



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

**Estudio de los cambios evolutivos en
la resistencia contra la herbivoría
en una población natural de la planta anual
Datura stramonium, y sus consecuencias
para el herbívoro.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

Carlos Eduardo Bustos Segura

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli

COMITÉ TUTOR: Dr. Constantino Macías García
Dr. José Jaime Zúñiga Vega

MÉXICO, D.F.

Mayo, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

**Estudio de los cambios evolutivos en
la resistencia contra la herbivoría
en una población natural de la planta anual
Datura stramonium, y sus consecuencias
para el herbívoro.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

Carlos Eduardo Bustos Segura

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli

**COMITÉ TUTOR: Dr. Constantino Macías García
Dr. José Jaime Zúñiga Vega**

MÉXICO, D.F.

Mayo, 2011



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 28 de febrero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **BUSTOS SEGURA CARLOS EDUARDO** con número de cuenta **99033880** con la tesis titulada "**Estudio de los cambios evolutivos en la resistencia contra la herbivoría en una población natural de la planta anual *Datura stramonium*, y sus consecuencias para el herbívoro.**", realizada bajo la dirección del **DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI**:

Presidente: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
Vocal: DRA. KARINA BOEGE PARÉ
Secretario: DR. CONSTANTINO DE JESÚS MACÍAS GARCÍA
Suplente: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
Suplente: DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de mayo de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. A la beca otorgada por CONACYT para la realización de mi posgrado, sin la cual no hubieran sido posibles mis estudios. Al financiamiento otorgado por CONACYT para el proyecto de investigación 89872.

A Juan por ser un ejemplo de lo que debe ser un investigador y un maestro, por abrir mi perspectiva de lo que es la ecología evolutiva y por todo el tiempo que me ha dedicado, ¡muchas gracias!

A los miembros del Comité Tutoral: Jaime Zúñiga y Constantino Macías, sus aportaciones han sido claves para el desarrollo de mis estudios.

A Karina Boege y Ek del Val por su valiosa ayuda en la elaboración del escrito.

A Juan Núñez por sus útiles comentarios acerca del escrito y por habernos facilitado las semillas de sus colectas.

A Rubén Pérez Ishiwara por su asistencia técnica y logística.

A Etzel y Luz por la invaluable ayuda durante los experimentos.

A Marta Macías y a los miembros del Laboratorio de Alelopatía, por toda la ayuda en la obtención de extractos de hojas y análisis de los resultados de cromatografía.

A Norma Macías de la Facultad de Química; a Georgina Duarte y Margarita Guzmán, de la USAI de la Facultad de Química, por los análisis de Cromatografía de Gases y por toda la asesoría recibida.

A Alejandro Zaldívar por su ayuda en la identificación del parasitoide de huevo de *Lema trilineata*.

A Ileana, por su ayuda en experimentos, discusiones y consejos, por soportarme todos estos años sin desesperarse, por aguantarme todo el tiempo que estaba en el insectario, por ser comprensiva y ser una persona dispuesta a cualquier reto.

A los miembros del Laboratorio Interacción Planta-Animal: al Dr. César Domínguez, Diego, Jonathan, Lupita, Blanca, Angélica, Sergio, Jessica, Violeta, Paula, Santiago, Fernanda, Miguel, Verónica, Mariana, Corina, Ana, Sofía, Nora, Betza, Lluvia, Lislíe, Ixchel, a todos gracias por el apoyo, las pláticas y consejos.

A mi familia, por todo el amor y apoyo, a pesar de no habernos visto como quisiéramos: mamá, Sonia, Katy, Tere, Cata, Giova, Moni, July, Emi, Taz, Sebas, papá, Jorge, Paty, Lorena, a la familia Chávez... gracias a todos por que me siento muy feliz de poder estar con ustedes durante toda la vida!

A mis amigos, por ser también mi familia: Diego, Martín, Mariana, Ángela, Dalia, Pozo, Bruno, Karo, Christian, Liber, Ranas, Monse, Berta, Jess, Germán, Linda, Lail, Mar, Euges, Pili, Memo, Mariana, Irene, Diana, Daniel, Diez y a la banda del CineClup, por los ratos chidos que pasamos y por todo el aprendizaje que hemos tenido juntos, mi vida es mucho mejor con ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	9
Modelos de evolución hospedero-herbívoro.....	9
Métodos de estudio de la selección natural.....	11
Sistema de estudio.....	16
OBJETIVOS.....	22
HIPÓTESIS.....	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Experimento de resurrección.....	24
Experimentos de defensas vegetales.....	28
RESULTADOS.....	34
Experimento de resurrección.....	34
Experimentos de defensas vegetales.....	38
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	61
LITERATURA CITADA.....	63
ANEXO.....	72

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron los posibles cambios evolutivos relacionados con la defensa contra la herbivoría en la planta anual *Datura stramonium* en un lapso de 20 años. Se comparó el desempeño del herbívoro especialista *Lema trilineata* al ser alimentado con plantas de la subpoblación ancestral, derivada de colectas de semillas, o con la subpoblación actual del hospedero, así como las diferencias en atributos de defensa vegetal entre las dos subpoblaciones.

Los insectos alimentados con plantas de la subpoblación ancestral mostraron un mejor desempeño que aquellos alimentados con la subpoblación descendiente. El contenido de agua en hojas fue mayor en la subpoblación ancestral, aunque la densidad foliar de tricomas y la abundancia de alcaloides tropánicos no fueron distintas. Además se exploró si los alcaloides tropánicos tienen un efecto negativo sobre el herbívoro. En un bioensayo con el herbívoro, se comparó su desempeño bajo diferentes concentraciones de alcaloides. Sólo la dieta con escopolamina 4x y la mezcla de atropina+escopolamina 2x fueron efectivas reduciendo la supervivencia del herbívoro, pero no afectaron otro atributo de historia de vida del insecto, ni el consumo de área foliar. Esto demuestra que la escopolamina, derivado de la atropina, afecta más al herbívoro especialista que el alcaloide predecesor (atropina).

Los resultados demuestran que hubo un cambio evolutivo en la población de *D. stramonium* en un lapso de 20 años. Dicho cambio afecta negativamente el desempeño del herbívoro especialista *L. trilineata*, lo cual sugiere que está relacionado a la defensa contra la herbivoría. Es posible que la reducción en el contenido de agua en hojas, junto con otros componentes de su calidad nutricional hayan afectado

negativamente al herbívoro. La ausencia de un cambio en la abundancia de alcaloides es consistente con la baja efectividad de estos compuestos sobre el herbívoro. Con este trabajo se plantea la creación y uso de colectas ancestrales para el estudio de los cambios evolutivos relacionados con las interacciones ecológicas en poblaciones naturales.

ABSTRACT

I explored the possible evolutionary changes related with the defense against herbivores in the annual plant *Datura stramonium* through a 20 years lapse time. The specialist herbivore *Lema trilineata* was feed with plants from ancestral or present plant subpopulation, and its performance was compared between diet regimes. Also, the differences of plant defense traits were analyzed between plant subpopulations. The insects reared on plants from ancestral subpopulation showed a higher performance than those reared on descendant subpopulation plants. The foliar water content was higher in the ancestral plant subpopulation, but foliar trichome density and alkaloid abundance were not different between subpopulations.

The effect of tropane alkaloids on the herbivore was also tested. In a bioessay with the herbivore, its performance with different alkaloid concentrations was compared. Only scopolamine 4x and scopolamine+atropine mix 2x diets were effective reducing the herbivore survival, but neither the other life history traits, nor the foliar consumption was affected by increasing alkaloids concentration. This confirms that scopolamine, an alkaloid derived from atropine, affects more the specialist herbivore than the predecessor alkaloid (atropine).

The results show that there was an evolutionary change in *the D. stramonium* population in a 20 years lapse time. Such a change affects negatively the herbivore performance, suggesting that it is related with the defense against herbivory. It is possible that the reduction in leaf water content, together with other components of its nutritional quality had affected the herbivore negatively. The absence of change in alkaloid abundance is consistent with the low effect of these compounds on the

herbivore. With this study it is proposed the creation and use of ancestral seed collections to study evolutionary changes related with ecological interactions in natural populations.

INTRODUCCIÓN

Los organismos presentan adaptaciones tanto al medio abiótico como biótico, este último representado por las interacciones entre los seres vivos. Se considera que las interacciones determinan en gran medida la evolución de una población y que ésta afectaría de igual manera la evolución de las poblaciones interactuantes. Por ello los patrones de distribución y diversificación de especies podrían ser explicados a través de las dinámicas evolutivas entre poblaciones interactuantes. Todas las especies están involucradas en interacciones antagonistas, en las que el beneficio para una población representa un perjuicio para la otra población interactuante. Así, la forma en la que las poblaciones han respondido a las presiones selectivas de sus antagonistas se ve reflejada en una enorme diversidad de características de defensa o ataque, ya sea de tipo químico, fisiológico, morfológico o conductual.

El sistema antagonista planta-herbívoro ha sido recurrentemente utilizado para proponer y defender modelos evolutivos (Bergelson, Dwyer, y Emerson, 2001). El hecho de que este sistema sea tan estudiado se entiende porque se considera que esta interacción ha sido uno de los mayores promotores de diversificación en plantas y animales (Rausher, 2001; Ehrlich y Raven, 1964). En particular es en el estudio de la interacción de la herbivoría en el que surgió el concepto de coevolución (Ehrlich y Raven, 1964) y de él se ha obtenido información relevante para la teoría del mosaico geográfico coevolutivo (Thompson, 2005).

El concepto de coevolución aceptado hasta ahora (Janzen, 1980) es extensivo a todos los tipos de interacciones. Éste consiste en que los cambios en los atributos de una población relacionados con la interacción provocan cambios en los atributos de la

población interactuante y estos últimos influyen los cambios en los atributos de la primera población. Dadas las características de esta definición, ha sido una tarea difícil demostrar empíricamente que en un sistema biológico esté ocurriendo este proceso. Sin embargo, la evidencia apunta a que generalmente se presentan las condiciones para que ocurra este proceso, y que los patrones observados entre los caracteres de poblaciones interactuantes coinciden con una dinámica coevolutiva (Futuyma y Slatkin, 1983; Thompson, 1994).

En general se apoya la existencia de procesos coevolutivos por la correspondencia entre funciones de especies interactuantes y sus variaciones a escala geográfica (Berenbaum y Zangler, 1998; Geffney et al. 2002; Thompson y Cunningham, 2002). Además algunos trabajos filogenéticos han tratado de relacionar la divergencia paralela entre especies interactuantes (Winkler y Mitter, 2008; Winkler, Mitter, y Scheffer, 2009) o el tiempo de aparición de adaptaciones y contradaptaciones (Becerra, 2003). Un primer paso debe ser comprobar que la coevolución esté operando en las poblaciones naturales, y si lo observado en estas poblaciones se ajusta a los modelos de coevolución propuestos. También es preciso explorar cómo la coevolución a nivel poblacional puede ser un complemento para explicar los patrones macroevolutivos.

A pesar de que las plantas y los herbívoros parecen haberse diversificado a consecuencia de la interacción (Winkler y Mitter, 2008; Winkler, Mitter, y Scheffer, 2009), quedan muchas preguntas por responder (Futuyma y Agrawal, 2009). Por ejemplo, no se ha podido determinar hasta qué grado la influencia de un interactuante promueve la evolución de su contraparte, o separarla de otras variables ambientales.

Si bien ha sido generalmente aceptado que los hospederos pueden promover la adaptación de los herbívoros y que las plantas poseen atributos defensivos con valor adaptativo, no se ha comprobado cómo son las respuestas evolutivas de las plantas a las presiones de sus herbívoros en poblaciones naturales (Jermy, 1984; Bergelson, Dwyer, y Emerson, 2001; pero véase Berenbaum y Zangler, 1998). La falta de evidencia empírica se debe principalmente a la ausencia de hipótesis relacionadas con la teoría coevolutiva que sean evaluables experimentalmente. Anteriormente se ha hecho uso de estudios filogenéticos para intuir cuál fue el proceso que derivó en los patrones actuales (Becerra, 1997), y de análisis de selección para estudiar las características actuales de las poblaciones y predecir su posible evolución (Mauricio y Rausher, 1997). Pero en medio de esas dos perspectivas (la inferencia y la predicción) carecemos señaladamente de evidencia de que el proceso en sí mismo esté ocurriendo a lo largo del tiempo, lo cual nos ayudaría a mejorar nuestro entendimiento de las dinámicas evolutivas.

En el presente trabajo investigamos los posibles cambios evolutivos en la resistencia contra la herbivoría de la planta anual *Datura stramonium* usando como referencia a su insecto especialista *Lema trilineata*. Haciendo uso de una metodología novedosa se comparó, bajo las mismas condiciones, las diferencias entre dos subpoblaciones del hospedero provenientes de colectas separadas por un lapso de veinte años, lo que nos permitió establecer que las diferencias observadas se deben a cambios en la información genética de la población. Realizando un bioensayo con el insecto pudimos evaluar si existía variación genética en los atributos del herbívoro, lo que nos confirmaría su potencial respuesta a los cambios en el hospedero. Además

evaluamos cuáles eran los atributos de defensa del hospedero relacionados con las diferencias observadas entre subpoblaciones, así como el efecto de las defensas químicas del hospedero sobre su herbívoro especialista.

En el caso del sistema *D. stramonium* – *L. trilineata* todas las condiciones para que ocurra un proceso coevolutivo (Berenbaum y Zangler, 1992) han sido documentadas mediante trabajos experimentales. Se sabe que existe variación genética en los niveles de resistencia frente a la herbivoría (Valverde, Fornoni, y Núñez-Farfán, 2003), en particular a la resistencia a *L. trilineata* (Carmona y Fornoni, datos no publicados); que la variación en la resistencia tiene consecuencias en la adecuación de la planta medida como producción de semillas (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Fornoni y Núñez-Farfán, 2000; Valverde, Fornoni, y Núñez-Farfán, 2003); que los herbívoros responden diferencialmente a los niveles de resistencia de la planta (Espinosa y Fornoni, 2006), y que esta respuesta tiene bases genéticas y consecuencias para su adecuación medida como supervivencia (Espinosa y Fornoni, 2006). Por ello podemos esperar que en este sistema esté ocurriendo una dinámica coevolutiva cuyo resultado pueda ser observado comparando subpoblaciones del hospedero separadas en el tiempo.

ANTECEDENTES

Modelos de evolución hospedero-herbívoro

Las plantas mantienen estrategias de defensa que les permiten contrarrestar los efectos perjudiciales que tienen los herbívoros sobre ellas (Núñez-Farfán, Fornoni, y Valverde, 2007). Estas estrategias se clasifican básicamente en dos: la resistencia que disminuye el daño provocado por los herbívoros, y la tolerancia que disminuye el efecto negativo del daño ya producido (Painter, 1958; Fineblum y Rausher, 1995; Fornoni y Núñez-Farfán, 2000; Fornoni et al., 2003). Al parecer ambas estrategias podrían estar actuando de manera conjunta, manteniendo las dos niveles intermedios (Fornoni et al., 2004). Sin embargo, es posible que bajo ciertos escenarios se favorezca el incremento de una u otra estrategia ya que sus consecuencias para la interacción serán opuestas (Strauss y Agrawal, 1999). Mientras que la resistencia ejerce un efecto negativo sobre los herbívoros, la tolerancia no ejerce selección sobre ellos (Espinosa y Fornoni, 2006). Además, el papel de la tolerancia en la evolución de la interacción aún no ha sido esclarecido (Weis y Franks, 2006).

La resistencia de las plantas afecta directamente el desempeño de los herbívoros por lo que éstos han desarrollado estrategias de contradefensa que disminuyen el efecto de la resistencia vegetal (Després, David, y Gallet, 2007). Estas contradefensas son igual de variadas que las defensas que combaten. Pueden ser enzimas que detoxifican o secuestran los metabolitos secundarios (Hartmann et al., 2005; Ehmke et al., 1999) o mutaciones en el receptor blanco que evitan la unión con una toxina (Holzinger & Wink, 1996). También pueden ser de tipo conductual con lo que los herbívoros evaden las plantas muy resistentes (Chapman, 2003) o los

caracteres defensivos como los tricomas (Agrawal y Fishbein, 2006) y resinas (Becerra, 1994).

En el caso de que los herbívoros se adapten a la resistencia de su hospedero, las plantas pueden ser seleccionadas, aumentando los niveles de defensa (i.e. concentración de metabolitos secundarios o densidad de tricomas) o generando defensas novedosas (Bergelson, Dwyer, y Emerson, 2001). Si los herbívoros continúan adaptándose a los cambios en las defensas del hospedero estamos hablando de un ciclo de retroalimentación positivo en el que los caracteres de defensa vegetal producen cambios en los caracteres de contradefensa de los herbívoros y esto a su vez produce incrementos en las defensas del hospedero. A este ciclo se le ha denominado “carrera armamentista” haciendo la analogía con la avanzada militar recíproca durante la guerra fría (Dawkins y Krebs, 1979).

Alternativamente a una carrera armamentista lineal pueden ocurrir ciclos fluctuantes en los que la adaptación de los antagonistas evoluciona en respuesta a los cambios en las frecuencias de los genotipos del hospedero. Este modelo llamado Dinámica de Selección Fluctuante, a diferencia de la carrera armamentista se caracteriza por presentar selección dependiente de la frecuencia (Gandon et al., 2008). Debido a la adaptación de los parásitos a los genotipos comunes del hospedero, los genotipos raros son los mejor defendidos, hasta que éstos aumentan en frecuencia. Los parásitos se adaptan posteriormente a los genotipos ahora comunes y de nuevo los más raros se encuentran mejor defendidos. Estos dos modelos de coevolución explican la adaptación recíproca a nivel poblacional. En ambos modelos se predeciría que los herbívoros actuales tendrían mejor desempeño en los hospederos ancestrales

y que los hospederos actuales estarían mejor defendidos que los ancestrales, dentro de una escala de tiempo relativamente corta.

Métodos de estudio de la selección natural

Se han usado diversas perspectivas para estudiar los procesos evolutivos relacionados con eventos selectivos. Con el estudio de atributos con variación genética se puede estimar cuál es su influencia sobre la adecuación en una población y por lo tanto las presiones selectivas a las que está sometida. Alrededor de esta idea se ha desarrollado una poderosa metodología estadística que permite separar los componentes más importantes en la selección y con base en eso hacer predicciones de cómo cambiaría una población si las condiciones observadas se mantuvieran estables a lo largo del tiempo (Brodie, Moore, y Janzen, 1995). Para ello se pueden diseñar experimentos con los que se exploran los gradientes selectivos en la población (Lande y Arnold, 1983) y representar superficies selectivas en la interacción de dos o más caracteres sujetos a selección (Phillips y Arnold, 1989). Estos estudios son muy útiles para conocer de forma precisa cómo está actuando la selección sobre atributos específicos en poblaciones naturales en un momento dado. Sin embargo, no es posible tomar en cuenta todas las limitaciones para la evolución de un atributo, ya sea por costos en adecuación, restricciones genéticas o compromisos con atributos no estudiados; tampoco es posible determinar hasta qué punto las condiciones del estudio se mantendrán estables (Agrawal, 2010). Por ello, hacer predicciones acerca de la evolución de un atributo con base en los resultados de un análisis de selección puede ser algo aventurado, incluso en poblaciones naturales con presiones selectivas

conocidas (Grant y Grant, 2002; Postma, Visser, & Van Noordwijk, 2007), debido entre otras cosas a la variación ambiental entre años. Es por esto que para saber cómo evoluciona una población contemporánea, también es necesario estudiar directamente los cambios en atributos como resultado de un proceso selectivo. Para realizar esto existen algunos métodos alternativos que nos permiten detectar los cambios evolutivos dentro de las poblaciones.

La selección artificial permite conocer cómo una población puede adaptarse a condiciones experimentales (Conner, 2003). Esto tiene múltiples ventajas ya que se puede controlar el ambiente y saber cuál es la presión selectiva que actúa sobre la población. De esta manera se pueden tener estimadores de la respuesta a la selección y la heredabilidad de un atributo, o sea el grado de semejanza genética para dicho atributo entre parientes (Falconer y Mackay, 1996), así como estudiar de manera más precisa la varianza genética de un atributo y la existencia de alguna disyuntiva entre atributos (Fry, 2003). Esta herramienta se ha usado en algunos estudios para detectar los cambios en una interacción asociados a un proceso coevolutivo, por ejemplo en la evolución entre bacterias y fagos (Buckling y Rainey, 2002), y entre el caracol *Potamopyrgus antipodarum* y el nemátodo *Microphallus* sp. (Koskella y Lively, 2007). Con este último sistema se pudo demostrar selección negativa dependiente de la frecuencia, lo cual sería indicador de selección fluctuante (Koskella y Lively, 2009). Sin embargo, con la selección artificial sólo se pueden hacer predicciones que no son del todo extrapolables a las poblaciones naturales dado que no se sabe si los mismos cambios tendrían lugar en un ambiente natural que forzosamente tiene diferencias con las condiciones experimentales, debidas principalmente a la complejidad de los

ambientes naturales (Falconer y Mackay, 1996).

En poblaciones naturales se pueden estudiar los cambios evolutivos usando sistemas biológicos en los que se espera que exista una evolución rápida detectable en pocas generaciones. Para conocer los cambios evolutivos que se han dado en interacciones interespecíficas en respuesta a selección natural recíproca normalmente se hace uso de estudios llevados a cabo en el campo (Dwyer, Levin, y Buttel, 1990; Parker, 1991; Burdon y Thompson, 1995; Thompson, 1998). Para ello se pueden comparar los datos obtenidos en años distintos y las diferencias observadas reflejan las formas en las que una población se ha adaptado a su ambiente. Éstos se hacen dentro de una misma localidad ya sea con datos provenientes de estudios distintos o como resultado de un monitoreo a largo plazo. En general suelen reflejar una rápida evolución en tiempos cortos que van desde uno hasta 200 años (Thompson, 1998). Sin embargo, tienen la desventaja de que no es posible separar el efecto del ambiente sobre los cambios fenotípicos y determinar con certeza si las diferencias entre los datos de diferentes años son producto de cambios genéticos en la población u ocasionados por plasticidad fenotípica asociada a la variación ambiental entre años.

Para asegurar que ha habido cambios evolutivos a nivel genético en una población natural, es necesario tener evidencia de que las diferencia entre dos subpoblaciones temporales no sean producto de ambientes disímiles que podrían producir diferencias fenotípicas. Esto se lograría comparando las características de dos subpoblaciones en las mismas condiciones, proviniendo dichas subpoblaciones de la misma localidad pero de distintos puntos en el tiempo. Sin embargo, para ello necesitaríamos retroceder o adelantarnos en el tiempo para obtener las

subpoblaciones pasadas y futuras. Una aproximación experimental que soluciona este punto es la de tomar organismos en fase quiescente provenientes de poblaciones ancestrales y “revivirlos” en la actualidad para compararlos con la población actual en las mismas condiciones experimentales (Franks et al., 2008). Esta aproximación de “resurrección” cumple con los requisitos de controlar el ambiente en el que se mantienen a los organismos de dos subpoblaciones temporales para identificar que las diferencias tengan bases genéticas. También se pueden controlar los efectos maternos sobre las fases quiescentes, al obtener nuevas generaciones de cada colecta. Además, ofrece una visión completa de cómo cambiaron los atributos de la población, incluidos los efectos de la variación ambiental y las distintas presiones selectivas a lo largo del tiempo.

Pocos estudios han usado este último protocolo, pero de éstos se han obtenido resultados bastante prometedores, ya que ofrecen evidencia empírica de que los cambios evolutivos están sucediendo en respuesta a la selección natural. En el estudio de resurrección más completo llevado a cabo hasta ahora, se demostró una disminución en el tiempo de floración de *Brassica rapa* en respuesta a periodos de intensa sequía en un lapso de 10 años (Franks, Sim, y Weis, 2007). Ellos realizaron cruces entre líneas ancestrales y descendientes, obteniendo híbridos que tenían un tiempo de floración intermedio entre las dos líneas, lo que confirmó que las diferencias tenían una base genética aditiva. El protocolo consistió en usar semillas de colectas pasadas para compararlas con genotipos contemporáneos. Esto permitió asegurar que los genotipos comparados provenían de una muestra al azar representativa de la población original.

También es posible tomar los genotipos conservados en bancos de semillas o de sedimentos, pero con esto se tiene la desventaja de que no se sabe el tiempo exacto en que los genotipos fueron generados. Tampoco se puede asegurar que los organismos sobrevivientes en los bancos sean representativos de la población original, ya que pudiera haber una mortalidad diferencial entre los genotipos en estado quiescente. Un ejemplo de estos estudios fue hecho con semillas de la planta *Carex bigelowii* en un banco de semillas en el ártico (Vavrek, McGraw, y Bennington, 1991). El trabajo demostró que las plantas ancestrales provenientes del banco de semillas tenían un menor número de hojas que las descendientes. Asimismo, la respuesta a cambios en la temperatura era mayor en la población descendiente.

Decaestecker et al. (2007) investigaron la posibilidad de cambios en la interacción del crustáceo *Daphnia magna* y su microparásito *Pasteuria ramosa*. Tomando fases durmientes de ambos organismos a distintas profundidades de sedimento en un lago natural observaron una dinámica coevolutiva en la interacción en un lapso de 30 años. Los niveles de virulencia del parásito se incrementan desde el muestreo más antiguo hasta el más reciente. Sin embargo la infectividad en sus hospederos contemporáneos no mostró cambios sustanciales debido a que el parásito tiene menor virulencia en los hospederos futuros. Esto demuestra que el parásito va siguiendo los cambios de resistencia en el hospedero para mantener los niveles de virulencia (Decaestecker et al., 2007). Con este mismo protocolo se ha comprobado que ha habido cambios adaptativos en poblaciones naturales de *Daphnia* en respuesta a cambios en las presiones de depredadores (Kerfoot y Weider, 2004) y disturbios ambientales de origen humano (Hairston et al., 1999). De los trabajos existentes que

han hecho uso de una aproximación de resurrección, hasta la fecha ninguno a evaluado los cambios relacionados con la interacción planta-herbívoro de forma explícita en poblaciones naturales. Por lo anterior, resultaría muy interesante analizar los cambio evolutivos en una población de plantas, comparando subpoblaciones provenientes de distintos puntos en el tiempo.

Sistema de estudio

En este trabajo se utilizó el sistema hospedero-herbívoro *Datura stramonium* – *Lema trilineata*, haciendo uso de un experimento de resurrección, para saber si los niveles de resistencia en el hospedero han cambiado a lo largo del tiempo, y si el efecto de las defensas sobre el herbívoro es consistente con dichos cambios. Este sistema ha sido utilizado anteriormente para conocer la elección de hospedero en el insecto (Kogan y Goeden, 1970b; Kogan y Goeden, 1971) y los efectos de la resistencia y la tolerancia del hospedero sobre el herbívoro (Espinosa y Fornoni, 2006). Utilizar al mismo tiempo la planta hospedera y el herbívoro especialista para analizar la evolución del hospedero permite ampliar las posibilidades de encontrar cambios en la interacción. En lugar de empezar analizando atributos aislados de la planta, el organismo interactuante (el herbívoro) es el que indicará directamente si la interacción ha cambiado en el lapso de tiempo estudiado. Así, los genotipos interactuantes sirven de referencia para conocer los cambios en la población del hospedero (Gandon et al., 2008).

Datura stramonium es una planta anual herbácea de distribución cosmopolita (Fig. 1). Su reproducción es principalmente por autofertilización (Motten y

Antonovics, 1992). El origen del género *Datura* se sitúa en América, mientras que *D. stramonium* parece haberse originado en México. En el país, *D. stramonium* es propia de hábitats perturbados. Se distribuye en ambientes muy diversos, desde bosque de pinos hasta matorrales xerófilos. Es conocida con el nombre común de “toloache” (en inglés thorn apple o jimson weed) y ha tenido un amplio uso medicinal y ritual en varias culturas americanas y asiáticas (Schultes y Hoffman, 2000).

D. stramonium interactúa con una comunidad de herbívoros diversa pero limitada. En el valle central de México generalmente la consumen los especialistas *Epitrix parvula* y *Lema trilineata* (ambos Coleoptera: Chrysomelidae) y el generalista *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Acrididae). Ocasionalmente se ha observado que la consume el polífago *Manduca sexta* (Lepidoptera). También tiene interacción con áfidos, moscas blancas, el depredador de semillas especialista *Trichobaris* sp, nemátodos de raíces, hongos fitopatógenos y micorrizales. En la Reserva del Pedregal de San Ángel se ha observado que *L. trilineata* produce la mayor cantidad de daño llegando a generar hasta un 100% de daño foliar (obs. pers., Fig. 1).

El toloache presenta diversas características que pueden funcionar como defensas contra la herbivoría. Produce alcaloides tropánicos en altas concentraciones, principalmente escopolamina e hiosciamina, y presenta tricomas foliares. Las variaciones en contenido de agua en las hojas y el área foliar específica también pueden afectar a los herbívoros de acuerdo a lo reportado en otras especies (Schadler et al., 2003; Agrawal y Fishbein, 2006). Por otra parte, la tolerancia representa una alternativa a la resistencia que ha sido bien estudiada en esta especie (Fornoni y Núñez-Farfán, 2000; Fornoni, Valverde, y Núñez-Farfán, 2003; Fornoni, Valverde, y

Núñez-Farfán ,2004b) y que no afecta el desempeño individual de las larvas de *L. trilineata* (Espinosa y Fornoni, 2006).



Figura 1. Individuos de *Datura stramonium* y *Lema trilineata*. (Arriba, izquierda) Planta con flor y fruto en condiciones de invernadero. (Arriba, derecha) Planta en el campo con 100% de herbivoría foliar ocasionada por *L. trilineata*. Larva fase 4 (Abajo izquierda) y adulto de *L. trilineata* (Abajo derecha) consumiendo una planta en el campo.

Los tricomas foliares pueden disminuir la herbivoría de acuerdo a lo observado en estudios de campo (Valverde, Fornoni, y Núñez-Farfán, 2001). La concentración de escopolamina se ha reportado en valores de 0.07 hasta 6.5 mg/g de peso seco y de

hiosciamina o su análogo atropina de entre 0.13 hasta 5.5 mg/g de peso seco (Shonle y Bergelson, 2000; Miraldi et al., 2001), aunque se han encontrado hasta 29 tipos diferentes de alcaloides tropánicos en bajas concentraciones (Philipov y Berkov, 2002). La alta concentración de alcaloides de tropano y su diversidad en *D. stramonium*, ha hecho pensar que su mantenimiento se debe principalmente a una función de antiherbivoría. Sin embargo, Shonle y Bergelson (2000) no encontraron evidencia de selección direccional positiva (selección hacia mayores niveles de alcaloides) respecto a la herbivoría de especialistas, ya que se detectó selección estabilizadora (selección hacia niveles intermedios) para la concentración de hiosciamina y selección negativa (selección hacia menores niveles) para la escopolamina.

Los alcaloides tropánicos tienen una alta toxicidad en animales debido a que son antagonistas de los receptores de acetilcolina de tipo muscarínico, presentes tanto en vertebrados como en artrópodos (Eich, 2008). Entre los efectos que se han observado en humanos se encuentran mareos, visión borrosa, alucinaciones, paro respiratorio y muerte (Schultes y Hoffman, 2000). El toloache es bastante peligroso si es consumido por el ganado. Se han reportado intoxicaciones debido a la mezcla de pastura con material seco de *Datura*, dado que los animales no lo distinguen, a diferencia de cuando está fresco (Alexander et al., 2008). Sin embargo, en insectos herbívoros se conoce muy poco acerca de sus efectos. Se ha reportado que afecta negativamente la tasa de crecimiento en insectos herbívoros generalistas (Krug y Proksch, 1993, Wink, 1993), mientras que en insectos especialistas no queda claro si estos alcaloides tienen un efecto adverso (Shonle, 1999). Aunque no se conocen los

mecanismos de detoxificación de los alcaloides tropánicos por parte de los insectos fitófagos, se ha comprobado una de-epoxidación de escopolamina a atropina en herbívoros de *Duboisia leichhardtii* (Kitamura, et al., 2004).

Lema trilineata es el principal herbívoro de *Datura stramonium* y en muchas poblaciones esta planta es su único hospedero. Su distribución geográfica va desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica, y se han reportado poblaciones en África del Sur (Kogan y Golden, 1970a). Las hembras depositan sus huevos en el envés de la hoja en forma agrupada por lo que una sola puesta proviene de la misma hembra. Los huevos eclosionan en cinco días, y la larva se desarrolla en unos siete días para después enterrarse en el suelo y pasar a fase de pupa. Se observan 4 fases de larva y una de pupa (Fig.1, Kogan y Goeden, 1970a). La pupa forma una carcasa que la protege del exterior y se desarrolla en unos 11 días. El adulto emerge y se dirige de nuevo a la planta en donde se reproduce. El adulto se alimenta en menor medida que la larva, aunque continúa consumiendo la planta toda su vida.

Se ha observado que *L. trilineata* se puede alimentar de varias especies de solanáceas, aunque su desempeño disminuye considerablemente fuera del género *Datura* (Kogan y Goeden, 1970b). Algunas variedades se han adaptado al consumo de papa, por lo que se conoce como una plaga menor y de ahí su nombre en inglés "Three-lined potato beetle" (Kogan y Goeden, 1970a). Es interesante que si bien su rango de consumo se restringe a las solanáceas, no se limita a plantas productoras de alcaloides de tropano, dado que se puede desarrollar bastante bien en plantas no productoras como la papa (*Solanum tuberosum*) y el tomate verde (*Physalium alkekengi*). Además, se ha demostrado que la escopolamina y la hiosciamina no

funcionan como atractores ni fagoestimulantes en *L. trilineata* (Kogan y Goeden, 1971). Por ello no queda claro el papel que juegan los alcaloides tropánicos en la elección de hospedero de *L. trilineata*, ni tampoco se conoce cuáles son los compuestos que limitan el rango de alimentación en este insecto.

La larva de este coleóptero deposita sus heces frescas en el dorso, lo cual la protege de depredadores generalistas como las hormigas (Morton y Vencel, 1998), las heces también pueden contener metabolitos transformados que provienen de su hospedero (Morton y Vencel 1998; Vencel et al., 1999). *Lema trilineata* es atacado por varios parasitoides. Se ha encontrado una avispa (Ichneumonidae:) (Hymenoptera) y una mosca (Tachinidae:) (Diptera) que depositan sus huevos en el interior de la larva, Las larvas de los parasitoides se alimentan de la pupa y emergen las avispas o las moscas en fase adulta (Hernández-Cumplido, 2006). Recientemente se detectó otro parasitoide, una avispa que inyecta un huevo dentro del huevo de *L. trilineata* (ver Anexo).

OBJETIVOS

Saber si existen diferencias asociadas a la defensa contra la herbivoría entre dos subpoblaciones de la planta anual *Datura stramonium* separadas temporalmente por 20 años, que sugieran un cambio evolutivo en la interacción planta-herbívoro.

Investigar si el desempeño y consumo de área foliar del herbívoro especialista *Lema trilineata* es diferente al ser alimentado con dos subpoblaciones de la planta *Datura stramonium* separadas temporalmente por 20 años.

Explorar si atributos relacionados con las defensas vegetales como tricomas, alcaloides y contenido de agua, difieren entre las dos subpoblaciones temporales de *Datura stramonium*, y si estos se relacionan con la diferencias observadas en los atributos del herbívoro alimentado con la subpoblación ancestral y descendiente.

Investigar si los alcaloides tropánicos ejercen un efecto negativo sobre el herbívoro especialista *Lema trilineata*, y relacionarlo con los resultados observados en el estudio de defensas vegetales.

Probar si la escopolamina, el alcaloide derivado de la atropina, tiene mayor efecto sobre el herbívoro que el alcaloide predecesor.

HIPÓTESIS

Si ha habido un cambio evolutivo en atributos relacionados a la defensa contra la herbivoría en las últimas décadas, entonces observaremos diferencias en el desempeño y consumo de área foliar del herbívoro especialista *Lema trilineata* al ser alimentado con dos subpoblaciones de la planta anual *Datura stramonium* separadas temporalmente por 20 años.

Si existen diferencias en el efecto de las dos subpoblaciones temporales sobre el herbívoro, entonces podremos observar diferencias en atributos de las plantas relacionados con las defensas vegetales entre las dos subpoblaciones temporales.

Si los alcaloides tropánicos cumplen una función contra la herbivoría, entonces éstos ocasionarán efectos negativos sobre el herbívoro a concentraciones naturales.

Si el alcaloide trópanico escopolamina, derivado de la atropina, ha sido seleccionado naturalmente por una función contra la herbivoría, entonces su efecto sobre el herbívoro será mayor que el de la atropina.

MATERIAL Y MÉTODOS

EXPERIMENTO DE RESURRECCIÓN

Material biológico

Las semillas de *Datura stramonium* y los herbívoros *Lema trilineata* fueron colectados en la misma localidad, la Reserva del Pedregal de San Ángel (REPSA) al sur de la Ciudad de México (19° 19' 12" N, 99° 11' 24" O). En Mayo de 2008, las semillas se sembraron de muestras aleatorias de colectas separadas por un intervalo de tiempo de 20 años (de los años 1987 y 2007, de aquí en adelante denominados subpoblación ancestral y descendiente respectivamente). Las semillas ancestrales fueron obtenidas de plantas autofertilizadas provenientes de colectas de 1987, por lo que tienen el material genético de la subpoblación ancestral. Mientras que las semillas descendiente fueron obtenidas directamente de plantas de la población de 2007. En condiciones naturales la mayor parte de la reproducción se lleva a cabo por autofertilización (Motten y Antonovics, 1992). La siembra se realizó en condiciones de invernadero en el Instituto de Ecología, UNAM y se obtuvieron unas 30 plantas por población. Cuatro meses después, se colectaron 50 puestas de huevos del herbívoro especialista *Lema trilineata*. Estas puestas se consideran familias de medios hermanos maternos, dado que cada puesta está suficientemente separada de las demás y proviene en su totalidad de la misma madre (Kogan y Goeden, 1970a).

Bioensayo

Las puestas se mantuvieron en el insectario del Instituto de Ecología, UNAM a una temperatura de 27° C, con fotoperiodo de 12:12 horas de luz:oscuridad. De las 50

puestas se usaron 10 para el experimento, las cuales eclosionaron en un lapso de 2 días en los que se inició el bioensayo. Esto permitió tener larvas con tiempos de desarrollo sincronizados. El número de larvas eclosionadas por familia tuvo un rango de 16 a 20, y el total fue de 187 larvas. Las larvas recién eclosionadas fueron mantenidas en las mismas condiciones mencionadas arriba siguiendo el protocolo descrito por Espinosa y Fornoni (2006). Para ello las larvas se separaron individualmente en recipientes de plástico transparente de 250 ml, con 80 cm³ de tierra negra esterilizada. La mitad de las larvas de cada familia fue asignada aleatoriamente a una de las dos subpoblaciones de plantas, para ser alimentadas con cuadros de hojas de 4cm² de sus respectivos hospederos. Este arreglo por familias maternas permitió evitar que una familia fuera asignada a un solo tratamiento, así como tener un control de la variación genética del herbívoro. El tejido foliar fue obtenido de plantas en una etapa temprana de la floración, que es el momento en el que *L. trilineata* comienza a alimentarse de la planta en condiciones naturales. Además esto permite tener plantas con la producción de alcaloides en una misma etapa ontogenética, ya que se sabe que las defensas vegetales presentan variación a lo largo de su desarrollo (Boege y Marquis, 2005). El experimento se realizó durante 23 días, hasta que todos los adultos habían emergido del estado de pupa.

Durante el experimento, las siguientes variables fueron medidas: masa de la larva al día 2 después de la eclosión (mg), ganancia en masa del día 2 al 6 (mg), tasa de consumo (cm²/día), eficiencia de consumo (mg/cm²), tiempo de desarrollo de la larva y de la pupa (días), masa del adulto (mg), eficiencia de desarrollo (mg/día) y supervivencia (días). El área de hoja consumida por cada larva del día 2 al 6 después

de la eclosión se midió en cm^2 mediante un escáner y el uso de software (ImageJ, NIH; O'Neal, *et al.*, 2002). Ésta área fue usada para calcular la tasa de consumo por día y la eficiencia de consumo (ganancia en masa entre área de la hoja consumida). La eficiencia de desarrollo se obtuvo al dividir la masa del adulto entre el tiempo de desarrollo de la larva.

Análisis estadísticos

Para cumplir con los supuestos de normalidad de los datos, algunas variables fueron transformadas de acuerdo al tipo y distribución de la variable (Zar, 1984). La masa al día 2, la eficiencia de consumo, y el área consumida fueron transformadas a su logaritmo natural; mientras que la ganancia en masa fue transformada a su raíz cuadrada. Para probar las correlaciones fenotípicas entre las variables se utilizaron los residuos estandarizados por el término tratamiento; a partir de ellos se estimaron las correlaciones con el coeficiente de Pearson mediante el software JMP (Versión 7; SAS Institute, 2007). Las correlaciones entre variables compuestas (Eficiencia de consumo y eficiencia de desarrollo) y sus variables de origen (ganancia en masa, área consumida, tiempo de desarrollo y masa de adulto) no fueron evaluadas, dado que existe una relación matemática entre ellas. Excepto en el análisis de supervivencia, el número de familias se redujo a 9 debido a la mortalidad. De las familias incluidas en los análisis emergieron de 10 a 16 adultos por familia. Se realizó un modelo de riesgo proporcional para saber si existían diferencias en supervivencia entre los tratamientos.

Todos los atributos del herbívoro, excepto supervivencia, fueron analizados

como variables de respuesta con un Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA; JMP versión 7, SAS Institute, 2007), el cual incluía los efectos de familia, tratamiento y su interacción. Después, realizamos modelos univariados mixtos usando la función PROC MIXED del software SAS (Versión 8, 2000) para identificar los efectos significativos detectados en el MANOVA para cada variable por separado. En estos análisis tratamiento fue considerado como efecto fijo, y familia y la interacción tratamiento \times familia como efectos aleatorios. La función PROC MIXED realiza un análisis de Verosimilitud Máxima Restringida (REML, por sus siglas en inglés) mediante el cual la proporción de verosimilitudes entre modelos alternativos nos permite identificar la significancia de un efecto aleatorio. Una varianza significativa del factor “familia” nos sugiere que existe variación genética si consideramos los efectos maternos como nulos (Fry, 2004). Para controlar por los efectos del peso al iniciar las mediciones de Ganancia en masa de larva y Tasa de Consumo, se usó Masa al Día 2 como covariable en los modelos de estas variables. Todos los modelos se corrieron con la opción NOBOUND para permitir que la estimación incluyera covarianzas negativas, y los grados de libertad del denominador se estimaron usando la corrección Kenward-Roger con la opción DDFM=KR (SAS Institute, 2008; Kenward y Roger, 1997). Para disminuir el error de tipo I en los análisis univariados provenientes del MANOVA, se ajustó el valor de α con una corrección de Bonferroni de la forma:

$$\alpha_u = \frac{\alpha_t}{n}$$

donde α_u es el valor de α de los análisis univariados, α_t el valor de α en el MANOVA y n el número de atributos incluidos en el MANOVA (Harris, 2001). Como resultado

obtenemos $\alpha_u=0.006$.

EXPERIMENTOS DE DEFENSAS VEGETALES

Medición de defensas vegetales

Para evaluar si existían diferencias entre las subpoblaciones de hospedero en atributos relacionados con las defensas vegetales, medimos la densidad de tricomas (#tricomas/cm²), el contenido de agua (%) y la abundancia de alcaloides tropánicos (%) en las hojas de las plantas de cada subpoblación. Estos atributos han sido identificados anteriormente como agentes involucrados con efectos antiherbivoría (Agrawal y Fishbein, 1999). Para medir la densidad de tricomas se usó el material vegetal restante del bioensayo de ambas subpoblaciones. De acuerdo a Valverde, et al. (2001) los tricomas se contaron en el lado adaxial de las hojas, en un área de 9 mm².

Al estudiar el contenido de agua y la abundancia de alcaloides no fue posible utilizar las mismas plantas que las usadas en el bioensayo dado que no se contaba con suficiente material vegetal para ello. Por esta razón se sembró otra cohorte de plantas de las mismas subpoblaciones en el verano de 2009. De las plantas usadas para el bioensayo se conservaron las semillas producidas por autofertilización; dichas semillas fueron sembradas y se obtuvieron las plantas usadas para estimar el contenido de agua y la abundancia de alcaloides. Se usaron estas plantas hijas ya que al provenir de las plantas con las cuales se realizó el bioensayo contienen el material genético de las poblaciones originales. Así, el contenido de agua se calculó usando 30 plantas por subpoblación y pesando 10 hojas recién cortadas por planta. Estas hojas se secaron en un horno de convección por gravedad a 36 ° C durante 48 horas. Una

vez secas, las hojas fueron pesadas y a partir de esto se calculó el porcentaje de agua en hojas frescas (%agua) por planta de acuerdo a la fórmula:

$$\%agua = \frac{\sum_{i=1}^{10} pfresco - \sum_{i=1}^{10} pseco}{\sum_{i=1}^{10} pfresco} \cdot 100$$

Este atributo se ha relacionado con la defensa contra la herbivoría, ya que hojas con menor contenido de agua dificultarían la asimilación de nutrientes por parte de los herbívoros (Agrawal y Fishbein, 2006).

Para el análisis químico, las hojas de 12 plantas escogidas aleatoriamente por población fueron secadas a temperatura ambiente. El material vegetal se molió finamente y ~1 g por planta fue macerado en 50 ml de mezcla metanol:diclorometano 1:1. Este procedimiento se repitió 3 veces para asegurar una extracción exhaustiva. El extracto fue separado con 10 ml de HCl 0.1M y esto se repitió 5 veces. La fase acuosa se recuperó y neutralizó con NaHCO₃ en polvo. Después 50 ml de CH₂Cl₂ se añadieron para extraer los alcaloides, repitiéndolo 5 veces. La fase orgánica fue concentrada y el extracto final se usó para un análisis de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). La CG-EM se realizó con un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas de doble sector (ambos Thermo-Electron, EUA). La columna capilar tenía dimensiones de 30 m x 0.25 mm x 0.1mm. La temperatura de rampa fue de 100° C hasta 300° C a 20° C/min. La temperatura del inyector fue de 260° C y la temperatura del detector de 270° C. El perfil cromatográfico y el espectro de masas se compararon con la base de datos NIST (National Institute of Standards and Technology, EUA) para la identificación de los alcaloides (Philipov y Berkov,

2002; Berkov, et al., 2006). Debido a problemas con la extracción, el análisis final quedó reducido a 11 muestras para la población ancestral y 8 para la población descendiente. Los resultados se expresan como el porcentaje de abundancia relativa del total de los compuestos analizados por muestra.

Bioensayo con alcaloides

El material vegetal y los herbívoros fueron colectados de la misma localidad (REPSA) que en el experimento de resurrección. En este experimento se añadieron alcaloides tropánicos al material vegetal fresco de la planta *D. stramonium* para evaluar el efecto del incremento en alcaloides en el herbívoro especialista *L. trilineata*. Se realizaron pruebas preliminares alimentando al herbívoro con medio artificial sin alcaloides para controlar las concentraciones de alcaloides; sin embargo los herbívoros murieron al no comer el medio artificial. Además en pruebas con otras plantas sin alcaloides tampoco ha sido posible criar al herbívoro (Fornoni, com. pers). Por ello el experimento consistió en usar una sola planta de *D. stramonium* para disminuir la variación en el contenido basal de alcaloides en la dieta ofrecida a los herbívoros, y remojar el material vegetal en soluciones con concentraciones específicas de los alcaloides siguiendo a Shonle (1999). Este procedimiento permitió que los insectos consumieran cantidades controladas de alcaloides.

El tejido foliar fue obtenido de una sola planta presente en el campo; dicha planta era lo suficientemente grande para mantener a una población experimental de *L. trilineata*, las hojas usadas fueron aquellas producidas después del inicio de la floración y que se encontraban en buenas condiciones. En septiembre de 2010 se

colectaron 20 puestas de huevos del herbívoro y se mantuvieron en las condiciones de insectario descritas en el experimento de resurrección. A partir de estas puestas se trabajó con 10 de ellas que eclosionaron en los 2 días iniciales del experimento, con un total de 205 larvas eclosionadas. Dado que el número de larvas por puesta fue muy variable (de 6 a 30), no se realizó un análisis de la variación genética, pero sí se aseguró que cada familia tuviera larvas en todos los tratamientos. En esta ocasión se mantuvieron a las larvas individualmente en cajas de petri de 60 mm x 15 mm con un círculo de hoja (cortado con un sacabocados de 2.25 cm) humedecido con algodón.

Se prepararon 6 soluciones con agua destilada y filtrada, alcohol etílico como disolvente, nitrato de escopolamina y atropina (ambos de Sigma). A partir de las concentraciones naturales reportadas en varios estudios se obtuvo una concentración media (Krug & Proksch, 1993) y se prepararon soluciones para duplicar y cuadruplicar la concentración natural de ambos alcaloides por separado, una solución de la mezcla escopolamina+atropina y una solución control. El contenido de cada solución se presenta en la Tabla 1. Los círculos de hoja fueron remojados en su totalidad en una de las seis soluciones y posteriormente colocados dentro de la caja de petri con un algodón remojado con 150 μ l de la misma solución. En síntesis se contó con un grupo control alimentado con hojas con la concentración natural de alcaloides, y grupos de tratamientos con hojas remojadas en solución al doble y al cuádruple de atropina, al doble y al cuádruple de escopolamina, y al doble de la mezcla atropina+escopolamia

Las variables medidas fueron masa de larva al día 6 después de la eclosión (mg), tasa de consumo ($\text{cm}^2/\text{día}$), eficiencia de consumo (mg/cm^2), masa de la pupa (mg), tiempo de desarrollo de la larva y de la pupa (días), masa del adulto (mg),

eficiencia de desarrollo (mg/día) y supervivencia (días). La tasa y eficiencia de consumo se calcularon a partir del área total consumida al día 6. Dado que las larvas en cajas de petri no logran formar una carcasa para la fase de pupa, se pudo pesar la pupa y obtener su masa. Las demás variables se obtuvieron de la misma forma que en el experimento de resurrección.

Tabla 1. Contenido de las soluciones con alcaloides usadas en el bioensayo con alcaloides. Todos los alcaloides fueron diluidos en 1 ml de alcohol etílico y después aforados a 50 ml con agua destilada. La solución control incluía 1 ml de alcohol etílico aforado a 50 ml con agua destilada.

Solución	Tratamiento	Concentración
Atropina 2x	A2x	0.8 mg/ml
Atropina 4x	A4x	2.4 mg/ml
Mezcla	M2x	Atropina 0.4 mg/ml Escopolamina 0.4 mg/ml
Escopolamina 2x	S2x	0.8 mg/ml
Escopolamina 4x	S4x	2.4 mg/ml

Análisis estadístico

Para cumplir con los supuestos de normalidad de algunas variables en los análisis estadísticos se usó el logaritmo natural de la masa de pupa y la masa del adulto. La densidad foliar de tricomas fue transformada a su raíz cuadrada. En el caso del contenido de agua en hojas y abundancia relativa de alcaloides, se realizó una transformación al arcoseno de su raíz cuadrada, dado que las variables son porcentajes (Zar, 1984). Para los atributos de las plantas, la densidad de tricomas y contenido de agua se tomaron como variables de respuesta y la subpoblación de origen como variable explicativa dentro de ANOVAs de una vía. La abundancia de tres alcaloides tropánicos fue comparada mediante un MANOVA en el cual se exploró el

efecto de la subpoblación de origen sobre la variación en los tres atributos. Posteriormente se realizaron ANOVA's de una vía para cada alcaloide por separado con el valor de α ajustado con la corrección de Bonferroni. Para el bioensayo con los insectos alimentados con distintas concentraciones de alcaloides en la dieta, se realizaron análisis pareados de riesgos proporcionales para saber si existían diferencias en la supervivencia de los insectos, comparando los tratamientos de distintas concentraciones de alcaloides contra el control. Para las demás variables del herbívoro se realizó un MANOVA y posteriormente ANOVA's para cada variable por separado con la corrección de Bonferroni sobre los valores de α (Harris, 2001). Todos estos análisis fueron realizados con el software JMP (Versión7.0, SAS Institute, 2007).

RESULTADOS

EXPERIMENTO DE RESURRECCIÓN

La ganancia en masa de la larva estuvo altamente relacionada con la tasa de consumo ($r=0.77$; $P<0.0001$; Tabla 2). La ganancia en masa también se correlacionó con la masa al día 2, pero el tamaño del efecto fue menor ($r=0.54$; $P<0.0001$); sugiriendo que la tasa de consumo es el factor que más influye en la ganancia en masa. El tiempo de desarrollo estuvo negativamente correlacionado con la masa al día 2, la ganancia en masa y la tasa de consumo ($r=-0.48$; $P<0.0001$; $r=-0.78$; $P<0.0001$ y $r=-0.64$; $P<0.0001$, respectivamente). Este patrón es consistente con el hecho de que las larvas que comieron y crecieron menos necesitaban más tiempo para completar el desarrollo larval. Por otra parte, una de las variables que más influencia tiene de todas las demás es la eficiencia de desarrollo ya que se relaciona positivamente con la masa al día 2, la ganancia en masa y la tasa de consumo con una alta significancia ($r=0.40$; $P<0.0001$; $r=0.69$; $P<0.0001$ y $r=0.47$; $P<0.0001$, respectivamente). También es la variable que más se relaciona con la eficiencia de consumo ($r=0.32$; $P=0.0005$), siendo ambas variables indicadores del resultado neto de la interacción.

La supervivencia de las larvas no difirió significativamente entre los tratamientos ($\chi^2=0.94$, $P=0.332$). El tiempo medio de supervivencia (\pm e.e.) fue de 17.702 ± 0.886 y 15.837 ± 0.977 días para los insectos criados con plantas de la subpoblación ancestral y descendiente, respectivamente. En contraste, para los demás atributos del herbívoro, sí hubo un efecto general de los factores familia y tratamiento de acuerdo al MANOVA realizado (familia: Wilk's $\lambda=0.180$, $F_{64,503}=2.72$, $P<0.0001$; tratamiento: $F_{8,86}=9.69$, $P<0.0001$), pero no de la interacción (Wilk's $\lambda=0.598$,

$F_{64,503}=0.732, P=0.939$).

Tabla 2. Valores de la r de Pearson para las correlaciones fenotípicas de los atributos del herbívoros y la tasa de consumo. Números en gris: no significativo, en negro: $P<0.05$, negritas: $P<0.001$.

Atributos	ML2	GML	TC	EF	TDL	TDP	MA	ED
Masa de larva día 2 (ML2)	1	0.5364	0.4468	0.0830	-0.4822	-0.1248	0.1781	0.3994
Ganancia en masa de larva (GML)		1	0.7696		-0.7795	-0.0424	0.3711	0.6864
Tasa de consumo (TC)			1		-0.6388	-0.0702	0.1933	0.4674
Eficiencia de consumo (EF)				1	-0.2958	0.063	0.2495	0.3233
Tiempo de desarrollo de larva (DL)					1	-0.0104	0.1151	
Tiempo de desarrollo de pupa (DP)						1	-0.2720	-0.2125
Masa del adulto (MA)							1	
Eficiencia de desarrollo (ED)								1

El efecto del término familia detectado en el MANOVA es significativo en los modelos univariados mixtos para los atributos Masa al día 2, Ganancia en masa, Tasa de consumo, Eficiencia de consumo, Tiempo de desarrollo de larva y Eficiencia de desarrollo (Tabla 3), lo cual indica que estos caracteres cuentan con variación genética. El término tratamiento tuvo un efecto significativo en las variables Masa al día 2, Ganancia en masa, Tasa de consumo y Tiempo de desarrollo de larva (Tabla 3). Específicamente, las larvas alimentadas de hospederos ancestrales fueron más grandes que las larvas alimentadas con hospederos descendientes (Fig. 2). La masa al día 2 (fase 2) y la ganancia en masa del día 2 al 6 (fase 2 a 4) fueron significativamente mayores en el tratamiento de la subpoblación ancestral (masa al día 2: 1.054 ± 0.342 y 0.879 ± 0.345 mg, $F_{1,6}=48.86, P=0.0004$; ganancia en masa: 13.684 ± 0.67 y 8.637 ± 0.70 mg, $F_{1,7.75}=64,65, P<0.0001$, para los tratamientos de la subpoblación ancestral y

descendiente). Además, las larvas del tratamiento de la subpoblación ancestral requirieron un día menos para iniciar la fase de pupa comparadas con las larvas del otro tratamiento (6.646 ± 0.091 y 7.603 ± 0.095 días, respectivamente; $F_{1,6.87}=79.93$; $P<0.0001$; Fig. 2).

Tabla 3. Fuentes de variación de los modelos mixtos para los atributos del herbívoro y la tasa de consumo. El efecto fijo es tratamiento (subpoblación Ancestral o Descendiente) y los efectos aleatorios incluyen los términos familia y la interacción familia*tratamiento. Las negritas indican efectos significativos para $P<0.006$, de acuerdo a la corrección de Bonferroni.

	Efectos Fijos				Efectos Aleatorios			
	Tratamiento				Familia		Familia*tratamiento	
	DF	DFDen	F ratio	P	χ^2	P	χ^2	P
Masa de larva día 2	1	5.90	60.51	0.0003	16	<0.0001	2.7	0.0502
Ganancia en masa de larva	1	9.11	64.40	<0.0001	7.4	0.0033	1.5	0.1103
Tasa de consumo	1	9.48	46.84	<0.0001	3	0.0416	2.8	0.0471
Eficiencia de consumo	1	1.75	6.01	0.1515	8.4	0.0019	5.6	0.0090
Tiempo de desarrollo de larva	1	7.17	62.10	<0.0001	7.3	0.0034	0.1	0.3759
Tiempo de desarrollo de pupa	1	5.69	0.48	0.5152	0.6	0.2193	0	0.5
Masa del adulto	1	7.10	11.13	0.0122	6.1	0.0068	3.1	0.0391
Eficiencia de desarrollo	1	6.32	7.96	0.0286	11.2	0.0004	2.8	0.0471

El consumo foliar en los cuadrados de hoja fue significativamente diferente entre los tratamientos. La tasa de consumo de las larvas de hospederos ancestrales fue de 0.7894 ± 0.0378 cm²/día, mientras que las larvas de hospederos descendientes consumieron 0.5160 ± 0.0397 cm²/día ($F_{1,11.4}=43.69$; $P<0.0001$; Fig. 2).

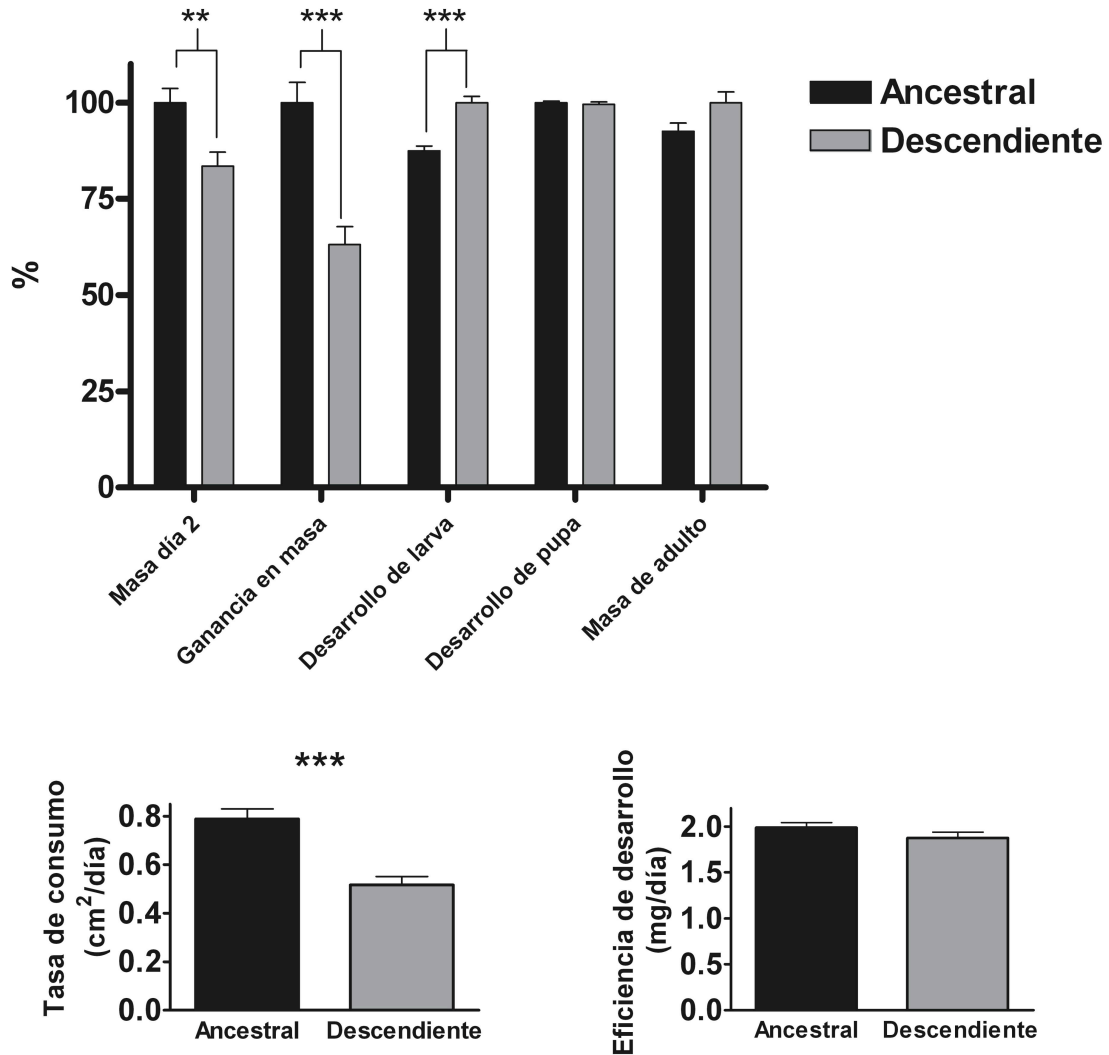


Figura 2. Diferencias en atributos de historia de vida y en tasa de consumo del herbívoro *Lema trilineata* con dos subpoblaciones temporales de *Datura stramonium*. Se muestran los atributos de historia de vida del herbívoro como porcentaje respecto al tratamiento con la mayor media (arriba). En los paneles inferiores se muestra la tasa de consumo como área de consumo por día (abajo izquierda) y la eficiencia de desarrollo como mg de peso en el adulto por días de desarrollo de la larva (abajo derecha). Las barras de error representan el error estándar. Significancia de acuerdo a los modelos mixtos con la corrección de Bonferroni: (*) $P < 0.006$, (**) $P < 0.001$, (***) $P < 0.0001$.

EXPERIMENTOS DE DEFENSAS VEGETALES

Medición de defensas vegetales

La defensa física medida como densidad de tricomas no contribuyó a los efectos diferenciales de los tratamientos (82.78 ± 5.034 y 94.44 ± 5.437 tricomas/cm², en la subpoblación ancestral y descendiente respectivamente) ya que no se encontraron diferencias significativas entre las hojas de las dos subpoblaciones ($F_{1,128}=3.08$; $P=0.082$; Fig. 3). Otro atributo de defensa medido como contenido de agua puede ser importante para la asimilación de la materia vegetal en el herbívoro, siendo las plantas con menor contenido de agua las menos nutritivas para los herbívoros. Dicho atributo fue diferente entre las dos subpoblaciones (Fig. 4), ya que la descendiente presenta menor contenido de agua ($85.84\% \pm 0.4$ y $84.44\% \pm 0.4$, en la población ancestral y descendiente, respectivamente; $F_{1,56}=5.95$; $P=0.0156$).

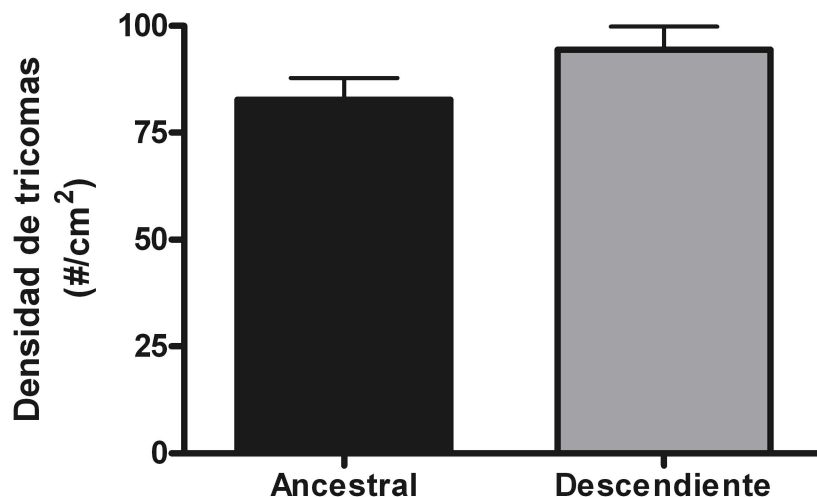


Figura 3. Densidad promedio de tricomas foliares en hospederos ancestrales y descendientes. Las barras indican el error estándar. No hubo diferencias significativas entre las dos subpoblaciones.

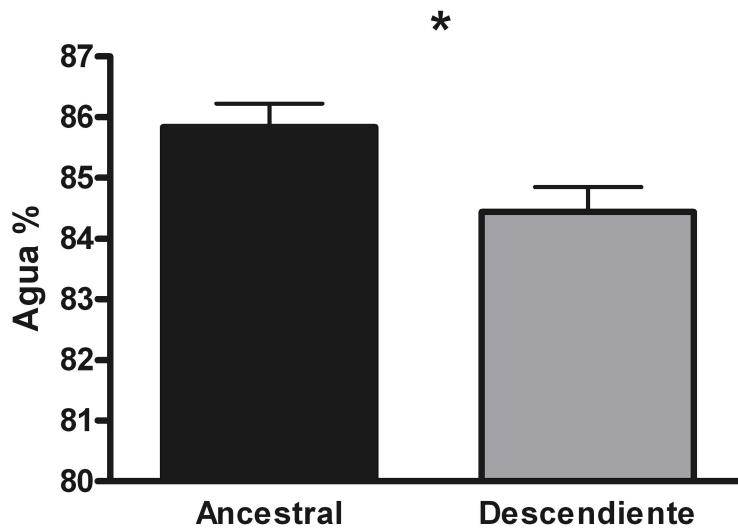


Figura 4. Contenido de agua en las hojas de hospederos ancestrales y descendientes. Se muestra el medio por subpoblación obtenido de 10 hojas pesadas por planta antes y después de ser secadas. Significancia del ANOVA (*) $P < 0.05$.

Se identificaron tres alcaloides tropánicos (Fig. 5): escopolamina, hiosciamina y apoescopolamina. A pesar de que se han reportado hasta 29 alcaloides tropánicos en *D. stramonium*, en este estudio no se ubicaron otros alcaloides en las muestras, posiblemente debido a la baja concentración o ausencia de los demás alcaloides. Si bien constatamos la presencia de otros compuestos (ver Fig. 6) no ubicamos alguno que se haya relacionado en otros estudios con la defensa contra la herbivoría. La abundancia relativa de estos tres alcaloides no fue significativamente diferente entre las subpoblaciones (Fig. 7, Tabla 4) de acuerdo al MANOVA ($F_{3,15}=1.44$, $P=0.27$). Este resultado fue corroborado por los ANOVA's de una vía ($F_{1,18}=1.60$, $P=0.22$; $F_{1,18}=2.25$, $P=0.15$ y $F_{1,18}=4.27$, $P=0.05$, para escopolamina, hiosciamina y apoescopolamina,

respectivamente). Sin embargo, se puede notar que existe una tendencia a la reducción en los niveles de abundancia relativa en los tres alcaloides (Fig. 7). En general, los atributos de defensa mostraron niveles similares en los coeficientes de variación.

Bioensayo con alcaloides

La supervivencia hasta la emergencia del adulto sólo fue significativamente diferente entre el control y el tratamiento de escopolamina 4X ($\chi^2=6.35$, $P=0.0118$; $n=68$) y la mezcla escopolamina+atropina ($\chi^2=3.92$, $P=0.0478$; $n=69$; Fig. 8). Las demás variables (masa de larva, tasa de consumo, eficiencia de consumo, masa de pupa, tiempo de desarrollo de larva, masa del adulto y eficiencia de desarrollo) fueron analizadas dentro de un MANOVA, el cual no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Wilk's $\lambda=0.677$, $F_{40,443}=1.04$, $P=0.41$). Los ANOVA's para cada atributo por separado tampoco revelaron alguna diferencia entre los tratamientos (Tabla 5).

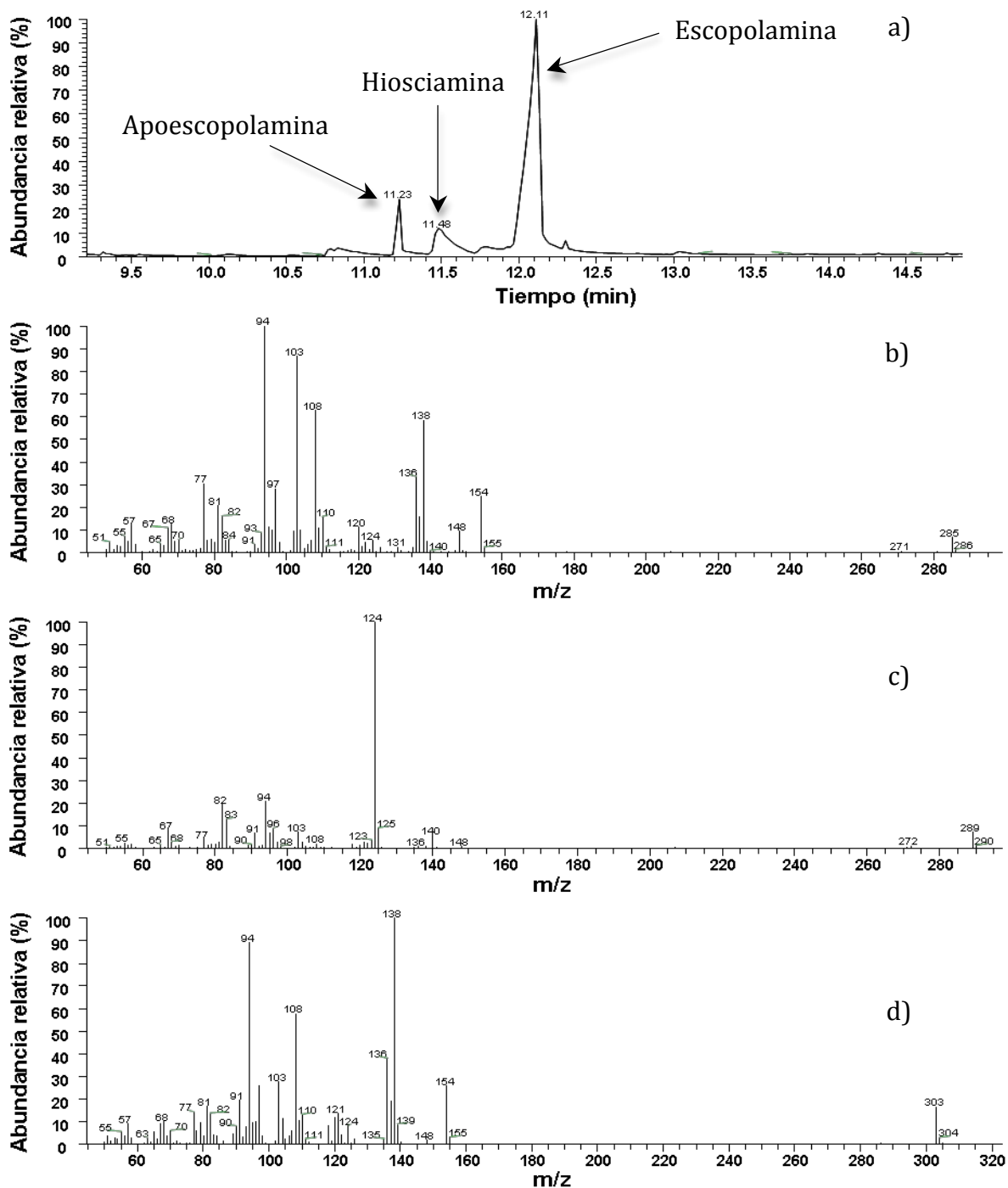


Figura 5. Perfiles obtenidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. (a) Perfil cromatográfico donde se muestran los picos de los tres alcaloides tropánicos encontrados (flechas) y su tiempo de retención. Abajo se encuentran los espectros de masa de cada uno de los tres picos con los iones moleculares y sus respectivas masas. Estos espectros fueron comparados con la base de datos NIST, para la identificación de apoescopolamina, hiosciamina y escopolamina, (b, c y d, respectivamente).

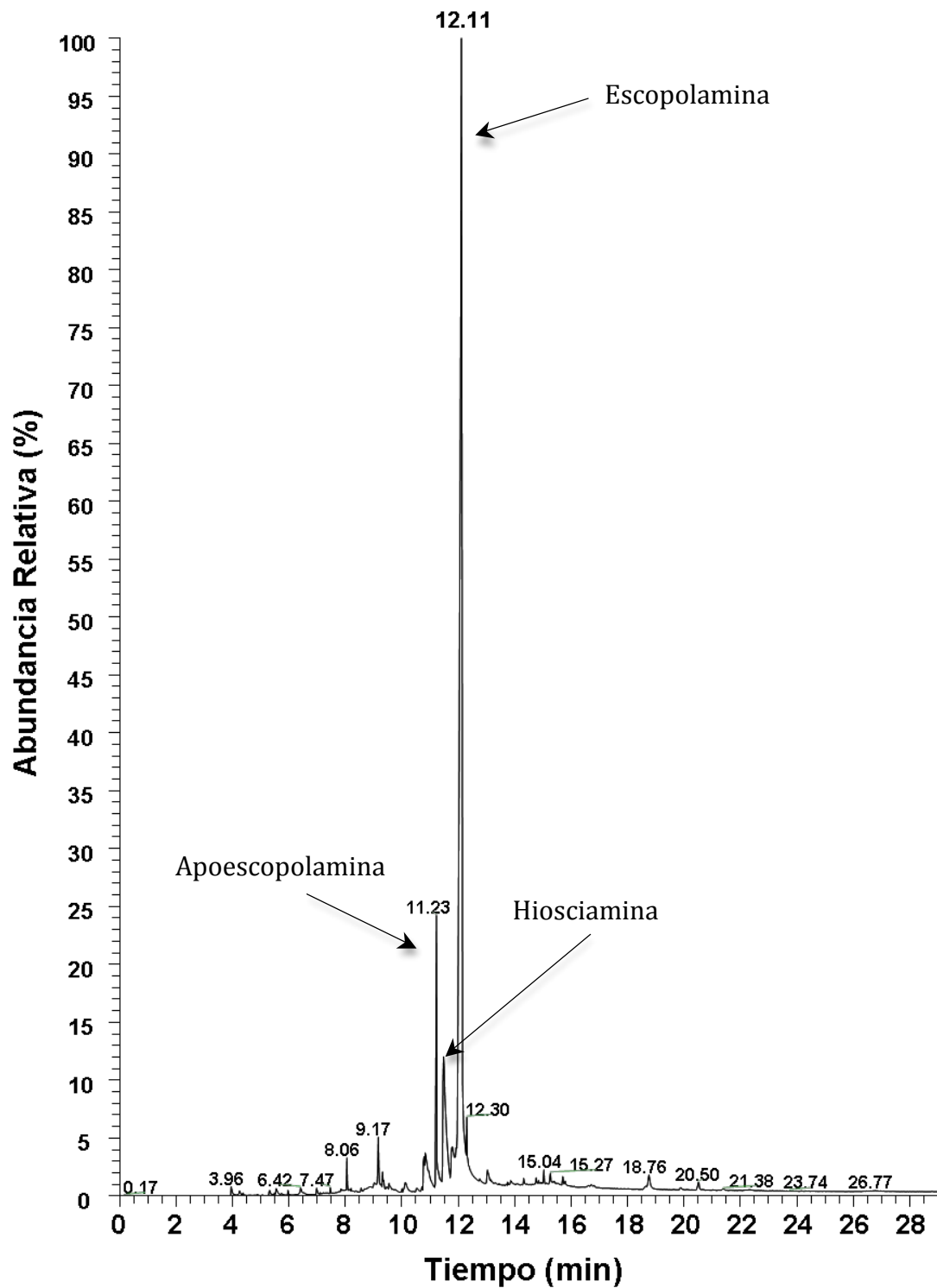


Figura 6. Perfil cromatográfico completo del extracto de *Datura stramonium*. Se localizan varios compuestos de los cuales se indica su tiempo de retención. Sólo los alcaloides tropánicos (flechas) se han asociado a defensa contra la herbivoría.

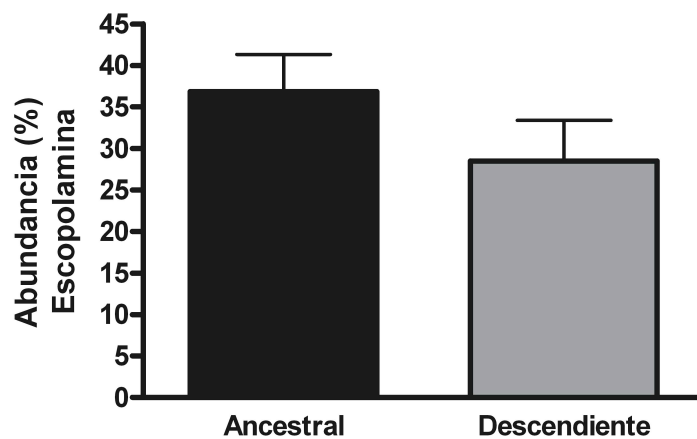
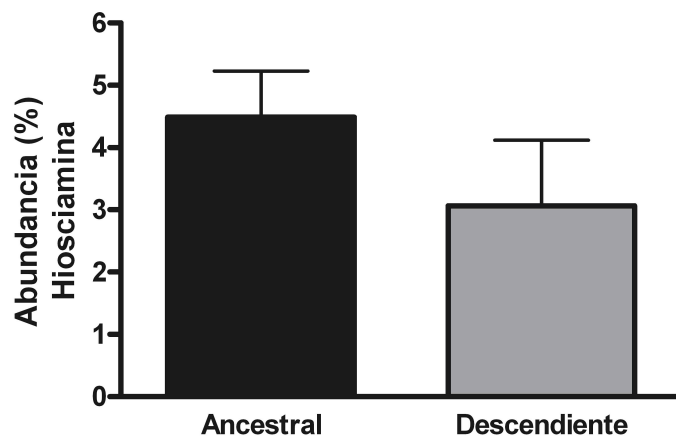
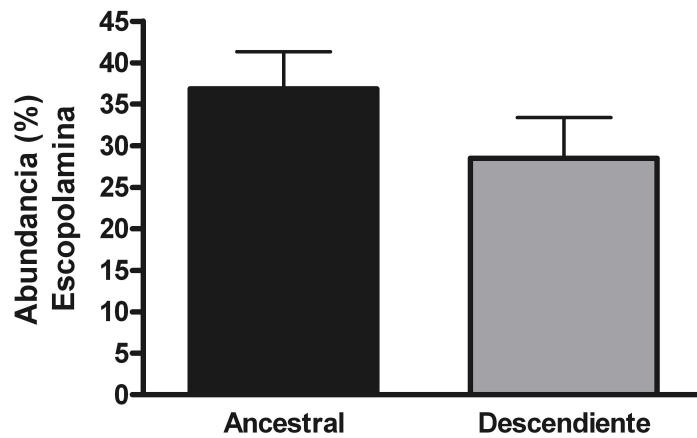


Figura 7. Abundancia de alcaloides de tropano respecto al total de compuestos en el extracto final de escopolamina, hiosciamina y apoescopolamina (arriba, centro y abajo, respectivamente). Se indican las medias para cada subpoblación y el error estándar. Ninguna diferencia fue significativa estadísticamente.

Tabla 4. Abundancia media de tres alcaloides de tropano en las subpoblaciones ancestral y descendiente, con los valores estadísticos de los ANOVAs correspondientes. Ninguna diferencia fue significativa de acuerdo al valor de α ajustado con la corrección de Bonferroni.

Alcaloide	Abundancia (%)		F	P
	Ancestral (media \pm e.e.)	Descendiente (media \pm e.e.)		
Escopolamina	36.84 \pm 5.11	28.53 \pm 4.36	1.60	0.223
Hiosciamina	4.49 \pm 0.81	3.07 \pm 0.95	2.25	0.152
Apoescopolamina	1.97 \pm 0.35	0.95 \pm 0.41	4.46	0.050

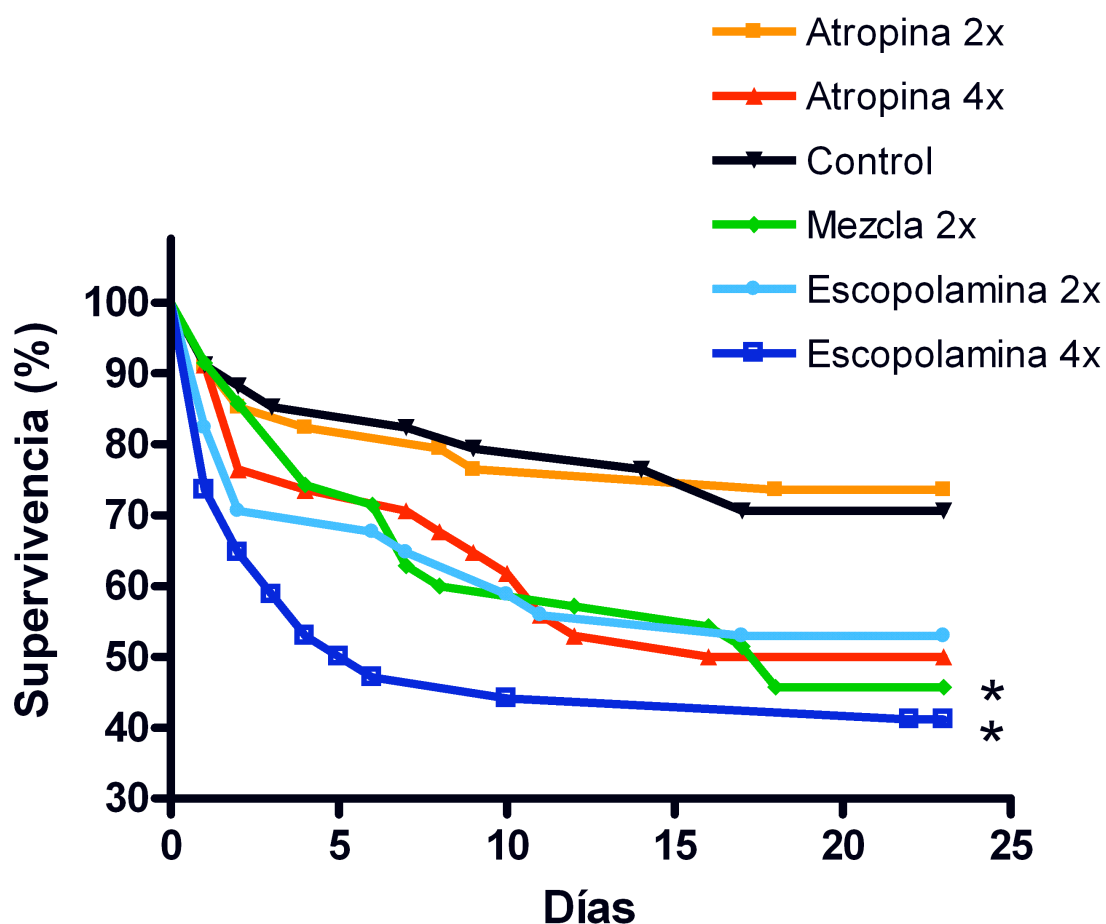


Figura 8. Curvas de supervivencia de herbívoros frente a diferentes concentraciones de alcaloides tropanicos en la dieta. Los días inician en la eclosión del huevo y finalizan hasta la emergencia del último adulto de todos los tratamientos. Significancia contra el control de la prueba de Riesgos Proporcionales: (*) $P < 0.05$.

Tabla 5. Resultados de los ANOVA's de una vía para comparar las medias de los atributos del herbívoro *Lema trilineata*, entre dietas a diferentes concentraciones de alcaloides. Ninguna diferencia fue significativa.

Atributo	F	P
Masa al día 6	1.02	0.408
Tasa de consumo	0.45	0.816
Eficiencia de consumo	0.38	0.859
Desarrollo de larva	1.70	0.140
Desarrollo de pupa	0.23	0.948
Masa de pupa	0.97	0.441
Masa de adulto	1.15	0.341
Eficiencia de desarrollo	0.92	0.471

DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos bajo distintas aproximaciones, la evolución de las defensas contra la herbivoría en la planta anual *Datura stramonium*. En un bioensayo con el herbívoro especialista *Lema trilineata* se encontró que la tasa de consumo en larvas fue mayor al desarrollarse en la subpoblación ancestral de hospedero. Además la subpoblación descendiente redujo el desempeño de los herbívoros. Estos datos sugieren que los niveles de resistencia de la planta han aumentado en los últimos veinte años. En el caso de los atributos de defensa, no se encontraron diferencias entre subpoblaciones ni en los tricomas, ni en la abundancia relativa de alcaloides, pero el contenido de agua fue menor en la subpoblación descendiente. Esto sugiere que los atributos relacionados con la calidad nutricional podrían estar contribuyendo al aumento en la resistencia del hospedero. En el bioensayo con alcaloides se observó un efecto negativo sobre la supervivencia del herbívoro con el alcaloide escopolamina a cuatro veces su concentración natural, y con la combinación de escopolamina con atropina. Ningún otro atributo del herbívoro fue afectado significativamente por el incremento de alcaloides. Lo anterior es consistente con la ausencia de incremento en la abundancia de alcaloides. También se observó que la escopolamina tiene un mayor efecto que su predecesor atropina, sugiriendo que el alcaloide más novedoso y costoso fue seleccionado por tener un mejor efecto contra la herbivoría.

Efectos en el herbívoro de los cambios evolutivos en el hospedero.

Se demostró que ha ocurrido un cambio evolutivo asociado a la protección del hospedero contra la herbivoría en una población natural de plantas, haciendo uso de

un herbívoro especialista como genotipo de referencia. El cambio observado en *D. stramonium* ocurrió en un lapso de 20 años, por lo que puede ser considerado como un proceso de evolución rápida en no más 20 generaciones. Aunque la diferencia en la tasa de consumo es muy grande, el cambio en una población en pocas generaciones no es inesperado. En otras poblaciones de antagonistas se han observado cambios en los hospederos en pocas generaciones incluso en especies asexuales como en las interacciones de bacterias con fagos (Buckling y Rainey, 2002), y caracoles con parásitos (Koskella y Lively, 2007). Esto sugiere que la presión selectiva de los antagonistas es suficientemente intensa como para promover la evolución del hospedero en pocas generaciones.

Al comparar los atributos de historia de vida de los herbívoros como genotipos de referencia, fue posible determinar si las plantas han podido cambiar la interacción en detrimento del herbívoro. Se comprobó que los insectos del tratamiento descendiente presentaron ganancia en masa de larva y mayor tiempo de desarrollo. En particular, las diferencias en el tiempo de desarrollo de la larva parecen tener consecuencias importantes para el herbívoro, ya que es atacada por varias especies de parasitoides (ver Anexo) y podría tener costos ecológicos. Una hipótesis que se podría aplicar para esta especie, como para la mayoría de los insectos herbívoros, es la de lento crecimiento-alta mortalidad (Benrey y Denno, 1997), según la cual mientras más tiempo dura el desarrollo, el riesgo de mortalidad por depredación aumenta. Además se ha propuesto que los insectos con desarrollo lento también son más susceptibles a las épocas frías que los que se desarrollan rápidamente (Frodyce y Shapiro, 2003). De esta manera las defensas del hospedero disminuyen la ganancia en

masa y aumentan el tiempo de desarrollo, lo que a su vez podría reducir la adecuación de las larvas, por lo que la ganancia en masa y el tiempo de desarrollo serían seleccionados hacia altos y bajos niveles, respectivamente. Ya que se encontró variación genética para estos atributos, podría haber evolución recíproca por selección natural en el herbívoro.

Es interesante que aunque las larvas con hospederos ancestrales tuvieron un mayor peso al día 6, lo que corresponde a los inicios de su último estadio, los adultos no presentaron diferencias entre tratamientos. Probablemente este resultado se deba a una compensación de los herbívoros del tratamiento descendiente al alimentarse por más tiempo, ya que la eficiencia de desarrollo fue similar en los dos tratamientos. Otra observación que se puede hacer acerca de esto es que los insectos herbívoros parecen haberse adaptado exitosamente a los cambios en el hospedero. A pesar de que las larvas se desarrollan pobremente en las plantas descendientes, son capaces de llegar a la fase adulta con un peso similar que las que fueron alimentadas con las plantas ancestrales. Esto significa que aunque los insectos del tratamiento ancestral se puedan desarrollar eficazmente, no consolidan esa ventaja en el peso adulto.

Se observó que no hay variación en el tiempo de desarrollo de la pupa, por lo que el tiempo de desarrollo de la larva representa prácticamente el tiempo a la madurez. De acuerdo a estudios de ecología de poblaciones basados en matrices de atributos de historia de vida, la adecuación poblacional, tomada como la tasa de crecimiento, es más sensible a los cambios en el tiempo a la madurez que a cualquier otro atributo (Stearns, 1992). Por ello consideramos que las marcadas diferencias en desarrollo (un día de diferencia), es lo que más repercute en los efectos del hospedero

sobre los herbívoros, tomando también en cuenta la influencia que pueden tener los parasitoides en la población. Entonces en conjunto estos resultados indican que los herbívoros sí presentan efectos negativos al alimentarse con la subpoblación descendiente de hospederos comparados con los que se alimentaron de la subpoblación ancestral.

Mediante la matriz de correlaciones fenotípicas, fue posible identificar aquellos atributos que son importantes para los demás atributos. Por ejemplo, la eficiencia de desarrollo se relaciona con todos los demás atributos, incluido el tiempo de desarrollo de pupa. Esto parece ser importante ya que la eficiencia de desarrollo es un atributo compuesto que resume la eficacia con la que el insecto acumuló masa hasta la fase adulta, relativa a su tiempo de desarrollo. Al estar esta variable relacionada con todas las demás sin mostrar algún compromiso, nos puede indicar qué tan eficiente es el insecto alimentándose de un hospedero. Aunque la eficiencia de desarrollo fue ligeramente mayor en los insectos alimentados con la subpoblación ancestral, esta diferencia no fue significativa tomando en cuenta la corrección de Bonferroni en los análisis univariados. Sin embargo, esto sugiere que dicho atributo podría ser un buen indicador del desempeño global del herbívoro.

Evolución de las defensas vegetales

Dado que no se midió el consumo a lo largo de todo el desarrollo de la larva ni su consumo a nivel poblacional, no podemos cuantificar la resistencia en las dos subpoblaciones de manera confiable. Por ello la diferencia en tasa de consumo de 37% entre los dos tratamientos, no refleja la diferencia en resistencia entre las dos

subpoblaciones. Los insectos del tratamiento descendiente que se desarrollaron más lentamente tuvieron oportunidad de alimentarse por un día más, lo cual no fue cuantificado. Si estos herbívoros logran compensar su alimentación en el último día, entonces las diferencias en el consumo a lo largo de todo el desarrollo del insecto serían disminuidas. Como la supervivencia no fue afectada por la subpoblación del hospedero, tampoco sabemos qué tan diferente sea el daño a una población por un conjunto natural de herbívoros. Sería necesario hacer un estudio en el campo y determinar cómo son consumidas las subpoblaciones de *D. stramonium* por una población de *L. trilineata* y por otros herbívoros importantes para el hospedero.

Existe otra consecuencia que podrían tener las diferencias en defensas entre las subpoblaciones. Las dinámicas de sucesión demográfica podrían ser afectadas por la evolución rápida de la resistencia contra la herbivoría. Se sabe que las semillas de *D. stramonium* pueden sobrevivir viables en los bancos de semillas al menos por 39 años (Levin, 1990). Si los genotipos ancestrales emergen del banco de semillas, estarán menos protegidos contra los herbívoros y probablemente tendrán una presión selectiva negativa. En trabajos anteriores se ha demostrado que el daño foliar disminuye la adecuación de las plantas de *Datura stramonium*, medida como el número de semillas por individuo (Fornoni y Núñez-Farfán, 2000). Si las plantas de genotipos ancestrales son más consumidas, se reduciría su éxito de establecimiento en una población futura que tenga niveles más altos de resistencia, lo cual podría disminuir el efecto del banco de semillas sobre la evolución de la población.

Los datos de las defensas contra la herbivoría nos ayudan en parte a explicar los patrones observados en el experimento de resurrección. Aunque no hubo

diferencias estadísticamente significativas en la densidad de tricomas, las plantas descendientes presentaron un mayor número de tricomas, lo que podría contribuir a disminuir la tasa de consumo en los herbívoros. En el caso de la abundancia de alcaloides, el bajo número de muestra (n=19) pudo haber impedido que se encontraran diferencias significativas. Lo destacable es que las plantas ancestrales tendieron a presentar una mayor abundancia en los tres alcaloides medidos y esta diferencia fue marginalmente significativa en la apoescopolamina (Fig. 7). Esto coincide con que se ha observado que el papel de los metabolitos secundarios en la resistencia no es tan primordial como se tenía pensado y que atributos de historia de vida del hospedero podrían tener un mayor efecto sobre la herbivoría (Carmona, et al.). El hospedero podría estar reduciendo los niveles de la concentración de alcaloides debido a que son costosos como se ha demostrado en *Brugmansia* para los alcaloides tropánicos (Alves et al., 2007) y porque parece que no están protegiendo efectivamente de los herbívoros especialistas (Shonle y Bergelson, 2000). La presencia de altas concentraciones de alcaloides tropánicos podría ser explicado porque siguen siendo una defensa contra insectos herbívoros generalistas (Krug y Proksch, 1993; Wink, 1993) y contra los mamíferos más eficazmente (Alexander et al., 2008). Además se ha demostrado que estos alcaloides tienen efectos alelopáticos sobre la germinación de semillas de otras especies (Lovett et al., 1981; Levitt et al., 1984).

Las diferencias en la resistencia de las dos subpoblaciones podrían estar más influidas por características fisiológicas. El contenido de agua resultó ser menor en las hojas de plantas descendientes, lo cual podría hacerlas más resistentes. Se ha

demostrado que el contenido de agua juega un papel importante en la digestibilidad, ya que el agua hace más accesibles los compuestos nutritivos. Sin embargo, esta diferencia es de poco más del 1% y no queda claro que ésta pueda ocasionar los efectos observados en el consumo y tiempo de desarrollo del herbívoro. Este resultado nos permite asegurar que las subpoblaciones temporales sí son diferentes genéticamente. Es probable que varios atributos de defensa con distintas funciones, incluyendo los no medidos en este trabajo, estén actuando conjuntamente resultando en la resistencia general de la planta (Agrawal y Fishbein, 2006). Entonces es posible que los insectos estén seleccionando plantas con ciertas combinaciones de atributos que reduzcan el consumo o el mismo desempeño de los insectos al consumirlas. De esta forma la presión de selección por parte de los herbívoros actuaría sobre la resistencia y no sobre un atributo en particular. De acuerdo a lo observado en las mediciones de defensas, es probable que la población esté evolucionando para ser menos nutritiva. Por ello sería útil comparar los atributos relacionados como contenido de nitrógeno y proteínas, dureza de hojas y compuestos reductores de la digestibilidad. Esto refleja la necesidad de que los estudios tomen en cuenta diversos atributos al considerar la resistencia, ya que muy raras veces un sólo atributo confiere todas las propiedades de resistencia frente a los herbívoros. Por ello lo realizado en este estudio puede considerarse adecuado al medir tres atributos que representan estrategias complementarias de resistencia, de tipo químico, morfológico y fisiológico.

Con lo obtenido a partir de los análisis de caracteres de defensa, queda en evidencia que para detectar los cambios evolutivos en una interacción lo más adecuado es analizar directamente el resultado de la interacción. Al contar con

genotipos de referencia, en este caso los herbívoros, ellos nos revelan cuáles son las diferencias en la interacción a través de las consecuencias que tienen los cambios evolutivos del hospedero en su desempeño. De otra forma si sólo se analizan los atributos conocidos es posible que no estemos midiendo los atributos que se modificaron ya que muchos atributos pueden estar asociados y sería poco factible cuantificar todos. Además, las respuestas plásticas del antagonista a los cambios del hospedero pueden darnos pistas de los cambios que ha tenido el propio antagonista.

Si bien se considera que los herbívoros pueden adaptarse fácilmente a su hospedero en un tiempo corto, los resultados muestran que el hospedero también pueden cambiar rápidamente. Este cambio podría estar relacionado a las presiones selectivas del antagonista, aunque también es posible que existan otro tipo de presiones selectivas que influyan en la interacción de la planta con el herbívoro. Por ejemplo, las plantas también pueden responder a las presiones selectivas del clima (Franks et al., 2007). En el caso de los patógenos y parásitos se sabe que evolucionan rápidamente; se ha reportado escalamiento en los niveles de infección en la interacción bacteria-fago (Buckling y Rainey, 2002), el virus de influenza humana (Smith et al., 2004) y los parásitos de *Daphnia* (Decaestecker et al., 2007). Sin embargo, es más difícil estudiar los cambios en el hospedero por que tiene tiempos generacionales más largos que sus enemigos (Kerfoot y Weider, 2004; Koskella y Lively, 2007; Koskella y Lively, 2009). En el caso de la interacción herbívoro-planta, también hay poca información de la evolución de las defensas en poblaciones de plantas y, la existente generalmente se refiere a especies invasoras que se adaptan rápidamente a su nueva comunidad de herbívoros (Joshi y Vrieling 2005; Leger y

Forister 2005; Müller y Martens 2005; Berenbaum y Zangerl 1998), pero la evidencia empírica en poblaciones naturales de plantas es escasa. Por ello el uso de especies vegetales anuales puede facilitar el descubrimiento de cambios evolutivos en el hospedero en respuesta a sus herbívoros.

Aunque un incremento en los niveles de defensa de una población vegetal a lo largo del tiempo normalmente es considerado como evidencia de una carrera armamentista (Berenbaum y Zangler, 1998; Bergelson, Dwyer, y Emerson, 2001), en realidad el patrón observado es consistente tanto con este modelo como con el de selección fluctuante. Dado que no pudimos determinar con claridad él o los atributos responsables de las diferencias en tasa de consumo entre subpoblaciones, pueden existir dos alternativas: que las diferencias en defensa se deban a un incremento en los atributos relacionados con la defensa, algo compatible con la carrera armamentista; o a una maladaptación de los insectos a los genotipos comunes actuales, lo cual sería compatible con un proceso de selección fluctuante. Por ello resulta primordial saber si hay atributos relacionados con la defensa que presentaron un escalamiento, a fin de distinguir qué modelo explicaría mejor los datos obtenidos.

Las diferencias entre las subpoblaciones debidas a factores ambientales fueron minimizadas con la siembra de semillas sincronizada y el diseño de jardín común, con lo que todas las plantas se desarrollaron en las mismas condiciones, e incluso la colecta de hojas para mantener la población de herbívoros se realizó de la misma forma. Sin embargo, podrían existir efectos no controlados debido a efectos maternos, al almacenamiento de las semillas de la población de 1987 y a su condición quiescente. Estos efectos parecen poco probables, como se discute con los estudios

con semillas de *Carex bigelowii* conservadas por 200 años en bancos de semillas (Vavrek, et al., 1991). En este caso los efectos del tiempo de almacenamiento, observados en las plántulas como hojas más largas, desaparecieron con el crecimiento de las plantas. Así, se atribuyeron las diferencias entre las plantas adultas a cambios genéticos por selección o deriva más que a efectos ambientales o daño genético. Además no hay evidencia de que la quiescencia afecte los atributos de la planta adulta como las defensas contra la herbivoría. Lo recomendado para estudios de resurrección es aplicar un ciclo de “refrescamiento” en el que se trabaja con la F1 de la población original, para contar con el material genético de la población ancestral y eliminar por completo los efectos maternos y de la quiescencia (Franks et al. 2008). Por ello, cabe resaltar que los análisis de alcaloides y contenido de agua sí fueron realizados con los hijos de la subpoblación ancestral, y en el último análisis se encontraron diferencias que confirman el resultado del bioensayo con los herbívoros.

Dado que se ha reportado que la autofertilización puede disminuir la resistencia contra la herbivoría debido a depresión por endogamia (Bello-Bedoy y Núñez-Farfán, 2010), podría pensarse que las semillas de 1987 también tengan ese efecto debido a la autofertilización. Sin embargo, *D. stramonium* en condiciones naturales se reproduce mayoritariamente por autofertilización (Motten y Antonovics, 1992), por lo que no esperaríamos diferencias importantes en los sistemas de apareamiento de las dos subpoblaciones. Además al medir los efectos de la autofertilización en la resistencia en la misma población del estudio (Reserva del Pedregal de San Ángel), no se detectaron diferencias en resistencia entre plantas autofertilizadas y con entrecruzamiento (Nunez-Farfan, Cabrales-Vargas, y Dirzo,

1996). Por ello es poco probable que las diferencias observadas sean producto del sistema de apareamiento. Sin embargo, lo más recomendable es hacer un experimento donde se maneje el mismo sistema de apareamiento en las dos subpoblaciones.

¿Los alcaloides tropánicos afectan a *Lema trilineata*?

La prueba de desempeño del herbívoro a distintas concentraciones de alcaloides corrobora lo encontrado en las mediciones de alcaloides de hospederos ancestrales y descendientes, ya que se observó que los alcaloides sólo tienen efecto sobre el herbívoro en altas concentraciones. Hasta cuatro veces el promedio de la concentración natural de escopolamina disminuyó la supervivencia significativamente, mientras que la mezcla de atropina+escopolamina disminuyó en menor medida la supervivencia. Esto podría indicar que los herbívoros especialistas se han adaptado eficazmente a las concentraciones naturales de alcaloides y sólo concentraciones muy altas llegan a tener un efecto negativo. Dicho efecto sólo se refleja en la supervivencia, puesto que los insectos que sobrevivieron a todos los tratamientos tenían básicamente las mismas características en todos los atributos de historia de vida e interacción. Esto significa que una vez que las larvas toleran altas concentraciones de alcaloides, éstos no afectan otros atributos de historia de vida y los relacionados con la interacción.

Al observar las curvas de supervivencia de la Figura 8 notamos que los insectos del tratamiento A2x muestran prácticamente la misma mortalidad que el grupo control y con ello se observan dos grupos bien diferenciados. Por un lado, un grupo con el tratamiento A2x y Control, y el segundo grupo con los tratamientos de S2x, los

alcaloides combinados y a cuatro veces la concentración natural. Esto muestra que el alcaloide derivado, la escopolamina, es más tóxico para el herbívoro especialista que su predecesor, la atropina (Hashimoto et al., 1993). En general se tenía por sentado que la escopolamina podría ser más activa que la atropina por sus efectos en mamíferos, pero ésta es una prueba de que lo anterior es cierto para el herbívoro especialista con el cual *D. stramonium* pudiera estar involucrado en un proceso coevolutivo. Este resultado sugiere un escenario de carrera armamentista química en el que una nueva sustancia se fija debido a una presión selectiva ejercida por los herbívoros especialistas (Berenbaum y Feeny, 1981). Dicha sustancia es más costosa ya que requiere un paso enzimático más que la atropina (Matsuda et al., 1991) y su fijación en el hospedero estaría dada por el balance costo-beneficio en relación a la interacción con los herbívoros. El hecho de que los herbívoros del tratamiento de alcaloides combinados tuviera una diferencia significativa en mortalidad respecto al control, también revela un efecto sinérgico de ambos alcaloides, lo cual es contrario a lo reportado en insectos generalistas (Shonle, 1999). Este tratamiento sería comparable con los tratamientos A2x y S2x puesto que se usó una concentración similar, pero el incremento de ambos alcaloides simultáneamente produjo una mortalidad mayor que cuando se incrementan por separado.

Dado que *L. trilineata* parece requerir una concentración muy alta de alcaloides tropánicos para expresar un efecto negativo, la evolución de estos alcaloides podría estar más influida por los costos de las altas concentraciones y las interacciones con herbívoros generalistas y especies competidoras. La tasa de consumo tampoco fue afectada por altas concentraciones de alcaloides, lo que indica que las diferencias

entre las subpoblaciones temporales no tienen su origen en un aumento en la concentración de estos alcaloides. Esto coincide con el hecho de que no se encontraron diferencias significativas en alcaloides entre las subpoblaciones, e incluso una tendencia a menor abundancia de alcaloides en la subpoblación descendiente.

Aportaciones de la aproximación de resurrección.

La metodología usada en este trabajo representa una alternativa para el estudio de la selección natural y un aporte para un mejor entendimiento de los fenómenos evolutivos. En el área de la ecología evolutiva hacen falta estudios empíricos que consideren puntos de vista ecológicos y estudien los procesos evolutivos en poblaciones contemporáneas como resultado de las características ecológicas de las poblaciones. En particular replantear la división entre tiempo ecológico y evolutivo, y tratarlos como un continuo resulta de mucha utilidad al momento de responder preguntas de evolución en tiempos cortos (Thompson, 1998; Pigliucci, 2007). Por ello es necesario evaluar las características de la selección natural desde aproximaciones experimentales que incluyan los factores ecológicos como componentes básicos de la evolución de una población.

Los experimentos de resurrección constituyen una oportunidad excepcional de estudiar la evolución en acción en poblaciones naturales y observar los resultados de la selección natural en pocas generaciones. Consideramos que con los requisitos necesarios, este tipo de experimentos aportan información decisiva acerca de la evolución rápida, a diferencia de los estudios de monitoreo que no ofrecen un control experimental que separe los cambios fenotípicos de los genéticos. Por otra parte,

pueden ser útiles para conocer cuáles son las consecuencias de los cambios a corto plazo en una población para la generación de los patrones de diversificación y distribución que observamos en la actualidad. El presente trabajo es el único, hasta la fecha, que ha tratado de evaluar los cambios en las defensas vegetales en una población natural usando una aproximación de resurrección. Será conveniente estudiar si en otras especies de plantas anuales, también se puede detectar evolución rápida en las defensas contra la herbivoría.

Los resultados presentados constituyen una evidencia de que los cambios evolutivos pueden ser detectados en el transcurso de pocos años en poblaciones de plantas anuales sujetas a un fuerte presión de selección por parte de los herbívoros. Esto es apoyado por otros trabajos que han demostrado evolución rápida en condiciones experimentales y naturales, pero en este caso la metodología usada ofrece la ventaja de tener el control de las condiciones experimentales para conocer la diferencia genética entre subpoblaciones temporales sujetas a selección bajo condiciones naturales. Además, el uso de diferentes aproximaciones experimentales como los bioensayos con el insecto son útiles para reunir evidencia que ayude a explicar los resultados de un experimento de resurrección. En particular hacer uso de genotipos de especies interactuantes para responder una pregunta de coevolución aporta información más clara acerca de la evolución de las interacciones que cuando se tratan de estudiar los atributos de la interacción por separado. Con esto se puede proponer un seria consideración de la creación y potencial uso de colecciones de semillas para experimentos de resurrección que permitan evaluar cómo ocurre la evolución en la actualidad, en particular cómo las poblaciones de plantas están

respondiendo a retos ecológicos debidos a presiones selectivas de especies interactuantes y cambios drásticos en el clima.

CONCLUSIONES

Las subpoblaciones temporales de la planta *Datura stramonium* tuvieron un efecto diferencial sobre el herbívoro especialista *L. trilineata*. Las matrices de atributos de historia de vida del herbívoro *Lema trilineata* y de su interacción con la planta *Datura stramonium* fueron significativamente diferentes entre los herbívoros alimentados con la subpoblación ancestral y la descendiente del hospedero, lo cual indica que las subpoblaciones de plantas tienen distinta calidad nutricional para el herbívoro.

En particular, los herbívoros alimentados con plantas de la subpoblación ancestral mostraron un mayor peso en larvas, mayor tasa de consumo y un menor tiempo de desarrollo comparados con los alimentados con la subpoblación descendiente. Esto sugiere que hubo un cambio evolutivo relacionado con las defensas vegetales en la población natural de *Datura stramonium* en un lapso de 20 años, y que dicho cambio afecta negativamente al herbívoro especialista *Lema trilineata*. Además se encontró evidencia de variación genética en varios atributos del herbívoro, lo que confirma su potencial evolución recíproca a las presiones selectivas de su hospedero.

El contenido de agua en hojas fue diferente entre las subpoblaciones ancestral y descendiente, pudiendo relacionarse con los efectos diferenciales de las subpoblaciones sobre el herbívoro especialista. En contraste, no se observaron diferencias en densidad foliar de tricomas y abundancia de alcaloides entre las dos subpoblaciones.

Los alcaloides tropánicos ejercieron un efecto negativo en la supervivencia de *Lema trilineata* sólo a altas concentraciones. La mezcla escopolamina-atropina 2x y la escopolamina 4x disminuyeron significativamente la supervivencia del herbívoro. La

matriz de atributos de historia de vida del herbívoro y de su interacción con la planta no fue afectada por las diferentes concentraciones de alcaloides tropánicos. Esto indica que las concentraciones de alcaloides necesarias para afectar a *L. trilineata* son muy altas, y que una alta producción de alcaloides sería muy costosa para ser seleccionada. Esto corrobora el hecho de que los alcaloides no se hayan incrementado en la población en los últimos 20 años y que exista una tendencia a menor concentración de alcaloides en la subpoblación descendiente.

La escopolamina, alcaloide derivado de la atropina, fue más efectiva disminuyendo la supervivencia del herbívoro especialista que la atropina. Esto coincide con un escenario de carrera armamentista química, en la que los metabolitos derivados son seleccionados por tener una mejor función contra la herbivoría.

LITERATURA CITADA

- Agrawal AA. 2011. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology* 25, no. 2:420-32. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x.
- Agrawal, AA, y Fishbein M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology* 87, no. sp7: 132-149.
- Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi J, Dogliotti E, Di Domenico A, Johanna Fink-Gremmels J, et al. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal* 691: 1-55.
- Alves MN, Sartoratto A, y Trigo J R. 2007. Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): defense, allocation, costs, and induced response. *Journal of chemical ecology* 33, no. 2: 297-309. doi:10.1007/s10886-006-9214-9.
- Becerra, JX. 1994. Squirt-Gun Defense in *Bursera* and the Chrysomelid Counterploy. *Ecology*. 75, no. 7: 1991-1996. doi:10.2307/1941603.
- . 1997. Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science* 276, no. 5310: 253-256.
- . 2003. Synchronous coadaptation in an ancient case of herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 22: 12804-7. doi:10.1073/pnas.2133013100.
- Bello-Bedoy R, y Núñez-Farfán J. 2010. Cost of inbreeding in resistance to herbivores in *Datura stramonium*. *Annals of botany* 105, no. 5: 747-53. doi:10.1093/aob/mcq038.
- Benrey B, y Denno RF. 1997. The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78, no. 4: 987-999.
- Berenbaum MR, y Feeny P. 1981. Toxicity of Angular Furanocoumarins to Swallowtail Butterflies: Escalation in a Coevolutionary Arms Race? *Science* 212, no. 4497: 927-929.
- Berenbaum MR, y Zangler AR. 1992. Quantification of chemical evolution. En: *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics*. Ed. Fritz RS y Simms EL. The University of Chicago Press. pp 69-88.
- Berenbaum MR, y Zangerl AR. 1998. Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* 95, no. 23 (November): 13743-8.
- Bergelson J, Dwyer G, y JJ Emerson. 2001. Models and data on plant-enemy coevolution. *Annual Reviews of Genetics* 35: 496-499.
- Berkov S, Zayed R, y Doncheva T. 2006. Alkaloid patterns in some varieties of *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 77 , no. 3:179-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16492393>.
- Boege K, y Marquis RJ. 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 20, no. 8: 441-448.
- Brodie ED, Moore AJ, y Janzen FJ. 1995. Visualizing and quantifying natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* 10, no. 8: 313-318. doi:10.1016/S0169-5347(00)89117-X.
- Buckling A, y Rainey PB. 2002. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings: Biological Sciences* 269, no. 1494: 931-6. doi:10.1098/rspb.2001.1945.
- Burdon JJ, y Thompson JN. 1995. Changed Patterns of Resistance in a Population of *Linum Marginale* Attacked by the Rust Pathogen *Melampsora Lini*. *The Journal of Ecology* 83, no. 2: 199-206.. doi:10.2307/2261558.
- Carmona D, Lajeunesse MJ, y Johnson MTJ. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology* 25: 358-367. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01794.x.
- Chapman RF. 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annual review of entomology* 48 (January): 455-84. doi:10.1146/annurev.ento.48.091801.112629.
- Conner JK. 2003. Artificial selection: a powerful tool for ecologists. *Ecology* 84, no. 7: 1650-1660.
- Dawkins R, y Krebs JR. 1979. Arms Races between and within Species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences (1934-1990)* 205, no. 1161 (September): 489-511. doi:10.1098/rspb.1979.0081.
- Decaestecker E, Gaba S, Raeymaekers JA, Stoks R, Van Kerckhoven L, Ebert D, y De Meester L. 2007. Host-parasite "Red Queen" dynamics archived in pond sediment. *Nature* 450, no. 7171 (December): 870-3. doi:10.1038/nature06291.
- Després L, David JP, y Gallet C. 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* 22, no. 6: 298-307. doi:10.1016/j.tree.2007.02.010.

- Dwyer G, Levin SA, y Buttel L. 1990. A simulation model of the population dynamics and evolution of myxomatosis. *Ecological Monographs* 60, no. 4: 423–447.
- Ehmke A, Rahier M, Pasteels J, Theuring C, y Hartmann T. 1999. Sequestration, maintenance, and tissue distribution of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in larvae of two *Oreina* species. *Journal of Chemical Ecology* 25, no. 10: 2385–2395.
- Ehrlich PR, y Raven PH. 1964. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 18, no. 4: 586–608.
- Eckart E. 2008. *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites*. Vol. 1. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-74541-9.
- Espinosa EG, y Fornoni J. 2006. Host tolerance does not impose selection on natural enemies. *The New phytologist* 170, no. 3: 609-14. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01681.x.
- Falconer DS y Mackay TFC. 1986. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4ª Edición. Longman Ed. pp. 184-207.
- Fineblum WL, Rausher MD. 1995. Tradeoff between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. *Nature*. 377:517-520.
- Fordyce JA, y Shapiro AM. 2003. Another Perspective on the Slow-Growth/High-Mortality Hypothesis: Chilling Effects on Swallowtail Larvae. *Ecology* 84, no. 1 (January): 263-268. doi:10.1890/0012-9658(2003)084[0263:APOTSG]2.0.CO;2
- Fornoni J, y Núñez-Farfán J. 2000. Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: genetic variation and costs for tolerance to defoliation. *Evolution* 54, no. 3 (June): 789-97.
- Fornoni J, Núñez-Farfán J, Valverde PL, y Rausher MD. 2004. Evolution of mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution* 58, no. 8: 1685–1695.
- Fornoni J, Valverde PL, y Núñez-Farfán J. 2003. Quantitative genetics of plant tolerance and resistance against natural enemies of two natural populations of *Datura stramonium*. *Evolutionary Ecology Research* 5, no. 7: 1049–1065.
- . 2004. Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. *Evolution* 58, no. 8 (August): 1696-704.
- Franks SJ, Avise JC, Bradshaw WE, Conner JK, Etterson JR, Mazer SJ, Shaw RG, y Weis A. 2008. The resurrection initiative: storing ancestral genotypes to capture evolution in action. *BioScience* 58, no. 9: 870–873.

- Franks SJ, Sim S, y Weis. 2007 AE. Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, no. 4 (January): 1278-82. doi:10.1073/pnas.0608379104.
- Fry, J.D. 2003. Detecting ecological trade-offs using selection experiments. *Ecology* 84, no. 7: 1672–1678.
- Fry, J.D. 2004. Estimation of genetic variances and covariances by restricted maximum likelihood using PROC MIXED. In: *Genetic Analysis of Complex Traits Using SAS* Ed. A. M. Saxton, pp. 11–34. SAS Institute Inc., NC, USA.
- Futuyma DJ, y Slatkin M. (eds.). 1983. *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Futuyma DJ, y Agrawal AA. 2009. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 43: 18054-61. doi:10.1073/pnas.0904106106.
- Gandon S, Buckling A, Decaestecker E, y Day T. 2008. Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. *Journal of evolutionary biology* 21, no. 6 (November): 1861-6. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01598.x.
- Geffeney S, Brodie ED, Peter C Ruben, y Edmund D Brodie. 2002. Mechanisms of adaptation in a predator-prey arms race: TTX-resistant sodium channels. *Science* 297, no. 5585: 1336-9. doi:10.1126/science.1074310.
- Grant PR, y Grant BR. 2002. Unpredictable evolution in a 30-year study of Darwin ' s finches. *Science* 296, no. 5568: 707-11. doi:10.1126/science.1070315
- Hairston NG Jr, Lampert W, Cáceres CE, Holtmeier CL, Weider LJ, Gaedke U, Fischer JM, Fox JA, y Post DM. 1999. Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* 401, no. 6752: 446.
- Harris RJ. 2001. *Primer of Multivariate Statistics*. 3a ed. Lawrence Erlbaum Associates. EUA. 632 p.
- Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Klewer N, Schulz S, Singer MS, y Bernays EA. 2005. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect biochemistry and molecular biology* 35, no. 5: 391-411. doi:10.1016/j.ibmb.2004.12.010.
- Hashimoto T, Matsuda J y Yamada Y. 1993. Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 β -hydroxylase. *FEBS Letters*. 329(1): 35-39

- Hernández-Cumplido J. 2006. *Historia natural de la interacción tritrófica entre la planta Datura stramonium, dos insectos herbívoros, un depredador de semillas pre-dispersión y los parasitoides asociados*. Tesis de licenciatura. UNAM. México, DF.
- Holzinger F, y Wink M. 1996. Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the Monarch butterfly (*Danaus plexippus*): Role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of Na⁺,K⁺- ATPase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1921–1937.
- Hsiao TH, y Fraenkel G. 1968. The role of secondary plant substances in the food specificity of the Colorado potato beetle. *Annals of the Entomological Society of America* 61:485–503.
- Janzen, DH. 1980. When is it coevolution? *Evolution* 34, no. 3: 611–612.
- Jermy T. 1984. Evolution of insect/host plant relationships. *American Naturalist* 124, no. 5: 609–630.
- Joshi J, y Vrieling K. 2005. The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. *Ecology Letters* 8, no. 7 (April): 704-714. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00769.x.
- Kerfoot WC, y Lawrence JW. 2004. Experimental paleoecology (resurrection ecology): Chasing Van Valen 's Red Queen hypothesis. *Limnology and Oceanography*. doi:10.4319/lo.2004.49.4_part_2.1300.
- Kenward MG, y Roger JH. 1997. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, 53(3), pp.983-97.
- Kitamura Y, Tominaga Y, y Ikenaga T. 2004. Winter cherry bugs feed on plant tropane alkaloids and de-epoxidize scopolamine to atropine. *Journal of chemical ecology* 30, no. 10: 2085–2090.
- Kniskern J, y Rausher MD. 2001. Two modes of host–enemy coevolution. *Population Ecology* 43, no. 1: 3–14.
- Kogan M, y Goeden RD. 1970a. The biology of *Lema trilineata daturaphila*, (Coleoptera: Chrysomelidae) with notes on efficiency of food utilization by larvae. *Annals of the Entomological Society of America* 63:537-546.
- . 1970b. The host-plant range of *Lema trilineata daturaphila*, (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America* 63:1175-1180.
- . 1971. Feeding y host-selection behavior of *Lema trilineata daturaphila* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*

64:1435-1448.

- Koskella B, y Lively CM. 2007. Advice of the rose: experimental coevolution of a trematode parasite and its snail host. *Evolution* 61, no. 1 (January): 152-9. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00012.x.
- . 2009. Evidence for negative frequency-dependent selection during experimental coevolution of a freshwater snail and a sterilizing trematode. *Evolution* 63, no. 9 (September): 2213-21. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00711.x.
- Krug E, y Proksch P. 1993. Influence of Dietary Alkaloids on Survival and Growth of *Spodoptera littoralis*. *Biochemical systematics and ecology* 21, no. 8: 749-756.
- Lande R, y Arnold SJ. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37, no. 6: 1210-1226.
- Leger E, y Forister ML. 2005. Increased resistance to generalist herbivores in invasive populations of the California poppy (*Eschscholzia californica*). *Diversity and Distributions* 11, no. 4 (July): 311-317. doi:10.1111/j.1366-9516.2005.00165.x.
- Levitt J, Lovett J, y Garlick P. 1984. *Datura stramonium* allelochemicals: Longevity in soil, and ultrastructural effects on root tip cells of *Helianthus annuus* L. *New Phytologist* 97: 213-218.
- Levin, D.A. 1990. The Seed Bank as a Source of Genetic Novelty in Plants. Levin, D.A. 1990. The Seed Bank as a Source of Genetic Novelty in Plants. *The American Naturalist* 135, no. 4: 563-572 135, no. 4: 563-572.
- Lovett J, Levitt J, Duffield A, y Smith N. 1981. Allelopathic potential of *Datura stramonium* L.(Thorn-apple). *Weed Research* 21, no. 3/4: 165-170.
- Mauricio R, y Rausher MD. 1997. Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* 51, no. 5:1435-1444.
- Matsuda, Jun, S. Okabe, T. Hashimoto, and Yasuyuki Yamada. 1991. Molecular cloning of hyoscyamine 6-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J Biol Chem* 266, no. 15: 9460-9464
- Miraldi E, Masti A, Ferri S, y Comparini IB. 2001. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 72, no. 6: 644-648.
- Morton TC, y VencI FV. 1998. Larval beetles form a defense from recycled host-plant chemicals discharged as fecal wastes. *Journal of Chemical Ecology* 24, no. 5: 765-785.

- Motten AF, y Antonovics J. 1992. Determinants of Outcrossing Rate in a Predominantly Self-Fertilizing Weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 79, no. 4 (April): 419. doi:10.2307/2445154.
- Müller C, y Martens N. 2005. Testing Predictions of the “Evolution of Increased Competitive Ability” Hypothesis for an Invasive Crucifer. *Evolutionary Ecology* 19, no. 6: 533-550. doi:10.1007/s10682-005-1022-0.
- Núñez-Farfán J, Cabrales-Vargas R, y Dirzo R. 1996. Mating System Consequences on Resistance to Herbivory and Life History Traits in *Datura stramonium*. *American Journal of Botany* 83, no. 8 (August): 1041. doi:10.2307/2445993.
- Núñez-Farfán J, y Dirzo R. 1994. Evolutionary Ecology of *Datura stramonium* L. In Central Mexico: Natural Selection for Resistance to Herbivorous Insects. *Evolution* 48, no. 2: 423-436.
- Núñez-Farfán J, Fornoni J, y Valverde PL. 2007. The Evolution of Resistance and Tolerance to Herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38, no. 1: 541-566. doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095822.
- O'Neal ME, Landis D, y Isaacs R. 2002. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. *Journal of economic entomology* 95, no. 6 (December): 1190-4.
- Painter RH. 1958. Resistance of plants to insects. *Annual Review of Entomology*. 3:267-290
- Parker MA. 1991. Nonadaptive evolution of disease resistance in an annual legume. *Evolution* 45, no. 5: 1209–1217.
- Philipov S, y Berkov S. 2002. GC-MS Investigation of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium*. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C* 57, no. 5/6: 559–561.
- Phillips PC, y Arnold SJ. 1989. Visualizing multivariate selection. *Evolution* 43, no. 6: 1209–1222.
- Pigliucci M. 2007. Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution* 61, no. 12 (December): 2743-9. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00246.x.
- Postma E, Visser J, y Van Noordwijk AJ. 2007. Strong artificial selection in the wild results in predicted small evolutionary change. *Journal of evolutionary biology* 20, no. 5: 1823-32. doi:10.1111/j.1420-9101.2007.01379.x.
- Rausher MD. 2001. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411, no. 6839 (June): 857-64. doi:10.1038/35081193.

- SAS Institute. 2008. SAS for Windows. Version 9.2. SAS Institute Inc. North Carolina, USA.
- Schadler M, Jung G, Auge H, y Brandl R. 2003. Palatability, decomposition and insect herbivory: patterns in a successional old-field plant community. *Oikos* 103, no. 1 (October): 121-132. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12659.x.
- Schultes RE y Hoffman A. 2000. *PLANTAS DE LOS DIOSES. Orígenes del uso de los alucinógenos*. 2ª Edición. Fondo de Cultura Económica. México. 208 pp.
- Shonle I. 1999. *Evolutionary ecology of tropane alkaloids*. Ph.D. diss., University of Chicago, Chicago, IL.
- Shonle I, y Bergelson J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54, no. 3 (June): 778-88.
- Smith DJ, Lapedes AS, de Jong JC, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus A, and Fouchier RAM. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305, no. 5682 (July): 371-6. doi:10.1126/science.1097211.
- Stearns SC. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press. 249 .
- Strauss SY, y Agrawal AA. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14, no. 5 (May): 179-185.
- Thompson JN. 1994. *The coevolutionary process*. University of Chicago Press, Chicago, EUA.
- . 1998. Rapid evolution as an ecological process. *Trends in Ecology & Evolution* 13, no. 8 (August): 329-332. doi:10.1016/S0169-5347(98)01378-0.
- . 2005. *The geographic mosaic of coevolution*. Univ of Chicago Press Chicago IL. University of Chicago Press.
- Thompson JN, y Cunningham BM. 2002. Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature* 417: 735-738.
- Valverde PL, Fornoni J, y Núñez-Farfán J. 2001. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *Journal of Evolutionary Biology* 14, no. 3: 424-432.
- Valverde PL, Fornoni J, y Núñez-Farfán J. 2003. Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: equal plant fitness benefits of growth and resistance against herbivory. *Journal of evolutionary biology* 16, no. 1 (January): 127-37.

- Vavrek MC, McGraw JB, y Bennington CC. 1991. Ecological Genetic Variation in Seed Banks. III. Phenotypic and Genetic Differences Between Young and Old Seed Populations of *Carex Bigelowii*. *The Journal of Ecology* 79, no. 3 (September): 645-662. doi:10.2307/2260659.
- Vencl FV, Morton TC, Mumma RO, y Schultz JC. 1999. Shield defense of a larval tortoise beetle. *Journal of Chemical Ecology* 25, no. 3: 549-566.
- Weis AE, y Franks SJ. 2006. Herbivory tolerance and coevolution: an alternative to the arms race? *The New phytologist* 170, no. 3 (January): 423-5. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01745.x.
- Wink M. 1993. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. *The alkaloids*. Ed Cordell GA, Vol. 43. Academic Press, New York. pp. 1-118
- Winkler IS y Mitter C. 2008. The phylogenetic dimension of insect/plant interactions: A summary of recent evidence. *Specialization, Speciation, and Radiation: The Evolutionary Biology of Herbivorous Insects*. Ed Tilmon K. Univ California Press, Berkeley. pp 240- 263.
- Winkler IS, Mitter C, y Scheffer SJ. 2009. Repeated climate-linked host shifts have promoted diversification in a temperate clade of leaf-mining flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 43 (October): 18103-8. doi:10.1073/pnas.0904852106.
- Zar JH. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, EUA. 718 p.

ANEXO

En el transcurso del experimento fue posible ampliar nuestras observaciones respecto a la biología de *Lema trilineata*. En particular, se descubrió un parasitoide del huevo de este coleóptero. Éste se suma a los otros dos parasitoides de la larva, una avispa (Ichneumonidae: Hymenoptera) y una mosca (Tachinidae: Diptera), lo cual sugiere que *L. trilineata* se encuentra bajo una gran presión de selección por parasitoides. La colecta de huevos generalmente se realiza en los meses de agosto y septiembre, para estos meses todos los huevos en el campo presentan su característico color amarillo-naranja y una textura brillante, lo cual es indicativo de su buen estado. Sin embargo, a finales del mes de octubre los huevos toman un heterogéneo color café, con textura rugosa y opaca (Fig 11, arriba izq). Este tipo de huevos no son colectados debido a que ya no eclosionan larvas de *L. trilineata*. En la última temporada, fueron colectadas puestas de huevos en los meses de octubre y noviembre, de los cuales muchas puestas presentaban las características de los huevos cafés. Dichas puestas fueron colocadas en el laboratorio de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos. Como era de esperarse, no eclosionaron larvas de *L. trilineata* en los primeros días, en vez de eso en un tiempo aproximado de 15 días eclosionaron de los mismos huevos avispas muy pequeñas de 1-2 mm de largo (Fig 11, arriba der). Para confirmar que las avispas provenían de los huevos y no se habían introducido a la caja de petri por otros medios, se disectaron huevos de color café y se encontraron las mismas avispas en desarrollo (Fig 11, abajo).

Dado que no se habían descrito parasitoides del huevo de *L. trilineata* se procedió a realizar su identificación con ayuda del Dr. Alejandro Zaldívar. De acuerdo

a la clave usada (Goulte y Huber, 1993) esta avispa pertenece al orden Hymenoptera, superfamilia Chalcidoidea, familia Eulophidae. Dicho parasitoide puede ser muy importante para el control de la población de *L. trilineata* ya que para el mes de noviembre prácticamente todas las plantas observadas en el campo son parasitadas por este himenóptero. Esto sugiere que aunque continúen habiendo plantas de *D. stramonium* en buen estado, a finales de la temporada no habrá larvas de *L. trilineata* debido a la alta tasa de parasitoidismo. Por ello, los organismos que generarán la población la próxima temporada, serán aquellos que lograron llegar a adultos en los primeros meses de la temporada y que también evadieron a los parasitoides de larva. Esto complementa la idea de que lo más importante para los herbívoros es desarrollarse lo más rápido posible y disminuir el tiempo a la madurez para reproducirse al principio de la temporada. Por otra parte las presiones selectivas del herbívoro no se restringen al hospedero, sino que tiene una fuerte influencia de sus distintos enemigos, haciendo de este insecto un candidato ideal para el estudio de interacciones tritróficas.

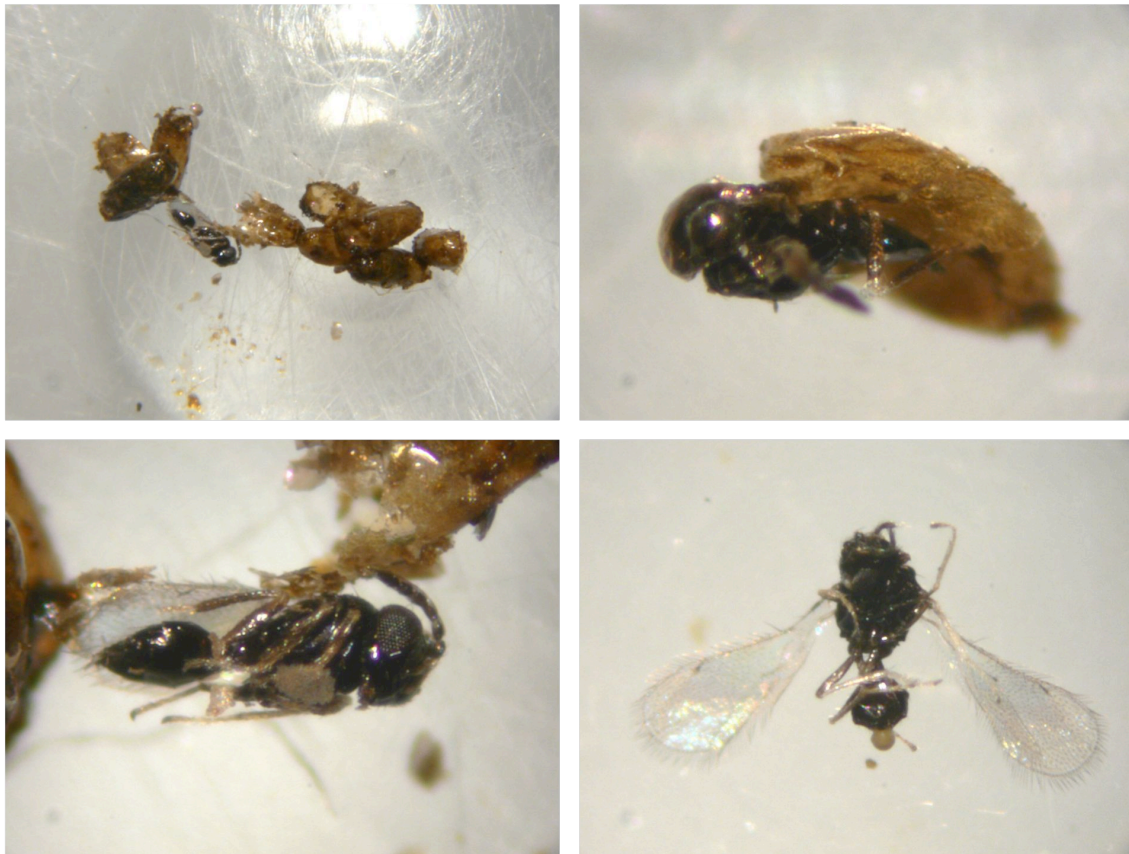


Figura 11. Imágenes de la avispa parasitoide del huevo de *Lema trilineata* de la familia Eulophidae, tomadas con microscopio estereoscópico. (Arriba izq) Huevos de color café que es indicador de parasitoidismo. (Arriba der) avispa emergiendo del huevo de *L. trilineata*. Avispa desarrollada en el interior del huevo (Abajo izq) y completamente desarrollada con alas extendidas (Abajo der).

BIBLIOGRAFÍA

Goulet Henri, y Huber John T. 1993. *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Centre for Land and Biological Resources Research. 668 pp.