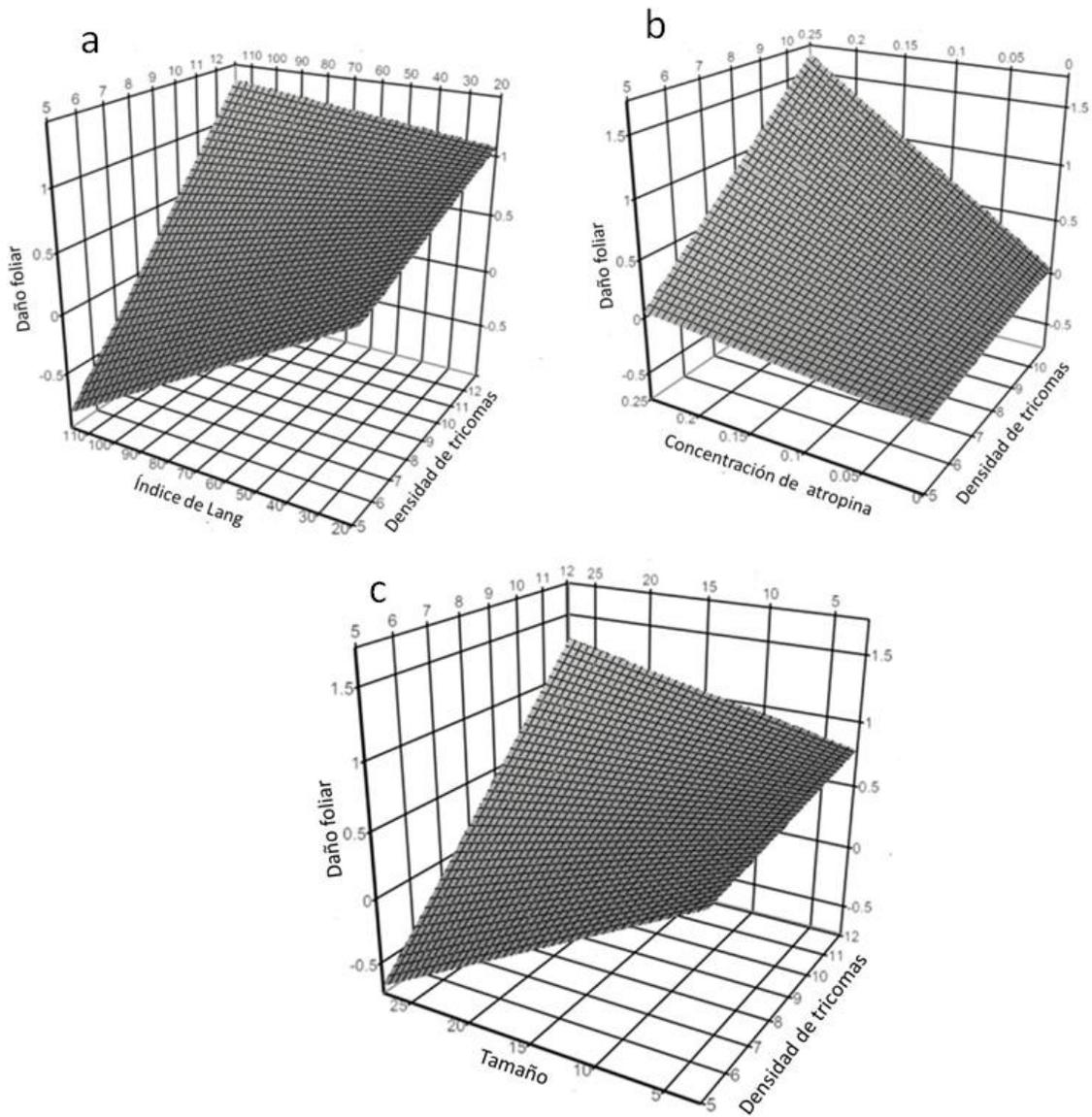


Figura 9. Superficies de la interacción de la densidad de tricomas foliares con a) índice de Lang, b) concentración de atropina y c) el tamaño de planta.

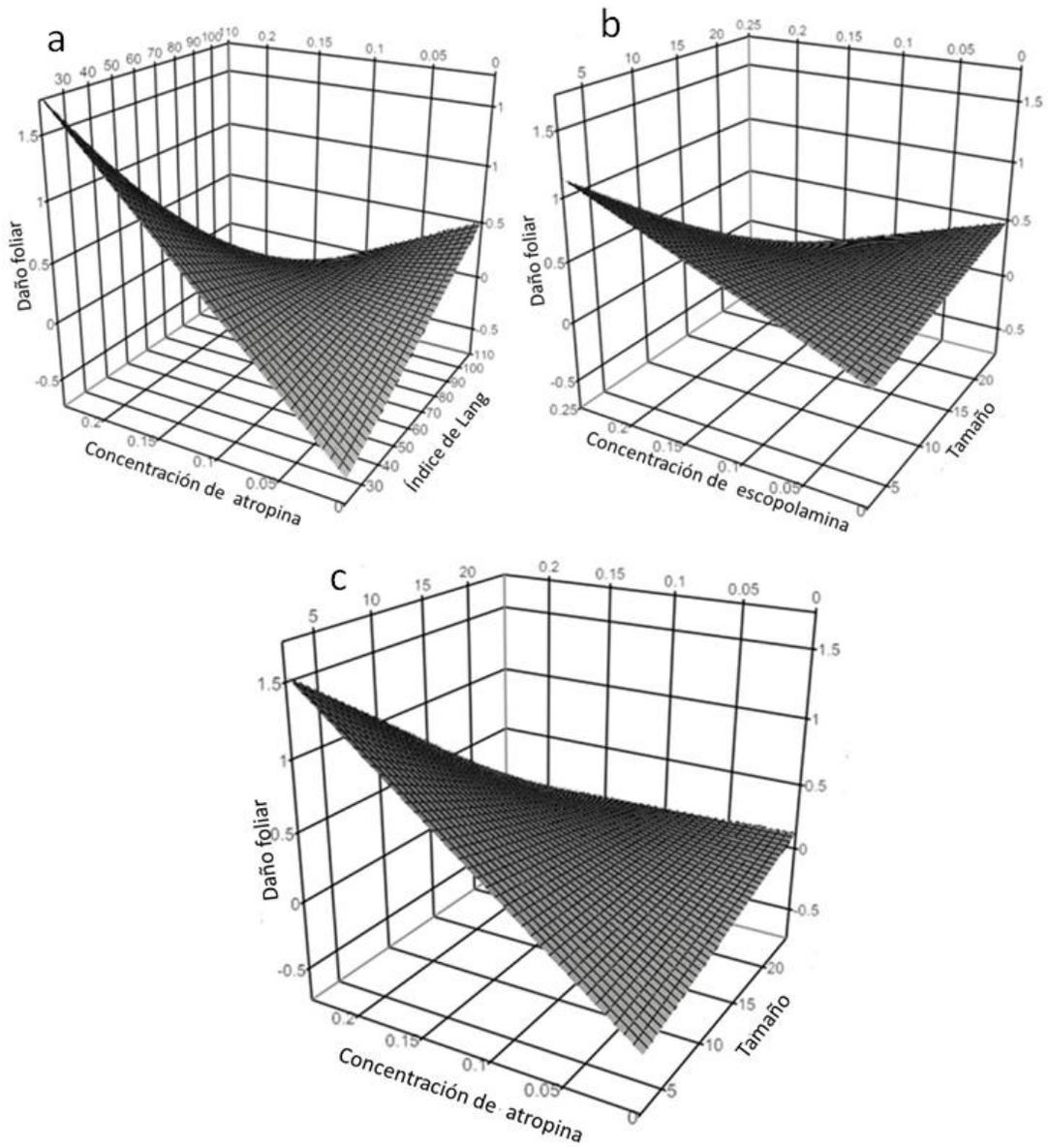


Figura 10. Superficies de la interacción de la concentración de atropina con a) índice de Lang y con el b) tamaño de planta. c) Superficie de la interacción escopolamina y tamaño.

Discusión

Variación poblacional en el daño foliar y en caracteres defensivos

Los datos indican la existencia de variación fenotípica entre poblaciones en la densidad de tricomas foliares. Los niveles de densidad de tricomas promedio ($7.28 \times 2.5\text{mm}^2$) son menores a los encontrados en otros estudios en poblaciones naturales de *D. stramonium* (Valverde *et al.*, 2001) quienes encontraron en 6 poblaciones un promedio de 8.4 tricomas $\times \text{mm}^2$. En el presente trabajo se estudiaron cinco poblaciones incluidas en el estudio de Valverde *et al* (2001), (Ticumán, Zirahuén, Teotihuacán, Patria Nueva y Actopan), en todos los casos la densidad de tricomas fue menor en este trabajo al relativizar el área foliar. El observar estas diferencias puede ser un reflejo de la plasticidad observada en los tricomas foliares por lo que su densidad podría variar no sólo entre poblaciones sino entre años, cosa que ha sido observado en otras especies como *Arabidopsis lyrata* (Loren *et al.*, 2007) y en *Datura wrightii*, otra solanácea (Hare *et al.*, 2003).

Por otra parte, se detectó variación interpoblacional en el daño foliar impuesto por los herbívoros. Los niveles de daño encontrados (26% de área foliar) son similares a los hallados por Valverde *et al.* (2001) (26%) para las cinco poblaciones comunes en ambos trabajos.

Se encontró variación fenotípica entre poblaciones en la concentración de atropina y escopolamina. Las concentraciones encontradas en este trabajo (0.78 mg/g de atropina y 0.89 mg/g de escopolamina) están por debajo de las descritas para esta misma especie en Shonle y Bergelson (2000) y Parr *et al.* (1990) (1.5mg/g tanto para hiosciamina como para escopolamina). Esto puede deberse la degradación de los alcaloides debido al tiempo

de almacenaje de las plantas (1 año) y/o a la técnica de extracción (Dräger, 2002). Otra explicación a esta disminución en la concentración de alcaloides es que los herbívoros de poblaciones mexicanas ya hayan superado la barrera defensiva que representan los alcaloides, por lo que poseer altos niveles de alcaloides ya no representaría un beneficio para las plantas, quienes tendrían ahora que generar un componente de resistencias nuevo para evitar el consumo por herbívoros (Levin, 1980), pudiéndose favorecer entonces otra estrategia defensiva como lo puede ser la tolerancia (Garrido, 2009).

Variación intrapoblacional en caracteres defensivos

A diferencia de lo encontrado en Valverde (2001), no se encontró un patrón general claro en la función defensiva de los tricomas. Sin embargo, fue posible detectar que la manera en la que se relacionan los tricomas y el daño foliar difiere entre poblaciones (interacción densidad de tricomas \times población significativa). Al analizar cada población individualmente fue posible encontrar una relación entre la densidad de tricomas y el daño foliar en dos poblaciones. En Janitzio hay una relación negativa entre la densidad y los tricomas, mientras que en Tequezquitla a mayor número de tricomas hay mayor daño foliar. Estos resultados nos hablan de la existencia de patrones dentro de cada población. El no haber detectado una relación en el resto de poblaciones puede deberse al poder estadístico de la prueba ($N = 10$ en cada población), no a que no exista. En otro trabajo con *D. stramonium* ya se ha documentado que los tricomas son un carácter defensivo (Kariño-Betancourt, 2009), sin embargo no en todas las poblaciones se ha podido detectar dicho papel (Valverde *et al.*, 2001); y en un contexto geográfico se puede esperar que la relación

entre los tricomas y el daño impuesto por herbívoros difiera no sólo en magnitud sino en sentido (Thompson, 2005).

En el caso de ambos alcaloides los ANCOVA detectaron una tendencia poblacional que revele un papel defensivo de los alcaloides. En este caso no se detectó que la relación entre alcaloides y el daño foliar difiera entre poblaciones. Este resultado contrasta con lo encontrado por Shonle y Bergelson (2001), quienes encontraron que la concentración que la escopolamina actúa como un carácter defensivo y reduce el ataque de los herbívoros. Sin embargo esto puede deberse (como en el caso de los tricomas) a que por efecto del tamaño de muestra ($N=10$) no se pueda detectar una relación entre alcaloides y el daño foliar y no necesariamente a que no exista.

Correlación fenotípica entre caracteres defensivos

No se encontraron correlaciones fenotípicas significativas entre tricomas foliares y alguno de los alcaloides, ni tampoco entre escopolamina y atropina, lo que apunta a que no hay disyuntivas entre los caracteres defensivos analizados. Esto concuerda con Shonle y Bergelson (2001) quienes hallaron que en *D. stramonium* la hiosciamina y la escopolamina actúan y son seleccionadas independientemente, contrario a lo que se esperaría ocurriera entre defensas químicas y físicas (Steward y Keeler, 1988) costosas o entre diferentes defensas químicas que surgen de un mismo precursor (Hiltunen, 1976., Lebreton, 1982, Humphrey, 2001). La detección de correlaciones incluso fenotípicas entre caracteres defensivos apoyaría la existencia de síndromes de defensa (Agrawal y Fishbein, 2006), lo cual en este caso aparentemente no ocurre.

Patrón geográfico en la defensa

El análisis de regresión múltiple encontró un efecto significativo de la densidad de tricomas foliares sobre el daño foliar y el sentido de este efecto es positivo. Este resultado indica que poblaciones con densidades más altas de tricomas en las hojas presentan mayores niveles de daño. Este mismo patrón se detectó en el caso de la atropina, de modo que poblaciones con mayor cantidad de atropina presentaron mayor daño foliar. Aunque pudiera parecer contraintuitivo este patrón puede explicarse si consideramos que para una planta es más conveniente hacer una mayor inversión en caracteres defensivos en lugares dónde el consumo por parte de los herbívoros es mayor. Patrones similares en donde los caracteres que median una interacción se exageran han sido encontrados en interacciones antagonistas (Berenbaum y Zangerl, 1998; Okamoto, 1988; Toju y Sota, 2006).

Otra interpretación de este patrón es que los insectos pudieran tener una ventaja sobre las plantas en la "carrera armamentista". En este sentido, invertir mucho en caracteres defensivos no se reflejaría en una reducción neta sobre el daño por herbívoros ya que estos son capaces de sobrepasar las barreras que en algún momento pudieron evitar su ataque (Janzen, 1980; Berenbaum *et al.* 1986; Bowers y Puttick 1988; Lively *et al.*, 2004), e incluso podría sugerir que existan poblaciones de *D. stramonium* que son localidades "maladaptadas" o sitios en donde los herbívoros podrían haber "escapado" de la "carrera armamentista" con la planta y puedan consumirla más. La existencia de localidades maladaptadas (Berenbaum y Zangerl, 1998; Kaltz *et al.*, 1999; Zangerl y Berenbaum, 2003) así como poblaciones en las que uno de los interactuantes escapa a la

“carrera armamentista” (Hanifin *et al.*, 2008) ha sido documentada en otros sistemas antagónicos.

Otro aspecto que hay que considerar es que no se conoce la composición de herbívoros de todas las poblaciones de *D. stramonium* muestreadas. Es de esperar que el resultado de la interacción planta herbívoro difiera en poblaciones donde sólo se encuentren herbívoros especialistas respecto a aquellas en las que sólo hay generalistas o donde coexisten ambos herbívoros (van der Meijden, 1996; Lankau, 2007). De esta forma, en poblaciones cuya composición de herbívoros sea generalista las defensas deberían ser eficaces por lo que debería encontrarse poco daño provocado por herbívoros (Lankau, 2007). En poblaciones donde solo estén presentes herbívoros especialistas, podría esperarse que existieran altas concentraciones de alcaloides (Müller-Schärer *et al.*, 2004) pero serían sitios donde también podría esperarse que los herbívoros pudieran sobreponerse a las defensas químicas (Kliebenstein, 2002; Wittstock, 2004), mientras que en poblaciones con composiciones mixtas se encontrarían concentraciones de alcaloides y niveles de daño intermedios (Lankau, 2007). Andraca (2009) documentó la presencia de *Lema trilineata* (uno de los herbívoros especialistas de *D. stramonium*) de 19 poblaciones de toloache, 12 de las cuales se estudiaron en este trabajo. En cuatro de estas poblaciones no se registra presencia de *L. trilineata*, lo que representa evidencia de que la composición de herbívoros en poblaciones de *D. stramonium* en México varía geográficamente, por lo que aún hace falta un trabajo que analice explícitamente la respuesta de *D. stramonium* a diferentes composiciones de herbívoros.

Por otro lado, la densidad de tricomas está interactuando con el tamaño de planta, que puede considerarse un estimador indirecto de la productividad de cada población. En *D. stramonium* se encuentran niveles altos de herbivoría en poblaciones con alta densidad de tricomas y alta productividad. Estos resultados concuerdan con la hipótesis propuesta por Hochberg y Van Baalen (1998), la cual propone que en sitios más productivos la intensidad de la interacción antagonista se incrementará por efecto del crecimiento de la población de las plantas sobre el consumidor (Abrams, 2000; López-Pascua et al., 2008, Martín-Gálvez et al., 2007).

Por el contrario, en el caso de la interacción de la atropina y de la escopolamina con el tamaño de la planta se encontró que las poblaciones que presentaron un mayor daño foliar son aquellas con una baja productividad (en términos del tamaño promedio de la población) y con altas concentraciones de ambos alcaloides, lo que contrasta con las predicciones de la hipótesis de Hochberg y Van Baalen (1998), pero concuerda con un patrón geográfico en el que poblaciones con mayor inversión en defensa presentan mayor daño foliar.

El análisis de regresión detectó también una interacción significativa de la densidad de tricomas foliares con la concentración de atropina. Este resultado nos indica que las diferentes combinaciones de atropina y la densidad de tricomas foliares (a pesar de que los caracteres defensivos no estén correlacionados entre ellos) tendrían un efecto diferencial en el daño observado en una población. Lo que apoya la idea de que mecanismos de defensa múltiples son más comunes en comparación a aquellos que dependen de un sólo atributo (Paul y Hay 1986; Hartmann y Dierich 1998). En *D.*

stramonium combinaciones con mayor concentración de atropina y mayor densidad de tricomas presentan mayor daño foliar. Este resultado apoya también la idea de que hay una mayor inversión en caracteres defensivos en lugares donde se presenta un mayor daño foliar y concuerda con la idea de que en lugares donde existe mayor daño foliar hay también más inversión en la defensa (Berenbaum y Zangerl, 1998; Okamoto, 1988; Toju y Sota, 2006).

Por otro lado, la densidad de tricomas está interactuando con al menos un factor ambiental, en este caso se detectó que lo hace con la relación entre temperatura y precipitación (Índice de Lang). Valores del índice de Lang cercanos a cero se obtienen en lugares secos y valores altos en lugares húmedos (Oliver, 2005). En este trabajo se encontró que poblaciones con mayores niveles de herbivoría eran aquellas en lugares más húmedos y con más tricomas foliares. Este patrón puede deberse a que lugares desérticos (con menor competencia interespecífica) pueden ser más favorables para *D. stramonium* (Cumplido, 2009) lo que implicaría que la planta puede defenderse mejor en sitios secos en comparación con lugares húmedos. Otra explicación puede ser que exista un efecto negativo de la deficiencia de agua sobre el desempeño de los crisomélidos *E. párvula* y *L. trilineata*, herbívoros del toloache. La Spina, *et al* (2009) encontraron un efecto negativo del estrés hídrico sobre la supervivencia y capacidad de consumo foliar en *Chrysomela populi* por lo que no es raro pensar que la abundancia de los principales herbívoros de *D. stramonium* disminuya en poblaciones con limitación de agua.

Finalmente, la concentración de atropina está interactuando también con la relación entre temperatura y humedad (Índice de Lang). Al contrario de lo que pasa con la

densidad de tricomas en este caso se encontró mayor daño foliar en poblaciones secas y con mayor concentración de atropina. Este resultado concuerda con la idea de que hay una mayor inversión en caracteres defensivos en lugares donde el consumo por parte de los herbívoros es mayor lo que ha sido observado en otros sistemas antagónicos (Berenbaum y Zangerl, 1998 Okamoto, 1988; Toju y Sota, 2006), pero sugiere que la manera en la que los alcaloides interactúan con la disponibilidad de agua es diferente a la manera en la que lo hacen los tricomas.

Conclusión

Los resultados mostrados en este trabajo son relevantes ya que representan evidencia empírica para *D. stramonium* de que a una escala geográfica hay una relación entre caracteres defensivos (trichomas foliares, atropina y atropina) y el daño foliar impuesto por herbívoros y de que la interacción planta herbívoro tiene un papel relevante en el moldeado de la variación geográfica observada en el daño impuesto por herbívoros. Aparentemente en *D. stramonium* un solo carácter defensivo no explicaría por sí solo el daño foliar en una población, sino que estos caracteres defensivos están actuando en conjunto y con el ambiente abiótico sobre el nivel de daño que se presenta en una población.

Referencias

- **Abrams, P. A. 2000.** The evolution of predator-prey interactions: Theory and evidence. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 31:79–105.
- **Adams, P. R. 1994.** Geographic Variation in the volatile terpenoides of *Juniperus osteosperma*. *Biochem. Syst. Ecol.* 22(1):65-71.
- **Adler, L. S., M. Wink, M. Distl, y A. J. Lentz. 2006.** Leaf herbivory and nutrients increase nectar alkaloids. *Ecol. Lett.* 960-967.
- **Andraca, G. G. 2009.** Genética de poblaciones comparada entre *Datura stramonium* y su herbívoro especialista *Lema trilineata*. Tesis de maestría. Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.
- **Agrawal, A. A. 1998.** Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science.* 440(279):1201-1202.
- **Agrawal, A. A. 2004.** Resistance and susceptibility of milkweed: competition, root herbivory, and plant genetic variation. *Ecology.* 85:2118-2133.
- **Agrawal, A. A. 2007.** Macroevolution of plant defense strategies. *Trends Ecol. Evol.* 22(2):103-109.
- **Agrawal, A. A. y M. Fishbein. 2006.** Plant defense syndromes. *Ecology.* 87(7):S132-S149.
- **Alves, M. N., A. Sartoratto, y J. R. Trigo. 2007.** Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): Defense, Allocation, Costs and Induced Response. *J. Chem. Ecol.* 33:297-309.
- **Avery, A., S. Satina y J. Rietsma. 1959.** Blakeslee: The genus *Datura*, *Chronica Botánica*, Vol. 20. Ronald Press Co., New York, 289 p.
- **Baldwin, I. T. 1998.** Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8113-8118.

- **Baur, R., S. Binder, G. Benz. 1991.** Nonglandular leaf trichomes as short-term inducible defense of the grey alder, *Alnus incana* (L.), against the chrysomelid beetle, *Oecologia*. 87(2):219-226.
- **Bell, G. Selection. 1997.** The mechanism of Evolution. Oxford University Press UK.
- **Berembaum, M. R. 1983.** Coumarins and caterpillars; a case for coevolution. *Evolution*. 37: 163-179.
- **Berenbaum, M. R., A. R. Zangerl y J. K. Nitao. 1986.** Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* 40:1215–1228.
- **Berembaum, M. R., J. K. Nitao, y A. R. Zangerl. 1991.** Adaptive significance of furanocoumarin diversity in *Pastinaca sativa* (Apiaceae). *J. Chem. Ecol.* 17:207–215.
- **Berenbaum, M. R. y A. R. Zangerl. 1998.** Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 13: 743–748.
- **Berkov, S. y R. Zayed, 2004.** Comparison of tropane alkaloid spectra between *Datura innoxia* grown in Egypt and Bulgaria. *Z. Naturforsch.* 59c: 184-186.
- **Boege, K. 2010.** Induced responses to competition and herbivory in *Tithonia tubaeformis*: Natural selection on multi-trait phenotypic plasticity. *Ecology. En prensa.*
- **Berkov, S., R. Zayed, y T. Doncheva. 2006.** Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 77: 179-182.
- **Betancourt Karinho, E. 2009.** Disyuntiva evolutiva entre la resistencia y la tolerancia a los herbívoros en *Datura stramonium*. Instituto de Ecología, UNAM. Tesis de maestría.

- **Bowers, M. D., y G. Puttick. 1988.** Response of generalist and specialist insects to qualitative and quantitative allelochemical variation. *J. Chem. Ecol.* 14:319–334.
- **Burdon, J. J. 1987.** *Diseases and Plant Population Biology.* Cambridge University Press. UK.
- **Björkm Uan, C., Anderson D. B. 1990.** Trade-off among antiherbivore defences in a South American blackberry (*Rubus bogotensis*). *Oecologia.* 85(2): 247-249.
- **Cabrales, V.R. 1991.** Demografía e historia natural de *Datura stramonium L.* en el Pedregal de San Ángel con algunas implicaciones evolutivas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- **Chalcoff, V. R., E. Ezcurra y Aizen, M. A. 2008.** Uncoupled Geographical Variation between Leaves and Flowers in a South-Andean Proteaceae. *Ann. Bot.* 102(1):79-91.
- **Conklin, M. 1976.** Genetic and biochemical aspects of the development of development of *Datura*. Monographs in developmental biology. Vol. 12. E.U.A.
- **Cordell, G.A. 1981.** Alkaloids derived from ornitine. En: Introduction to Alkaloids. A Biogenetic approach. John Wiley & Sons, New York, pp. 80-137.
- **Cumplido, H. J. 2008.** Ecología de la interacción tritrófica *Datura stramonium-Trichobaris sp.-parasitoides*. Instituto de ecología, UNAM. Tesis de maestría.
- **Dräger, B. 2002.** Analysis of tropane and related alkaloids. *J. Chromatogr.* 978: 1-35.
- **Duffey, S. S. y M.B. Isman. 1981.** Inhibition of insect larval growth by phenolics in glandular trichomes of tomato leaves. *Experientia* 37: 574±576.
- **Ehrlich, P. R. y P. H. Raven. 1964.** Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.

- **Alexander, J. D. Benford, A. Cockburn, J.P. Cravedi, E. Dogliotti, A. Di-Domenico, M. L. Fernández-Cruz, P.Fürst, J. Fink-Gremmels, C. Lodovico-Galli, P. Grandjean, J. Gzyl, G. Heinemeyer, N. Johansson, A. Mutti, J. Schlatter, R. van Leeuwen, C. Van Peteghem y Philippe Verger. 2008.** Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal* 691:1-55.
- **Elle, E. y J. D. Hare. 2000.** No benefit of glandular trichome production in natural populations of *Datura wrightii*. *Oecologia*. 123(1):57-65.
- **Elle, E., Nicole, M. van Dam., Hare J. D. 1999.** Cost of Glandular Trichomes, A "Resistance" Character in *Datura wrightii* Regel (Solanaceae). *Evolution*, 53(1):22-35.
- **Fornoni, J. y J. Núñez-Farfán. 2000.** Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: genetic variation and costs for tolerance to defoliation. *Evolution* 54(3): 789-797.
- **Fornoni, P. L. Valverde y J. Núñez-Farfán. 2003.** Evolutionary ecology of tolerance to herbivory: advances and perspectives. *Comments Theor. Biol.* 8: 643–663.
- **Fornoni, J., J. Núñez-Farfán, P. L. Valverde, y M. D. Rausher. 2004a.** Evolution of mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution*. 58(8): 1685-1695.
- **Fornoni, J., P. L. Valverde and J. Núñez-Farfán. 2004b.** Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. *Evolution*. 58: 1696-1704.
- **Friedman, M. y C. E. Levin. 1989.** Composition of Jimson Weed (*Datura stramonium*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 37:998-1005.
- **Garrido E. y J. Fornoni, 2006.** Host tolerance does not impose selection on natural enemies. *New Phytol.* 170: 609-614

- **Geber, M.A. y L.R. Griffen. 2003.** Inheritance and natural selection in functional traits. *Int. J. Plant Sci.* 164(3):S21–S42.
- **Gomulkiewicz, R., Drown D.M., Dybdahl, M, F., Nuismer, S, L., Pepin, K, M., Ridenour, B, J., Smith, C, I., y J. B. Yoder. 2007.** Dos and don'ts of testing the geographic mosaic theory of coevolution. *Heredity* 98: 249-258.
- **Gottlieb, O. R. 1990.** Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry.* 29:1715-1724.
- **Hartmann, T. y B. Dierich. 1998.** Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* 206: 443±451.
- **Hanifin, C.T., Brodie, E.D. Jr y Brodie, E.D. III 2008.** Phenotypic Mismatches Reveal Escape from Arms-Race Coevolution. *PLoS Biol.* 6: e60.
- **Humphrey, A.J. y D. O'Hagan, 2001.** Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved. *Nat. Prod. Rep.* 18(55):494-502.
- **Hijmans, R. J., S. Cameron, J: Parra, P.Jones, A. Jarvisy K. Richardson. 2006.** Worldclim versión 1.4. Museum of Vertebrates Zoology of the University of California, CIAT, and Rainforest CRC. <http://www.worldclim.org/>.
- **Hochberg, M. E. y Van Baalen. 1998.** Antagonistic coevolution along environmental gradients. *Am. Nat.* 152:620-634.
- **Janzen, D. H. 1980.** When is it Coevolution? *Evolution.* 34:611-612.
- **Jones, C. G., y Finn R. D. 1991.** On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Phil. Tans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 333:273-280.
- **Kaltz, O., S. Gandon, Y. Michalakis, y J. A. Shykoff. 1999.** Local maladaptation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* to its host plant *Silene latifolia*: Evidence from a cross inoculation experiment. *Evolution.* 53:395–407.

- **Kennedy, G.G. y C.F. Sorenson, 1985.** Role of glandular trichomes in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 78:547-551.
- **Karban, R. and I. T. Baldwin. 1997.** *Induced Responses to Herbivory.* University of Chicago Press. E.U.A.
- **Karban, R., A. A. Agrawal, J. S. Thaler, y L. S. Adler. 1999.** Induced plant responses and information content about risk of herbivory. *Trends Ecol. Evol.* 14:443-447.
- **Kliebenstein, D., D. Pedersen, B. Barker y T. Mitchell-Olds . 2002.** Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 161: 325–332.
- **Kogan, M. & R.D. Goeden, 1970.** The biology of *Lema trilineata* daturaphyla (Coleoptera: Chrysomelidae) with notes on efficiency of food utilization by larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63:537-546.
- **Kokkini, S., R. Karosou, y D. Vokou. 1994.** Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Byochem. Syst Ecol.* 22(5):517-528.
- **Kursinszki, L., Hank, H., László, I. and Szóke, É. 2005.** Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and atropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1091:32-39.
- La Spina, S., J. Gregoire, P. Mertens, y D. Charles. 2010. **Impact of poplar water status on leaf-beetle (*Chrysomela populi*) survival and feeding.** *Ann. For. Sci.* 67(209):1-9.
- **Lande, R. y S. J. Arnold. 1983.** The measurement of natural selection on correlated characters. *Evolution* 37: 1210-1226.

- **Lankau, A. R. 2007.** Specialist and generalist herbivores exert opposing selection on a chemical defense. *New phytol.* 175: 176–184.
- **Leete, E. 1989.** 1-Methylpyrrolidine-2-acetic acid, a plausible intermediate in the biosynthesis of cocaine. *Heterocycles* 28(1): 481-488.
- **Leimu, R. y J. Koricheva. 2006.** A meta-analysis of trade offs between plant tolerance and resistance to herbivores: combining the evidence from ecological and agricultural studies. *Oikos.* 112:1-9.
- **Levin, D. A. 1973.** The role of trichomes in plant defense. *Quart. Rev. Biol.* 48:3-15.
- **Levin, D. A. y York, 1978.** The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochem. Syst. Ecol.* 6:61-78.
- **Lively, C.M, Dybdahl, M.F, Jokela, J. Osnas, E.E, y L.E. Delph. 2004.** Host sex and local adaptation by parasites in a snail-trematode interaction. *Am. Nat.* 164:6–18.
- **Loe, G., P. Torang, M. Gaudeul y J. Agren. 2007.** Trichome production and spatiotemporal variation in herbivory in the perennial herb *Arabidopsis Lyrata*. *Oikos* 116: 134 142.
- **López-Pascua, L.D.C. y A. Buckling. 2008.** Increasing productivity accelerates host-parasite co-evolution, *J. Evol. Biol.* 21: 853-860.
- **Lounasmaa, M. y T. Tamminen. 1993.** The tropane alkaloids. Pp. 1–113 in G. A. Cordell, ed. *The alkaloids.* Vol. 44. Academic Press, New York. E.U.A.
- **Mauricio, R., M. D. Rausher y D. S. Burdick. 1997.** Variation in defense strategies in plants: Are resistance and tolerance mutually exclusive?. *Ecology.* 78:1301-1311.
- **Mauricio, R., 2000.** Natural selection and the joint evolution of tolerance and resistance as plant defenses. *Evol. Ecol.* 14:491-507.

- **Marquis, R.J. 1992.** Evolution of resistance in plants to herbivores. *Evol. Trend. Plant.* 5:23-29.
- **Martín-Gálvez, D., Soler, M., Soler, J. J., Martín Vivaldi, Palomino, J. J. 2005.** Food acquisition by common cuckoo chicks in rufous bush robin nests and the advantage of eviction behaviour. *Anim. Behav.* 70: 1313-1321.
- **Müller-Schärer, H. Schaffner, U. Steinger, T. 2004.** Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trend. Ecol. Evol.* 19: 417–422.
- **Motten A. F, y J. Antonovics. 1992.** Determinants of outcrossing rate in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 79: 419–427.
- **Núñez-Farfán, J. 1991.** Biología vegetal de *Datura stramonium* L. en el Centro de México: selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruzamiento y variación genética intra e interpoblacional. Tesis de Doctorado. UNAM.
- **Núñez-Farfán, J. y R. Dirzo. 1994.** Evolutionary ecology of *Datura stramonium* L. in Central Mexico: natural selection of resistance to herbivorous insects. *Evolution* 42: 432-436.
- **Núñez-Farfán, J., J. Fornoni y P. L. Valverde, 2007.** The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38:541-54.
- **Oliver, J. E. 2005.** Enciclopedia of world climatology. Ed, Springer. E.U.A.
- **Okamoto, M. 1988.** Interactions between *Camellia japonica* and its seed predator *Curculio camelliae*. Observations on morphology, phenology and oviposition behaviors in Kinki District, Japan. *Bull Osaka Muse Natur Hist*, 43:15-37.
- **Paul, V. J., y M. E. Hay. 1986.** Seaweed susceptibility to herbivory: chemical and morphological correlates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33:255-264.

- **Papadoyannis, I. N., V.F., Samanidou, G.A., Theodoridis, G.S., Vasilikiotis, M.J.G. Van Kempen, y M.G., Beelen, 1993.** A simple and quick solid-phase extraction and reversed phase HPLC analysis of some tropane alkaloids in feedstuffs and biological samples. *J. Liquid Chromatogr.* 16:975-998.
- **Parr, A., J. Payne, J. Eagles, B. Chapman, R. Robins y M. Rhodes. 1990.** Variation in tropane alkaloid accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. *Phytochemistry* 29:2545–2550.
- **Peterson, B.L. y G.P., Dively. 1981.** Effects of feeding by *Lemnatrivittata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on the growth, reproduction and competitive ability of jimsonweed in soybeans. *Proc. Northeast. Weed Sci. Soc.* 35:78.
- **Font Quer, P. 1982.** *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España.
- **Rausher, M. D. 2001.** Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411: 857- 864.
- **Robins, R., y N. Walton. 1993.** The biosynthesis of tropane alkaloids. Pp. 115–187 en G. A. Cordell, ed. *The alkaloids*. Vol. 44. Academic Press, New York. E.U.A.
- **Roddick, J. 1991.** The importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy. Pp. 7–23 en J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee, and N. Estrada, eds. *Solanaceae. III. Taxonomy, chemistry, evolution*. Royal Botanic Garden Press, Kew, U.K.
- **Rodriguez, E., Healy, P.L. y Mehta I. 1984.** *Biology and chemistry of plant trichomes*. Plenum, Nueva York. E.U.A.
- **Rosenthal, J. P. y P.M. Kotanen. 1994.** Terrestrial plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.* 9: 145-148.

- **Roy B. A., Stanton, M. L., Eppley S. M. 1999.** Effects of environmental stress on leaf hair density and consequences for selection. *J. Evol. Biol.* 12:1089-1103.
- **SAS Institute Inc. 2008.** JMP version 8. SAS Publishing. North Carolina, USA.
- **Seigler, D. y P.T. Price. 1976.** Secondary Compounds in Plants: Primary Functions. *Am. Nat.* 110(971):101-105
- **Schaller, A. 2008.** Induced plant resistance to herbivory. Springer. New York. E.U.A.
- **Shonle, I. y J. Bergelson. 2000.** Evolutionary of the tropane alkaloidsof *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54: 778-788.
- **Simms, E. L. y J. Triplett. 1987.** Costs and Benefits of Plant Responses to Disease: Resistance and tolerance. *Evolution.* 40: 1215-1228
- **Stowe, K. A., R. J. Marquis, C. G. Hochwender, y E. L. Simms. 2000.** The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 31:565-595.
- **Thurston, R. 1970.** Toxicity of trichome exudates of *Nicotiana* and *Petunia* species to tobacco hornworm larvae. *J. Econ. Entomol.* 63:272-274.
- **Toju, H, y T, Sota. 2006.** Imbalance of predator and prey armament geographic clines in phenotypic interface and natural selection. *Am. Nat.* 167:105–117.
- **Thompson, J. N. 1999a.** Specific hypothesis on the geographic mosaic of Coevolution. *Am. Nat.* 153: S1-S14. Chicago, Il., E.U.A.
- **Thompson, J. N. 1999b.** *The coevolutionary process.* University of Chicago Press. Il., EU.A.
- **Thompson, J. N. 2005.** *The Geographic Mosaic of Coevolution.* University of Chicago Press, Chicago, Il., E.U.A.

- **Valverde, P. L., J. Fornoni y J. Núñez-Farfán. 2001.** Defensive role of leaf trichome in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *J. Evol. Biol.* 14: 424-432.
- **Van Dam, N. M., Hare, J.D., Elle, E. 1990.** Inheritance and distribution of trichome phenotypes in *Datura wrightii*. *J. Hered.* 90(1):220-227.
- **van der Meijden E. 1996.** Plant defense, an evolutionary dilemma: contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomol. Exp. Appl.* 90: 307–310.
- **Vokou, D., Kokkini, S. y Bessiere, J. M. 1993.** Geographic Variation of greek Oegano (*Origanum vulgare*, ssp. *Hirtum*) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.* 21(2):287-295.
- **Wagner G. J. 1991.** Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiol.* 96:675-679.
- **Weaver, S.E. y S.I. Warwick, 1984.** The biology of Canadian weeds. *Datura stramonium* L. *Can. J. Plant Sci.* 64:979-991.
- **Wilkens, R.T., G.O., Shea, S. Halbreich, y N.E. Stamp, 1996.** Resource availability and the trichomes defenses of tomato plants. *Oecologia* 106:181-191.
- **Wittstock U, N. Agerbirk, E. J. Stauber, C. E. Olsen, M. Hippler. 2004** Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101: 4859–4864.
- **Zangerl, A. R., y M. R. Berenbaum. 2003.** Phenotype matching in wild parsnip and parsnip webworms: causes and consequences. *Evolution* 57:806–815.

Anexo 1. Tipo de vegetación, latitud, longitud, altitud así como promedios poblacionales de la proporción de daño foliar, densidad de tricomas, concentración de atropina, de escopolamina y número de ramas de 29 poblaciones de *D. stramonium* colectadas en septiembre y octubre de 2007. MX= Matorral Xerófilo, SBC= Selva Baja caducifolia, BPE= Bosque de Pino-Encino.

| Población | Tipo de vegetación | Latitud | Longitud | Altitud (msnm) | Daño foliar | Tricomas (2.5×mm ²) | Atropina (mg/g) | Escopolamina (mg/g) | No. De Ramas |
|---------------------|--------------------|---------|----------|----------------|-------------|---------------------------------|-----------------|---------------------|--------------|
| 1.- Acatzingo | MX | -97.78 | 19.32 | 2160 | 0.19 | 9.00 | 0.296 | 0.159 | 18.43 |
| 2.- Actopan | MX | -98.94 | 20.29 | 2520 | 0.28 | 6.46 | 0.300 | 0.404 | 15.20 |
| 3.- Ajacuba | MX | -99.11 | 20.08 | 2180 | 0.37 | 9.61 | 0.090 | 0.316 | 27.47 |
| 4.- Atlixco | MX | -98.42 | 18.98 | 1840 | 0.26 | 9.48 | 0.665 | 0.611 | 13.97 |
| 5.- Cd. Hidalgo | BPE | -100.55 | 19.7 | 2000 | 0.04 | 5.96 | 0.428 | 1.501 | 4.70 |
| 6.- Coatepec | BPE | -96.96 | 19.45 | 2000 | 0.10 | 4.39 | 0.085 | 0.564 | 13.95 |
| 7.- Esperanza | MX | -97.37 | 18.85 | 2278 | 0.28 | 7.29 | 0.477 | 0.331 | 15.90 |
| 8.- Huitzucó | SBC | -99.08 | 18.49 | 1944 | 0.12 | 7.22 | 0.902 | 0.324 | 11.88 |
| 9.- Ixmiquilpan | MX | -99.21 | 20.48 | 1700 | 0.09 | 9.58 | 0.618 | 1.755 | 12.26 |
| 10.- Janitzio | BPE | 101.6 | 19.51 | 2140 | 0.11 | 7.64 | 0.249 | 2.449 | 4.93 |
| 11.- Morelia | BPE | -101.19 | 19.7 | 1951 | 0.24 | 4.78 | 0.632 | 0.896 | 4.93 |
| 12.- Moreleón | SBC | -101.31 | 20.03 | 1808 | 0.20 | 5.58 | 0.620 | 0.236 | 6.60 |
| 13.- Omitlán | BPE | -98.64 | 20.16 | 1900 | 0.08 | 10.68 | 0.282 | 1.801 | 6.20 |
| 14.-Patria Nueva | MX | -98.96 | 20.38 | 2040 | 0.14 | 9.90 | 0.255 | 0.390 | 19.23 |
| 15.- Polotitlán | MX | -99.64 | 20.11 | 2350 | 0.20 | 5.36 | 0.476 | 0.307 | 25.43 |
| 16.- Taxco | SBC | -99.66 | 18.5 | 1582 | 0.32 | 8.32 | 0.826 | 0.146 | 15.40 |
| 17.- Teotihuacán | MX | -98.86 | 19.68 | 2294 | 0.43 | 8.73 | 0.437 | 0.354 | 24.13 |
| 18.- Tequexquitta | SBC | -97.65 | 19.31 | 1320 | 0.24 | 10.10 | 0.512 | 0.883 | 17.91 |
| 19.- Ticumán | SBC | -99.2 | 18.86 | 1210 | 0.36 | 7.12 | 0.843 | 2.060 | 10.10 |
| 20.- Tixtla | SBC | -99 | 17.5 | 1735 | 0.06 | 5.77 | 0.527 | 0.846 | 13.17 |
| 21.- Tlaxiaca | MX | -98.86 | 20.08 | 2340 | 0.09 | 9.37 | 0.289 | 0.458 | 17.19 |
| 22.- Tula | MX | -99.35 | 20.05 | 2020 | 0.32 | 6.30 | 2.373 | 2.134 | 21.37 |
| 23.- Tzin Tzun Tzan | BPE | -101.58 | 19.63 | 2050 | 0.48 | 4.28 | 0.935 | 1.532 | 3.37 |
| 24.- Valsequillo | MX | -98.11 | 18.91 | 2209 | 0.31 | 6.10 | 1.768 | 0.045 | 21.67 |
| 25.- Xalapa | BPE | -96.91 | 19.53 | 1200 | 0.14 | 4.77 | 2.045 | 2.024 | 6.60 |
| 26.- Xochipala | SBC | -99.24 | 17.18 | 945 | 0.43 | 8.44 | 2.422 | 0.275 | 11.79 |
| 27.- Zacatlán | MX | -97.85 | 19.83 | 2059 | 0.15 | 6.80 | 1.915 | 0.333 | 11.47 |
| 28.- Zirahuén | BPE | -101.91 | 19.43 | 2174 | 0.24 | 4.91 | 0.619 | 1.968 | 2.63 |