



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la
defensa contra herbívoros en *Turnera ulmifolia***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Nora Villamil Buenrostro

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Karina Boege Paré

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Villamil
Buenrostro
Nora
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304587614

2. Datos del tutor

Dra.
Boege
Paré
Karina

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Zenón
Cano
Santana

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Ek
del Val
de Gortari

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Víctor
Rico
Gray

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa contra herbívoros en *Turnera
ulmifolia*
93 p.
2012

Este proyecto fue financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 89624) y por el proyecto PAPIIT-IN215010 que apoyó con recursos y una beca para su realización, así como por el Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A Karina toda mi gratitud por haberme recibido y acogido. Porque a punta de paciencia, calidez y una actitud siempre dispuesta me contagió su profunda pasión y conocimiento por la ecología de las interacciones bióticas. Entre muchas otras, por enseñarme a preguntar y responder, a medir daño foliar (que no herbivoría), a trabajar con rigor, por su calidad humana y su ejemplo tan loable. Gracias también por la confianza, el apoyo, la dedicación y el gran afecto que le tengo.

A Judith con profunda admiración y respeto. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio y enriquecer sin estadística pero con estructura este proyecto. Por la hora de la comida y las sobremesas siempre bulliciosas con pláticas académicas, personales, políticas y críticas constructivas de toda índole. Por las lecciones de anatomía, por las listas de pros y contras, por compartir trozos de su vida y experiencia, por la serenidad y el ahínco.

A Zenón, a ese estupendo profesor que me orilló a la ecología y al gran consejero que me despejó muchas dudas personales o académicas; también por el honor que me concedió al ser minucioso revisor, mi cariño sincero.

A mis sinodales, Dra. Ek Del Val y Dr. Víctor Rico-Gray por el esmero con que revisaron este trabajo y las pertinentes aportaciones que lo enriquecieron.

A Rubén Pérez Ishiwara por todo el apoyo logístico que me ha brindado, específicamente con la organización de las salidas al campo, la administración del material, la ayuda en el laboratorio y su perpetuo buen humor.

A Mónica Karina Pérez por todo el apoyo técnico que me ha brindado, específicamente con las técnicas de microscopía y anatomía vegetal. Por la dedicación y cariño con que enfrenta su trabajo.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, UNAM a cargo de la Dra. Silvia Espinosa Matías por el apoyo técnico que me brindó.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega por su ayuda en los análisis químicos y el préstamo de equipo de laboratorio. Gracias por su contribución y aliento entusiasta en la evaluación de las defensas químicas.

A mis compañeros y profesoras del taller, así como al resto de los miembros del Laboratorio de Desarrollo en Plantas por su ayuda, enseñanzas y empeño en hacer de ése un lugar para todos.

A los compañeros e investigadores del laboratorio de Interacción Planta-Animal, por su apoyo, colaboración y por fomentar un ambiente solidario.

A toda la gente que hace de La Mancha un sitio memorable: Tacho, Fernando, Enrique, Héctor y la Sombra.

Por la invaluable ayuda en campo de Karina, Carlos, Sergio, Ana María, Karen, Rosalinda, Tania, Rubén, Juan, César, Santiago y muy especialmente a Mariana, Sofía y Xóchitl, mis regalitos del campo, por la oportunidad de disfrutar, trabajar y aprender a su lado.

A Jorge y su fresca lectura.

A los entrañables Andrés, Ornela, Santiago, Jonás, María, Paola, Rafa, Coral, Piña y Rosalinda por las discusiones, consejos, el apoyo incondicional y los abrazos cálidos que en momentos estelares, oscuros y torpes me cobijaron. A ellos y a Julia, Melba, Aura, Vic, Sarita, Ximena, Daniela, Paula, Abril y a todas las demás personas que impregnaron la facultad y la biología de momentos y recuerdos maravillosos, gracias.

A Alicia, Athié, Fabiola, Chiva, Fer, Laura y Renata, amigos fraternales y camaradas de la infancia, del hielo, los hilos y de la vida. Gracias por su apoyo y comprensión eterna, por aguantar como hermanos mis neurosis y acompañarme en pasiones diversas, por inspirarme en decisiones difíciles y por sus orejas siempre prestas. Sin ustedes a mi lado, mi vida difícilmente hubiera tenido tonos tan efervescentes.

A mi Ati, quien me bordó la memoria con alpiste, por los años que la seguiré añorando.
A Tere, guardiana de mis semillas y cómplice de aretes, bichos y verdor.

Al corazón impecable, tesón y magna generosidad de mi madre, por el sustento y la motivación.

A Karla por los momentos compartidos, su solidaridad y prudente consejo, una hermana sin par.

Índice

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
Defensas físicas.....	2
Dureza foliar	2
Tricomas foliares.....	3
Defensas químicas.....	4
Glucósidos cianogénicos	5
Taninos	6
Defensas bióticas.....	6
Mirmecofilia	6
Trayectorias ontogenéticas de la defensa	8
SITIO DE ESTUDIO	14
SISTEMA DE ESTUDIO	16
MÉTODOS.....	19
Daño foliar y crecimiento.....	19
Tricomas foliares.....	20
Dureza foliar	22
Glucósidos cianogénicos	22
Taninos	23
Defensas bióticas.....	25
Nectarios extraflorales.....	25
Néctar extrafloral	27
Patrullaje de hormigas	28
RESULTADOS	29
Historia natural.....	29
Crecimiento.....	30
Daño foliar	32
Tricomas foliares.....	34
Dureza foliar	38
Glucósidos cianogénicos	39
Taninos	39
Nectarios extraflorales.....	39
Anatomía de juveniles	40
Anatomía de pre-reproductivas.....	42
Anatomía de reproductivas	42

Modo de secreción del néctar extrafloral	46
Abundancia de NEF	47
Néctar extrafloral y patrullaje de hormigas	48
DISCUSIÓN	50
Historia natural.....	50
Patrones generales de los cambios ontogenéticos en la herbivoría y defensa	51
Tricomas foliares.....	54
Dureza foliar	57
Glucósidos cianogénicos	58
Taninos	58
Defensas bióticas.....	59
Abundancia de los NEF.....	59
Anatomía y ecología de la secreción del néctar extrafloral.....	60
Atracción de hormigas y patrullaje	62
Modo de secreción	63
Sectorización de las defensas indirectas.....	66
Estacionalidad de las defensas indirectas	68
Consecuencias poblacionales y evolutivas de las trayectorias	70
PERSPECTIVAS DE ESTUDIO	76
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	80
ANEXOS.....	92

Villamil-Buenrostro, N. 2011. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa contra la herbivoría en *Turnera ulmifolia*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 93p.

RESUMEN

Las prioridades fisiológicas de las plantas varían a largo de su vida, lo cual puede repercutir en la cantidad de recursos y estructuras destinados a la defensa contra los herbívoros. Sin embargo, pocos trabajos han evaluado los cambios ontogenéticos en defensas físicas, químicas y bióticas simultáneamente. Los objetivos de este trabajo fueron: (1) determinar si existen cambios ontogenéticos en los distintos mecanismos de defensa directa e indirecta que presenta *Turnera ulmifolia* contra sus herbívoros, (2) detectar si existen disyuntivas ontogenéticas en la producción de dichas defensas y (3) conocer la relación entre las trayectorias ontogenéticas y los niveles de daño foliar durante el desarrollo de las plantas. Debido al cambio en los compromisos fisiológicos, morfológicos y de otras funciones durante el ciclo de vida de la planta, se espera encontrar cambios en los distintos mecanismos de defensa evaluados y en la estrategia global de defensa que despliega *Turnera ulmifolia* contra la herbivoría. El estudio se realizó en una población establecida en La Mancha, Veracruz. Durante seis censos bimestrales (junio 2009-junio 2010) se registró el nivel individual de daño por herbivoría y el crecimiento en tres estadios ontogenéticos: juveniles, pre-reproductivas y reproductivas. También se registraron distintos mecanismos de defensas: física (número y estructura de tricomas y masa foliar específica), química (glucósidos cianogénicos y taninos) y biótica (patrullaje de hormigas, número y estructura de nectarios extraflorales (NEF) y cantidad y calidad del néctar extrafloral). Se encontró que tanto el nivel de daño foliar como las defensas, con excepción de la masa foliar específica, variaron en función del estadio. A lo largo del desarrollo el nivel de defensa fue inversamente proporcional a la cantidad de daño recibido y directamente proporcional a la edad de la planta por lo que las juveniles reciben mayor daño foliar y presentan menores niveles de defensa. Asimismo, encontramos que dicha población es acianogénica y carece de taninos, al menos en los estadios registrados. Por lo tanto se concluye que las plantas

modifican su nivel y estrategia de defensa contra los herbívoros de acuerdo con su desarrollo, es decir, existen diferencias en la trayectoria ontogenética de la defensa entre los estadios estudiados. Además, esta población muestra un patrón estacional en el que los niveles máximos de crecimiento, reproducción, daño por herbivoría y densidad de NEF/hoja coinciden con la época de lluvias, lo cual se explica como un efecto conjunto de la presión ejercida por los herbívoros, la mayor disponibilidad de recursos y el alto valor adaptativo de las hojas apicales asociadas a las estructuras reproductivas.

INTRODUCCIÓN

La herbivoría es la relación ecológica que se suscita cuando un animal (herbívoro) se alimenta de una planta, lo cual generalmente produce efectos negativos de tipo y dimensión variables para ésta (Strauss y Zangerl, 2002; Begon *et al.*, 2006). Entre las diversas clases de folívoros, los más estudiados son aquellos masticadores que dejan rastros conspicuos de su actividad en las hojas (Barone y Coley, 1996). Algunas de las consecuencias negativas de la herbivoría foliar sobre las plantas son la pérdida de tejido fotosintético, la reducción de recursos, el riesgo potencial de infecciones por hongos, bacterias y virus en las heridas y frecuentemente una disminución en la adecuación (Coley y Barone, 1996; Strauss y Zangerl, 2002). Sin embargo, la magnitud de los daños varía ampliamente según las especies involucradas (De la Cruz y Dirzo, 1987; Barton, 2007; Hanley y Sykes, 2009), el hábitat (Aide, 1993; Coley y Barone, 1996; Barrett y Agrawal, 2004), la fenología (Aide, 1992; Aide, 1993, Coley y Barone, 1996) y el estadio ontogenético (Clark y Clark, 1985; Aide, 1993; Brrett y Agrawal, 2004; Barton, 2007) en que las plantas son atacadas, entre otros factores.

Para lidiar con la herbivoría, las plantas han desarrollado tres mecanismos que les permiten amortiguar su detrimento en la adecuación: la tolerancia, la resistencia y el escape (Strauss y Zangerl, 2002; Boege y Marquis, 2005). El escape consiste en la manifestación de características que impidan a los fitófagos encontrar a la planta (Boege y Marquis, 2005). El mecanismo de tolerancia consiste en la expresión de características que reducen el impacto negativo del daño foliar sobre la adecuación vegetal (Boege y Marquis, 2005; Barton, 2008). Por último, la resistencia consiste en la expresión de características (defensas directas e indirectas) que reducen el atractivo o la calidad nutricional de la planta para los herbívoros. Las defensas directas disminuyen la calidad nutricional y la apetecibilidad de las plantas, tal como es el caso de las espinas, tricomas, metabolitos secundarios y del follaje corioso (Boege y Marquis, 2005). Las defensas indirectas

reducen la calidad de la planta como refugio para los herbívoros y generalmente involucran al tercer nivel trófico (depredadores insectívoros). Al expresar ciertos atributos que atraen a depredadores o parasitoides las plantas incrementan la eficiencia de forrajeo de estos enemigos naturales y por tanto el riesgo de depredación en los herbívoros (Boege y Marquis, 2005). Algunos ejemplos de este tipo de defensas son la emisión de volátiles que atraen parasitoides y depredadores o las recompensas alimenticias y de refugio como es el caso de los nectarios extraflorales y domacia en plantas mirmecófitas que promueven una interacción mutualista con las hormigas (Strauss y Zangerl, 2002; Del Val y Dirzo, 2003; Boege y Marquis, 2005).

Defensas físicas

La producción de defensas físicas depende de la actividad fotosintética, por lo que se predice que la dureza foliar, espinas y tricomas se incrementen con la edad de la planta, ya que la actividad fotosintética de la planta aumenta con el desarrollo (Barton y Koricheva, 2010).

Dureza foliar

La dureza foliar dificulta el consumo para los herbívoros, haciendo de la planta un alimento menos atractivo para los éstos, por lo que las plantas con follaje más corioso son capaces de enfrentar con mayor éxito el daño foliar que aquellas menos coriosas (Coley, 1983). Durante su ciclo de vida, los insectos fitófagos presentan distintos caracteres en torno a la dinámica alimentaria, lo cual implica cambios ontogenéticos considerables en la morfología bucal, estrategia y conducta alimenticia (Hochuli, 2001). Conforme los herbívoros crecen, poseen mayor tamaño, masa muscular y fuerza en las mandíbulas (Hochuli, 2001). La dureza foliar ha sido catalogada como una de las defensas más eficientes por diversos autores (Coley, 1983; Aide 1993; Coley y Barone, 1996), muchos de los cuales la estiman indirectamente mediante la masa foliar específica, que es el cociente del peso por superficie foliar de una planta (Reich *et al.*, 1991; Day *et al.*, 2000; Webber y Woodrow, 2008; Webber y Woodrow, 2010).

Tricomas foliares

Los tricomas son estructuras pilosas que extruden de la epidermis (Jackson, 1953) y que están constituidos por tres secciones principales: un pie, que es la porción del tricoma que se encuentra entre el resto de las células de la epidermis; células accesorias adyacentes al pie y un cuerpo que es la porción que extrude de la superficie epidérmica. En los tricomas glandulares el cuerpo puede diferenciarse en pedicelo y glándula apical o cabeza. De manera general puede clasificarse la enorme diversidad de tricomas como glandulares y no glandulares con base en un criterio funcional: su carácter secretor. Los tricomas no glandulares carecen de tal función y pueden ser uni o pluricelulares, simples o estrellados, lisos u ornamentados. Generalmente están lignificados y en la madurez carecen de protoplasma (González y Arbo, 2004). Los tricomas glandulares son estructuras pluricelulares que presentan un pie y un cuerpo formado por un pedicelo y una cabeza secretora. En la familia Turneraceae, estos tricomas se desarrollan a partir de la diferenciación de una célula inicial con un ápice redondeado que se proyecta de la epidermis y sufre varias divisiones mitóticas. Al madurar frecuentemente se colapsa la cabeza pero la cutícula permanece intacta (González y Arbo, 2004). Además de los tricomas existen otras estructuras similares que extruden de la epidermis, denominadas emergencias y en las cuales proliferan las células subepidérmicas; están formadas por un pedestal que es la porción basal de la estructura, equivalente al pie (González y Arbo, 2004).

Numerosos estudios previos demuestran que la función protectora de los tricomas contra los herbívoros en una gran cantidad de especies comestibles como soya (Gutschick, 1999), jitomate (Goffreda, 1990; Sánchez-Peña *et al.*, 2004) y papa (Wagner, 1991), así como en plantas fósiles (Krings, *et al.*, 2002) y muchas otras especies (Andres y Connor, 2003; Gruner *et al.*, 2005; Handley *et al.*, 2005; Lill *et al.*, 2006; Oiginagbe *et al.*, 2006; Cardoso, 2008; Gonzáles *et al.*, 2008). Tanto los tricomas glandulares como los no glandulares protegen a las plantas del consumo por herbívoros. Los primeros secretan sustancias que pueden tener efectos tóxicos, irritantes o

compuestos pegajosos que atrapan e inmovilizan a los herbívoros (Wagner, 1991). Los tricomas no glandulares ahuyentan a los herbívoros ya que dificultan su movimiento por la planta, la oviposición, la alimentación y en algunas ocasiones sus formas de picos o ganchos lastiman directamente a las larvas (Wagner, 1991; Cardoso, 2008).

El mecanismo genético del desarrollo de los tricomas está muy bien caracterizado, mientras que las bases genéticas que determinan su densidad han sido escasamente estudiadas y prácticamente nada se sabe acerca de la genética involucrada en el posible cambio de la arquitectura o la densidad de los tricomas durante la ontogenia (Mauricio, 2005). En muchas especies el tipo y densidad de tricomas varían en hojas de distinta edad, las cuales tienen distinto grado de resistencia al daño por herbívoros (Valkama, 2004; Mauricio, 2005). Los procesos ontogenéticos tienen un importante control en la regulación de características anatómicas relacionadas con la defensa directa, como es el caso de la evolución en la densidad de los tricomas. Los procesos relacionados con la expresión de tricomas en *Arabidopsis thaliana* están codificados por el cromosoma dos. Sin embargo, su expresión se modifica de acuerdo con la fase del desarrollo en que se halle la planta, lo cual apunta a un control ontogenético no lineal más que a uno genético o cromosómico constante durante la vida (Mauricio, 2005).

Defensas químicas

En el ámbito de las defensas químicas resulta complicado generalizar un patrón debido a la gran diversidad del metabolismo secundario de las plantas (Barton, 2007; Barton y Koricheva, 2010). En algunos casos los compuestos se producen y almacenan sólo en tejidos jóvenes, mientras que en otros se requieren estructuras especializadas, presentes en estadios posteriores, para su síntesis o almacenamiento (Barton y Koricheva, 2010). En este trabajo se estudió únicamente la presencia de glucósidos cianogénicos y taninos, ya que estudios previos demostraban la cianogénesis en otras poblaciones de *Turnera ulmifolia* en la isla de Jamaica (Schappert y Shone, 1995). Los taninos

fueron incluidos como una alternativa debido a su ubicuidad en la mayoría de las especies vegetales.

Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son compuestos inertes y solubles en agua que se almacenan en vacuolas y liberan ácido cianhídrico (HCN) ante un daño tisular cuando las enzimas hidrolíticas entran en contacto con los glucósidos (Seigler, 1991); así, reducen el nivel de daño en las plantas ya que sus derivados atacan a los patógenos y herbívoros (Seigler, 1991; Schappert y Shone, 1995). La toxicidad de estos compuestos estriba en la liberación de cianuro, compuesto que forma complejos con proteínas hemo como la citocromo oxidasa, fundamental en la cadena respiratoria (Seigler, 1991).

La cianogénesis es la forma de defensa química más estudiada en las plantas (Schappert y Shone, 1995) y está presente en casi todos los grupos de plantas vasculares: helechos, gimnospermas y angiospermas (Seigler, 1991). Los glucósidos cianogénicos representan una porción importante de los compuestos nitrogenados de una planta. En algunas ocasiones fungen como fuente de nitrógeno durante la germinación, cuando se convierten en otros metabolitos empleados directamente en el desarrollo de las plántulas (Seigler, 1991). Además de las plantas, algunos animales también pueden presentar glucósidos cianogénicos y son especialmente frecuentes en lepidópteros, lo que puede deberse a una síntesis *de novo* o a un secuestro de los compuestos a partir de material vegetal consumido (Seigler, 1991). Existen pocos reportes de los cambios ontogénicos de este mecanismo defensivo, pero algunos muestran altos niveles de cianogénesis en estadios inmaduros por lo que se ha propuesto como una defensa en etapas pre-reproductivas (Seigler, 1991; Schappert y Shone, 1995).

Taninos

Químicamente, los taninos son compuestos con muchos grupos fenólicos que se caracterizan por un alto peso molecular ($PM > 500$) y por ser solubles en agua (Hagerman y Butler, 1991; Hagerman, 2002). Feeny (1970) sugirió que los metabolitos secundarios, y en particular los taninos, tienen un papel importante en determinar los patrones de daño por herbívoros. Pronto estos compuestos fueron conceptualizados como armas en la carrera coevolutiva entre las plantas y sus herbívoros (Hagerman y Butler, 1991). Funcionalmente, su característica más importante es su capacidad de unión a proteínas, que es la explicación fisicoquímica parcial de su actividad biológica (Hagerman y Butler, 1991). Ahora se piensa que el efecto negativo de los taninos sobre insectos herbívoros estriba más bien en sus propiedades oxidativas, ya que los compuestos tanino-proteína son desestabilizados por el pH intestinal de los insectos (Salminen y Karonen, 2011).

Defensas bióticas***Mirmecofilia***

La mirmecofilia es una interacción en la cual participan hormigas y plantas (Del Val y Dirzo, 2003). En esta relación las hormigas reciben refugio en las estructuras modificadas de las plantas y alimento gracias a la producción de nectarios extraflorales (NEF) y gránulos nutritivos, al tiempo que ellas proveen protección y defensa contra fitófagos potencialmente dañinos (Del Val y Dirzo, 2003; Heil, 2007). Se cree que esta interacción biótica ha evolucionado repetidamente por lo menos desde hace 35 millones de años, datación basada en hojas fósiles que aún conservan estructuras peciolares muy similares a los NEF actuales (Permberton, 1992).

Los gránulos nutritivos son pequeñas estructuras ubicadas en las hojas que contienen sustancias alimenticias como proteínas y lípidos que las hormigas cosechan y llevan hasta su colonia (Beattie y Hughes, 2002). Los nectarios extraflorales, componente fundamental de la mirmecofilia, son órganos o tejidos vegetales secretores de una solución acuosa, dulce y nutritiva denominada néctar que presentan heterogeneidad estructural y de origen, al tiempo que se hallan

involucrados en la defensa contra herbívoros (Jackson, 1953; McLean e Ivimey-Cook, 1956; Bentley y Elias, 1983). El néctar está compuesto por agua, carbohidratos (principalmente sacarosa, fructosa y glucosa) y, en ocasiones, aminoácidos u otros compuestos orgánicos (Bentley, 1977). Caspary (1848) clasifica los nectarios con base en un criterio topográfico en florales y extraflorales. Los primeros se ubican en estructuras reproductivas de la flor, tales como pétalos, sépalos, cáliz, corola, frutos, anteras, receptáculo y pistilo (Bentley y Elias, 1983). Los extraflorales, por su parte, son aquellos localizados en cualquier otra estructura vegetativa, como hojas, brácteas, peciolo, raquis, espinas, estípulas y tallos (Bentley, 1977; Bentley y Elias, 1983). Delpino (1875) clasifica los nectarios con un criterio funcional en nupciales y extranupciales. Los nectarios nupciales son aquellos involucrados en la polinización, mientras que los extranupciales pueden participar en otras funciones tales como la atracción de depredadores o parasitoides que disminuyen los niveles de daño por herbívoros (Bentley y Elias, 1983; Narbona *et al.*, 2010). No obstante, existen excepciones a este patrón funcional en donde insectos no involucrados en la polinización consumen el néctar floral (por ejemplo, robadores de néctar y hormigas oportunistas). También hay casos en los que los nectarios cumplen tanto funciones nupciales como extranupciales (Narbona *et al.*, 2010). Los nectarios están conformados por tres tipos básicos de tejidos: tejido glandular o secretor, tejido subglandular o parenquimatoso y tejido vascular (Bentley y Elias, 1983).

Entre las angiospermas, los nectarios extraflorales son más comunes en las dicotiledóneas, y las familias Passifloraceae y Leguminosae tienen la mayor cantidad de especies con NEF (Bentley, 1977; Fahn, 1979). Dentro de las monocotiledóneas, las Gramineae registran menor cantidad de nectarios extraflorales (Fahn, 1979).

Los NEF son un componente importante y en muchas ocasiones necesario para mantener la relación mutualista con hormigas y avispas parasitoides (Wooley *et al.*, 2007; Narbona, 2010). Sin embargo, son muy pocos los estudios que hablan de la variación intraespecífica de los nectarios y aún menos los que relacionan la edad de la planta con los cambios en la densidad de nectarios

(Wagner *et al.*, 2007; Wooley *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2010) o calidad del néctar extrafloral. Según Wooley y colaboradores (2007), existe sólo un artículo publicado que habla de la heredabilidad de las características de tamaño y densidad de dichos nectarios (Rudgers, 2004). Hasta ahora se han hecho muy pocos estudios para concluir sobre patrones generales en lo que cuanto a los cambios ontogenéticos en la expresión de NEF, (Barton y Koricheva, 2010), pero es probable que lo más común sea observar un incremento en esta defensa biótica durante la ontogenia (Del Val y Dirzo, 2003; Llandres *et al.*, 2010). En todos los casos conocidos de la mirmecofilia, las plantas no inician su vida con los elementos necesarios para desplegar la defensa indirecta (Llandres *et al.*, 2010). Por lo tanto, la ausencia de tales mecanismos en estadios tempranos hace suponer que las plantas jóvenes dependen de otros mecanismos para su protección, como podrían ser las defensas directas (Llandres *et al.*, 2010) y la tolerancia (Del Val y Dirzo, 2003).

Trayectorias ontogenéticas de la defensa

La intensidad de ataque que recibe una planta está determinada por la sincronía en la fenología de los ciclos de vida de los consumidores con los de la planta, la eficiencia de la depredación de los enemigos naturales de dichos fitófagos y los mecanismos de defensa de las plantas (Boege y Marquis, 2005). Debido a que estas características no son constantes a lo largo del tiempo, es lógico suponer que el nivel de daño que recibe una planta tampoco lo sea durante su desarrollo. Las teorías de asignación de recursos que explican la distribución en distintos órganos y funciones se basan en tres supuestos: a) la planta dispone de una cantidad limitada de recursos; b) los recursos destinados a la parte o función A ya no pueden ser asignados a la parte o función B, lo cual da lugar a c) disyuntivas: situaciones en las que la planta se ve obligada a asignar recursos a una cierta parte o función comprometiendo el desarrollo de otra parte o función (Stamp, 2003; Weiner, 2004; Boege y Marquis, 2005). Con base en ello la teoría de la defensa óptima (T.D.O.) predice que la distribución de recursos depende de tres factores: la historia de vida, el ambiente y las disyuntivas tanto

intracelulares como entre las distintas partes de la planta. La T.D.O. supone también que la “decisión” fisiológica se toma con base en la parte o función que provee a la planta de la mayor adecuación (Boege y Marquis, 2005).

La ontogenia y la fenología de la planta son factores que alteran los compromisos fisiológicos de las plantas creando, en muchas ocasiones, disyuntivas de asignación de recursos (Weiner, 2004; Boege y Marquis, 2005). Por esta razón, las prioridades fisiológicas de cada etapa de desarrollo pueden supeditar la producción de defensas a otras funciones como el crecimiento o la reproducción (Boege, 2005). Si la selección natural favorece una disminución en la proporción costo-beneficio de la defensa para maximizar la adecuación, se espera también una estrategia no constante de defensa por parte de la planta a lo largo de su ontogenia (Boege y Marquis, 2005). Algunos de los cambios ontogénéticos relevantes para la resistencia ante el daño foliar en las plantas incluyen cambios en la forma de las hojas, en la filotaxia, en el crecimiento lateral de ramas, en la cantidad de espinas, en la composición química (fenoles, glucósidos cianogénicos, alcaloides, proteínas y enzimas defensivas), en la eficiencia fotosintética y en la producción de estructuras reproductivas (Boege, 2005; Barton y Koricheva, 2010).

Para explicar los cambios en el nivel de defensa y daño foliar de las plantas a lo largo de su ontogenia existen dos teorías que predicen patrones opuestos: la teoría de asignación de recursos (T.A.R.) predice que factores intrínsecos como la adquisición y asignación de recursos limitan la producción de metabolitos secundarios en plantas jóvenes y postula un incremento en la defensa a lo largo de la ontogenia (Feeny, 1975, 1976; Rhoades y Cates, 1976; Rhoades, 1979; Coley *et al.*, 1985). La otra se deriva de la T.D.O. y postula factores extrínsecos, como la elección de tejidos jóvenes por parte de los herbívoros para explicar altos niveles de resistencia en estadios tempranos, muy vulnerables y cuya supervivencia es crucial para la adecuación de la planta (McKey, 1974, 1979; Rhoades, 1979; Barton y Koricheva, 2010).

En una revisión reciente, Barton y Koricheva (2010) describen patrones complejos de los cambios en la defensa y sus consecuencias sobre la herbivoría durante la ontogenia de las plantas. Mediante el uso de un meta-análisis los autores concluyen que con los estudios disponibles no puede establecerse un patrón general y que los cambios ontogenéticos en la defensa varían dependiendo de la forma e historia de vida de las plantas, así como del tipo de defensa en cuestión. Por lo tanto, reconstruyen una serie de patrones particulares para tres distintas formas de vida (plantas leñosas, forbias y pastos) considerando las defensas físicas y químicas. Durante la transición de juveniles a reproductivas existen claros patrones de incremento en formas plásticas de la defensa, como es la defensa inducida. Puesto que todos los estudios explorados en este sentido presentan el mismo tipo de herbívoros (insectos), se piensa que los cambios en el patrón de defensa se deben únicamente a la forma de vida de la planta. Para las forbias el patrón de defensa y el nivel de daño foliar en la transición de juvenil a reproductiva es el siguiente: las juveniles presentan mayor daño que las reproductivas, existe una tendencia de incremento en los tricomas y la defensa química no mostró patrón alguno debido al reducido tamaño de la muestra disponible. Fritz y colaboradores (2001) aportan otro ejemplo en poblaciones de *Salix sericea*, *Salix eriocephala* y sus híbridos la reducción en la apetecibilidad y la resistencia a moluscos fitófagos a lo largo de la vida de las plantas se deben a incrementos ontogenéticos en glucósidos fenólicos y taninos (Fritz *et al.*, 2001). Otro factor que puede afectar la densidad de herbívoros presentes durante el desarrollo de las plantas es el tercer nivel trófico, ya que los cambios ontogenéticos en la arquitectura vegetal (por ejemplo, largo de las ramas y altura) hacen más conspicuas a plantas más grandes para los depredadores insectívoros (Boege, 2005).

Los diversos mecanismos de defensa contra la herbivoría (físicos, químicos y bióticos con sus respectivas variedades) representan distintas soluciones evolutivas a la misma presión. La expresión de un tipo de defensa no sólo depende de la proporción costo-beneficio de ésta en términos de adecuación, sino también del escenario ecológico bajo el cual es más conveniente

desplegarla. Así, la heterogeneidad ambiental puede favorecer la expresión simultánea o producir disyuntivas entre distintos mecanismos de defensa en momentos particulares del ciclo de vida de las plantas. A ello pueden aunarse factores extrínsecos -como la estacionalidad- o intrínsecos -como las prioridades de adquisición y asignación de recursos- que ejercen una fuerte presión de selección sobre la expresión de aquellos caracteres que otorgan a la planta mayor adecuación. Como consecuencia, se espera que las plantas produzcan diferentes trayectorias ontogenéticas en cada tipo de defensa (Boege *et al.*, 2007).

Bajo distintas condiciones o escenarios ecológicos se espera que evolucionen distintas trayectorias, patrones y disyuntivas ontogenéticas (Boege *et al.*, 2007). En general se ha considerado que la expresión conjunta de más de un mecanismo defensivo es redundante, lo que muchas veces ha llevado al planteamiento de escenarios con estrategias mutuamente excluyentes. Sin embargo, recientemente se han propuesto escenarios de estrategias mixtas de defensa (EMS). Fornoni y colaboradores (2004) explican distintos resultados de la evolución conjunta de varios mecanismos defensivos. El primero de ellos sugiere la existencia de un solo pico adaptativo que representa organismos que expresan completamente uno de los tipos de defensa. En este caso la selección natural favorecerá la expresión de la estrategia menos costosa, ya que expresar varias se considera redundante -en lo que a beneficios se refiere- y muy costoso. El segundo escenario plantea la existencia de EMS, bajo el cual un organismo expresa niveles intermedios de varios mecanismos simultáneamente. La existencia de este esquema de EMS puede explicarse como una estrategia evolutivamente estable mantenida por la selección natural, o bien por restricciones genéticas o selectivas para la evolución de organismos que expresen completamente un tipo de defensa.

Boege y colaboradores (2007) presentan un modelo basado en disyuntivas ontogenéticas para explicar los cambios en las trayectorias de dos mecanismos de defensa (tolerancia y resistencia, evaluada mediante la concentración de glucosinolatos) desde una perspectiva evolutiva.

Si la función de los dos mecanismos de defensa es redundante y existe una disyuntiva en el uso de los recursos para su expresión, se espera que cuando la trayectoria de un mecanismo se exprese en determinada dirección en función de sus beneficios, la trayectoria ontogenética de la otra característica se exprese en dirección opuesta. Esto tendría que promover una correlación negativa entre ambas trayectorias. Las trayectorias fueron demostradas experimentalmente en *Raphanus sativus* (Boege *et al.*, 2007).

La forma de vida de las plantas también influye sobre el patrón ontogenético de la defensa que expresan (Boege *et al.*, 2007; Barton y Koricheva, 2010). En plantas anuales se esperaría una correlación negativa entre mecanismos, es decir, que muestren una disyuntiva. Esto se presupone pues debido a su rápido desarrollo, las plantas anuales carecen de reservas y no tienen recursos suficientes para la expresión simultánea de dos estrategias defensivas. En contraste, una correlación positiva entre mecanismos de defensa implicaría el despliegue de ambas estrategias en una misma trayectoria y se asocia a plantas perennes debido a su posibilidad de acumular recursos a lo largo de su vida (Boege *et al.*, 2007). Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan evaluado simultáneamente los cambios ontogenéticos de distintos mecanismos de defensa para determinar la existencia de disyuntivas ontogenéticas. En este contexto, los objetivos de este trabajo son (1) determinar si existen cambios ontogenéticos en los distintos mecanismos de defensa directa e indirecta contra los herbívoros que presenta *Turnera ulmifolia*- una planta herbácea mirmecófita que habita dunas costeras-, (2) detectar si existen disyuntivas ontogenéticas en su producción de defensas, y (3) conocer la relación entre dichos cambios y los niveles de daño foliar.

De manera particular se abordaron cuatro preguntas: (1) ¿Existen cambios ontogenéticos en el nivel de daño foliar que recibe *T. ulmifolia*? (2) ¿Qué cambios ontogenéticos ocurren en las defensas físicas, en particular en la densidad y tipo de tricomas foliares así como en la dureza de las hojas? (3) ¿Existen cambios ontogenéticos en la concentración foliar de glucósidos cianogénicos y

taninos? (4) ¿Existen cambios ontogenéticos en la defensa indirecta vía la mirmecofilia y en los mecanismos de secreción del néctar extrafloral? Debido al cambio en los compromisos fisiológicos y arquitectónicos durante el ciclo de vida de la planta, se espera que existan cambios en los distintos mecanismos de defensa evaluados, así como un cambio en la estrategia global de defensa contra la herbivoría que despliega *Turnera ulmifolia*.

SITIO DE ESTUDIO

El estudio se desarrolló en un matorral de dunas arenosas en el Centro de Investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA), ubicado en la costa del estado de Veracruz, en el Golfo de México (19° 35' N, 96° 22' W, a una elevación <100 m) (Moreno-Casasola y Monroy, 2006). Presenta un clima cálido subhúmedo con régimen de lluvias de verano (junio a septiembre). La temperatura media anual oscila entre 21°C en enero y 27.3°C en junio y la precipitación media anual es de 1286 mm. Esta zona se encuentra bajo la influencia de los vientos alisios que aportan humedad y determinan la precipitación (Travieso-Bello y Campos, 2006). Se reportan más de once comunidades vegetales distintas dentro de la estación biológica CICOLMA, de las cuales las mejor representadas son la selva baja caducifolia, la selva mediana subcaducifolia y las dunas costeras. Además, estas tres comunidades comparten muchas especies (Castillo-Campos y Travieso-Bello, 2006). La región es florísticamente bastante rica al concentrar 118 familias vegetales y más de 837 especies, de las cuales el 25% se ubica en las dunas costeras (Castillo-Campos y Travieso-Bello, 2006). El sistema de dunas costeras ubicado en CICOLMA es de suma importancia porque es el último remanente de este tipo de vegetación presente en los suelos arenosos del Golfo de México (Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2006). Además, más de 108 especies de hormigas asociadas con especies vegetales habitan en la región. A pesar de que el clima de La Mancha es muy estacional, razón por la que se esperaba una menor diversidad, la riqueza y diversidad de interacciones planta-hormiga en este sitio es sumamente alta en comparación con otros sitios estacionales del país (Martínez *et al.*, 2006).

Las dunas costeras son formaciones arenosas de origen eólico que se distribuyen a lo largo de la costa u orilla de los lagos (Ranwell, 1972; Moreno-Casasola, 1982); constituyen uno de los ambientes más dinámicos y están modeladas por procesos geomorfológicos (como la acción del viento) y biológicos (como la sucesión vegetal). La orientación de las dunas está determinada por los vientos dominantes, en el caso de La Mancha es norte-sur. Dichos vientos son muy fuertes entre

noviembre y febrero, por lo que a esta época se le denomina ‘temporada de nortes’. Las dunas de La Mancha son un sistema muy complejo topográficamente, ya que están formadas por una playa angosta, dunas embrionarias, un primer cordón de dunas paralelo al mar y dunas parabólicas con distinto grado de estabilización (Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2006).

El ecosistema de las dunas costeras es un mosaico de hábitats con distintas condiciones ambientales (humedad, movimiento de arena, pendiente y concentración de nutrientes) fuertemente influidas por la topografía y con una amplia variación espacio-temporal. En estos ambientes, el manto freático se encuentra a más de 1.5m de profundidad, fuera del alcance de la mayoría de las raíces vegetales; los suelos son pobres y con poca retención de agua. El disturbio principal es el movimiento de arena. La temperatura generalmente es alta, aunque presenta grandes variaciones diarias, que van desde 60°C a mediodía hasta menos de 20°C por las noches (Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2006). La heterogeneidad ambiental y las respuestas diferenciales de los organismos a ésta resultan en una distribución de parches dependiendo de su tolerancia y capacidad de supervivencia y crecimiento (Martínez *et al.*, 2006).

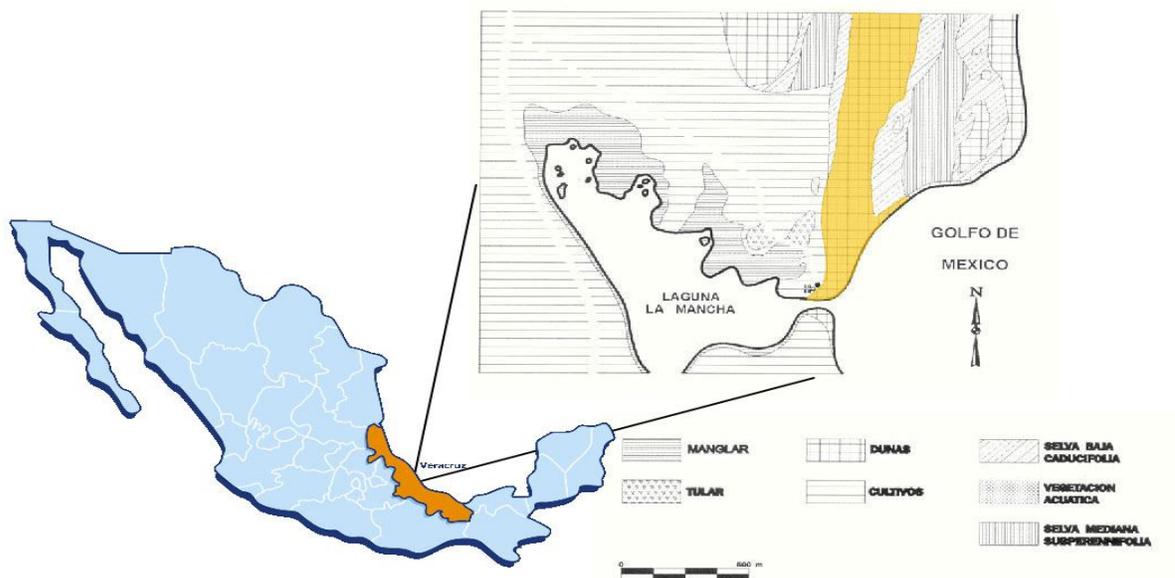


Figura 1. Mapa de la ubicación geográfica y distribución del sitio de estudio. En color naranja se muestra la zona de dunas muestreada.

SISTEMA DE ESTUDIO

Turnera ulmifolia, comúnmente conocida como escobilla japonesa, es un arbusto perenne de 0.4-1.2 m de altura, tallo ramificado y hojas alternas de lineares a ovadas con bordes dentados (Gama *et al.*, 1985). Sus flores son heterostilas, actinomorfas, aromáticas y de coloración variada: blancas, amarillas, rosadas o mixtas. Presentan ovario súpero y los pétalos están unidos en la base formando un tubo o hipanto. El fruto es una cápsula pequeña (4-9 mm de largo) cuya dehiscencia se da mediante tres valvas longitudinales y las semillas son ovoides, curvadas, foveoladas y de aproximadamente 3 mm de longitud (Maas *et al.*, 1997; Martínez, 1994; Gama *et al.*, 1985). Poseen nectarios florales y extraflorales (Cuautle y Rico-Gray, 2003; Elias *et al.*, 1975; Gama *et al.*, 1985). Los NEF de *T. ulmifolia* son foliares, pareados y opuestos, ubicados en el peciolo de las hojas en posición lateral (Elias *et al.*, 1975; Fig. 2). Esta planta pertenece al orden de las Malpighiales y ha sido recientemente ubicada dentro de la familia Passifloraceae, junto con todas las demás especies de la anterior familia Turneraceae (APG, 2009). Dentro de Passifloraceae ahora convergen tres tribus: Malesherbioideae (antes Malesheriaceae D. Don *nom. cons.*), Passifloroideae (antes Passifloraceae) y Turneroideae (antes Turneraceae de Candolle *nom. cons.*) y *T. ulmifolia* pertenece a la tercera (Stevens, 2011).

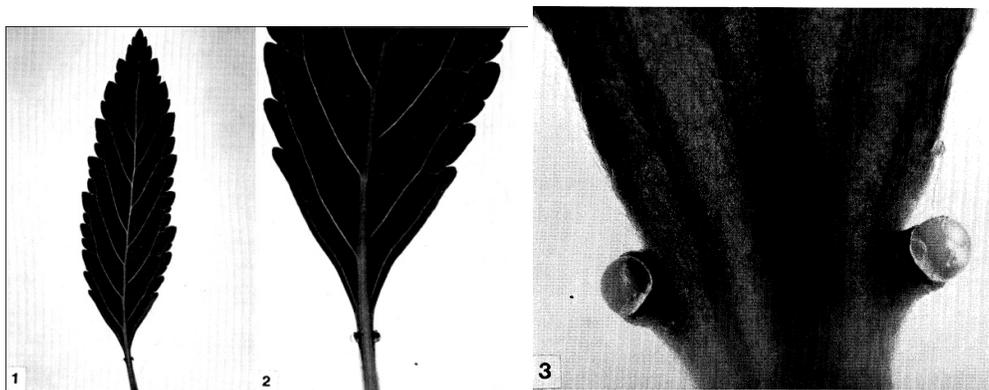


Figura 2. Topología peciolar de los NEF de *Turnera ulmifolia* así como su carácter pareado, lateral y opuesto y la forma de copa.

Tomadas de Elias *et al.* (1975).

Esta especie se presenta en las dunas estabilizadas donde la comunidad vegetal es cerrada y generalmente prolifera en los que también se observan otras especies arbóreas y arbustivas como: *Acacia macracantha*, *Bursera simaruba* y *Randia laetevirens* (Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2006). Además de esta especie, existe otra del mismo género en CICOLMA: *Turnera diffusa* (Castillo-Campos y Travieso-Bello, 2006).

Los principales consumidores del néctar extrafloral de esta planta son tres grupos de insectos: avispas depredadoras (*Polistes instabilis* y *Polybia occidentalis*), hormigas (*Camponatus platanus*, *Camponatus abdominalis*, *Crematogaster brevis-pinosa*, *Conomyrma* sp., *Pseudomyrmex* sp. y *Forelius* sp.) y abejas (*Apis mellifera*) (Cuautle y Rico-Gray, 2003). También se sabe que buena parte del éxito reproductivo, adecuación, protección contra herbívoros, dispersión y viabilidad de las semillas depende del papel de las hormigas y avispas que visitan y se alimentan de del néctar extrafloral de *T. ulmifolia*. El herbívoro más importante y destructivo de *T. ulmifolia* es la larva de una especie de lepidóptero *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) que no rebasa los 50 mm de tamaño corporal. Aunque es posible encontrar esta mariposa todo el año, su pico de actividad fitofágica sobre *T. ulmifolia* ocurre entre junio y agosto. El número máximo de larvas encontradas por planta es de tres; las cuales son suficientes para defoliar por completo un individuo (Cuautle y Rico-Gray, 2003).

Entre las familias de plantas especialmente cianogénicas destaca Passifloraceae (Seigler, 1991). Se han estudiado muchas especies de esta familia y se conoce la presencia de cianogénicos y glucósidos cianogénicos ciclopentanoides en muchas de éstas. Sin embargo, es crucial probar la cianogénesis de cada población, ya que se han reportado distintos grados de cianogénesis en poblaciones cercanas, llegando algunas incluso a ser acianogénicas (Schappert y Shone, 1995).

Los detalles antes mencionados hacen de *T. ulmifolia* un sistema ideal para la revisión y comparación de los mecanismos de defensa directa e indirecta a través de tres etapas de su ciclo de

vida. Las etapas ontogenéticas estudiadas fueron: juvenil (tallo < 15 cm.), pre-reproductiva (tallo > 15 cm pero sin estructuras reproductivas ni cicatrices de reproducción) y reproductiva (tallo > 15 cm y con estructuras o cicatrices reproductivas). También se determinaron dos estadios foliares: jóvenes y maduras. Las primeras se caracterizan por no haber expandido completamente el peciolo y presentan, por ende, la base del limbo ligeramente curvada. Las hojas maduras se caracterizan por tener un peciolo alargado, completamente expandido y de base extendida.

MÉTODOS

Daño foliar y crecimiento

Para cuantificar el nivel de daño foliar y el crecimiento en los tres estadios ontogenéticos de la población se realizaron seis censos bimestrales durante un año (junio 2009-junio 2010). En estos censos se registraron 30 plantas juveniles, 30 pre-reproductivas y 30 reproductivas de *T. ulmifolia*. Cuando algún individuo cambió de estadio se le reubicó en el grupo correspondiente y se reclutó otro individuo nuevo para el estadio anterior.

Se determinó la tasa de crecimiento de los individuos a partir de dos parámetros: altura y número de hojas. La altura de cada planta se registró desde el nivel del suelo hasta el ápice del brote. En el conteo del número de hojas se consideraron hojas jóvenes y maduras, mas no primordios foliares. Para calcular el incremento neto en altura y número de hojas entre los distintos censos se restaron los valores a los datos del censo previo: $A_{ij} = A_j - A_i$; siendo A_{ij} el incremento neto de altura entre el censo i y el censo j ; A_j los datos de altura en el censo j y A_i los datos de altura en el censo i . Lo mismo se realizó para el número de hojas. Los datos de altura y número de hojas se transformaron mediante la fórmula logarítmica: $\log(x+1)$ para lograr una distribución normal. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de bondad de ajuste Shapiro-Wilk. Se hizo un análisis de varianza múltiple (MANDEVA) para hallar el efecto del mes y del estadio sobre el crecimiento. Posteriormente, se hicieron análisis de varianza univariados (ANDEVAs) entre los tres estadios para cada censo. Para estimar las diferencias entre estadios ontogenéticos se utilizaron pruebas de contrastes pareados *a priori*.

El nivel de daño foliar de cada planta en cada censo se estimó a partir del registro de 15 hojas maduras por individuo. Para asegurar que las hojas registradas proporcionaran una muestra homogénea de todas las regiones del arbusto se contó el total de hojas y este número se dividió entre 15, obteniendo así un número x . Posteriormente, se registró el daño cada x número de hojas. Si

la hoja x era una hoja nueva, se registraba ésta y la hoja madura inmediata a ésta. Si la hoja registrada presentaba daño por herbívoros, se medía el largo y ancho, y con ayuda de un acetato cuadrado a 0.5 cm^2 se determinaba el área dañada. Las hojas sin daño simplemente se reportaron con 0% de daño foliar.

Para calcular el área original de las hojas dañadas se midió con un escáner portátil CID, Inc. el largo, ancho y superficie foliar de 100 hojas sin daño elegidas aleatoriamente. A partir de estos datos se construyó la siguiente fórmula que permite predecir el área foliar de *T. ulmifolia* a partir del largo y ancho de sus hojas: $A.F. = 0.7 + (0.64 \cdot L \cdot A)$ ($F_{1,86} = 4214.406$, $P < 0.0001$; $r^2 = 0.97$), donde $A.F.$ es el área foliar (cm^2), L es el largo de la hoja (cm) y A el ancho de la hoja (cm). Así, a partir de los datos de largo y ancho tomados en el campo se estimó la superficie foliar original de cada hoja dañada restando a esta superficie el área foliar calculada con el acetato y se obtuvo el porcentaje de área foliar consumida por los herbívoros para cada hoja. Posteriormente, se calculó el nivel promedio de daño por planta para cada censo. Los datos se transformaron mediante la función del arcoseno para lograr una distribución normal. Se realizó un análisis de medidas repetidas para hallar el efecto del mes y del estadio sobre el nivel de daño foliar. Posteriormente, se realizaron ANDEVAs para cada censo. Las diferencias entre estadios ontogenéticos se cuantificaron a partir de contrastes pareados *a priori*. Se promedió el nivel de daño anual por planta y por estadios y después se realizó una ANDEVA con los valores anuales de daño foliar. Para estimar las diferencias entre estadios ontogenéticos se utilizaron pruebas de contrastes pareados *a priori*.

Tricomas foliares

Se estimó la densidad y morfología de los tricomas foliares. Para determinar la densidad de tricomas se colectó aleatoriamente una hoja por cada uno de los 64 individuos (22 juveniles, 19 pre-reproductivos y 22 reproductivos) durante junio del 2009. Éstas fueron prensadas en papel y una vez deshidratadas se fijaron cuatro puntos de 14 mm^2 por cada cara de la superficie foliar en los cuales fueron contados los tricomas unicelulares simples utilizando un microscopio estereoscópico

Carl Zeiss Stemi SV6. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de bondad de ajuste Shapiro-Wilk y no fue necesaria su transformación. Estos datos fueron analizados estadísticamente mediante ANDEVAs para hallar diferencias en la densidad de tricomas entre estadios y entre el haz y el envés de las hojas. Después, se realizaron pruebas de contrastes pareados *a priori* para estimar las diferencias entre estadios ontogenéticos y entre el haz y el envés.

La micromorfología de los tricomas foliares de *T. ulmifolia* se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Tras haber elegido aleatoriamente tres individuos juveniles, pre-reproductivos y reproductivos de *T. ulmifolia*. En junio del 2009 se colectaron hojas jóvenes y maduras de cada individuo, mismas que se preservaron por fijación en FAA (formol, ácido acético y formol; ver Anexos). El material fijado en FAA permaneció en el fijador por 8 meses. Posteriormente, se lavó con agua corriente y se dejó en agua por 30 min para eliminar restos del fijador. Tras el lavado, se deshidrató con una serie de alcoholes graduales según el procedimiento de López y colaboradores (2005) (Anexos: Tabla 1). El material se disecó estando en alcohol al 70%. Se cortó una tira foliar de 0.5 cm a la mitad de la lámina foliar respetando la vena media (ver Fig. 3) y se obtuvieron dos fragmentos para observar tricomas en el haz y envés de cada hoja, respectivamente. El material fue desecado a punto crítico y luego montado en cilindros de aluminio con cinta conductiva y fue cubierto con una aleación de oro-paladio para su observación.

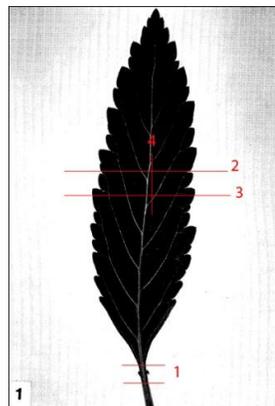


Figura 3. Esquema de la disección de la lámina foliar. Los números hacen referencia a la secuencia de cortes.

Dureza foliar

Para estimar la dureza o coriosidad foliar se colectó durante abril del 2010 aleatoriamente una hoja madura por cada una de las 69 plantas. Las hojas fueron colectadas por la tarde para minimizar la pérdida de agua de las hojas debido al calor matutino, evitando así alterar los datos del peso. Luego de ser colectadas, se midió el área de cada hoja con ayuda de un escáner CID, Inc., y se pesó con una balanza electrónica. La dureza se estimó tomando como referencia la masa foliar específica (M.F.E.) que ha sido previamente relacionada con la dureza foliar (Day *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2010; Carmona *et al.*, 2011). Dicha medida fue estimada por el cociente $MFE = \frac{P}{A} P$, donde MFE es la dureza, P el peso (g) y A el área (cm²).

La distribución normal de estos datos fue analizada mediante la prueba de bondad de ajuste Shapiro-Wilk y no fue necesario transformar los datos. Posteriormente se aplicó un ANDEVA para hallar diferencias en la dureza entre estadios, así como los respectivos contrastes *a posteriori* mediante pruebas de contrastes pareados *a priori* para estimar diferencias entre estadios ontogenéticos.

Glucósidos cianogénicos

La evaluación de la presencia de glucósidos cianogénicos se realizó mediante pruebas colorimétricas con ácido pícrico (Brinker y Seigler, 1989; Schappert y Shore, 1995) y picrato de sodio (Dirzo y Harper, 1982) sobre 101 individuos (17 juveniles, 28 pre-reproductivos y 56 reproductivos). Para ello, se colectaron seis discos de 0.6 cm de diámetro de cada hoja con un horador metálico, mismos que se depositaron en tubos Eppendorf de 2 µl debidamente etiquetados. Se tomaron muestras de dos hojas por cada planta para procesar una con cada técnica. Posteriormente se añadieron 7 µl de cloroformo a cada tubo y se maceró el tejido.

Se cortaron tiras de papel filtro de 9 × 13 mm. Para las muestras procesadas mediante el protocolo de ácido pícrico las tiras de papel se remojaron en una solución al 0.5% de ácido pícrico, se dejaron secar y después se pasaron por una solución al 5% de Na₂CO₃. De nuevo se dejaron secar

y se insertaron en los tubos con el material macerado, evitando que entraran en contacto directo con el tejido. Para las muestras procesadas mediante picrato de sodio se remojó el papel filtro en una solución conjunta de ácido pícrico (0.5%) y Na_2CO_3 (5%), se dejó secar y se insertó en el tubo con el material macerado, evitando que entraran en contacto directo con el tejido. Para ambas técnicas los papeles se prepararon en fresco, antes del ensayo. Los tubos se almacenaron por 24 h a temperatura ambiente (25-30°C) en gradillas (para mantener el papel filtro en forma vertical y evitar que entrara en contacto directo con el material vegetal, de modo que la reacción sólo ocurriese cuando el gas (HCN) se volatilizara hasta el papel) y en oscuridad (para evitar que por oxidación lumínica se generara un falso positivo). Tras la incubación se abrieron los tubos y se verificó el color del papel filtro. La reacción del ácido pícrico y del picrato del sodio con el cianuro genera una coloración marrón o café. Debido a que los papeles filtro permanecieron de color amarillo (el color del ácido pícrico) se detuvo el procedimiento.

Taninos

Se extrajeron y purificaron los taninos de *T. ulmifolia*. El material para la purificación de los taninos se colectó en septiembre del 2010 a partir de 20 plantas adultas de toda la población, tomando entre 10 y 15 hojas apicales por planta. El material para la cuantificación se colectó a partir de individuos de los tres estadios ontogenéticos, tomando también una hoja apical. Las hojas se almacenaron en bolsas de plástico transparente con etiquetas rotuladas a lápiz. Durante la colecta en campo, las hojas cortadas se guardaron en una bolsa negra dentro de una hielera para evitar la oxidación de los taninos y más tarde fueron transportadas en nitrógeno líquido. Posteriormente, fueron transferidas a bolsas de papel con pequeños agujeros debidamente etiquetadas en las que se liofilizaron durante 12-18 h y se almacenaron a -80°C para luego ser maceradas manualmente con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se pesó y almacenó en tubos Eppendorf y Nalgene a -80°C. Siempre que no estuvieran bajo congelación, es decir, en los procesos de etiquetado, traslado, pesado y organización el material se mantuvo en frío con hielo seco o hielo.

Para la extracción y purificación de taninos se tomaron cinco tubos con 1 g de tejido y a cada tubo se agregaron 45 ml de éter. Luego se agitaron manualmente y con un mezclador de vórtice (vórtex) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Este lavado se repitió tres veces y el sobrenadante se vació en un contenedor de desecho. Antes de utilizar el éter fue necesario realizar una prueba para asegurar la ausencia de peroxidasas mezclando 2 ml de éter + 2 ml de una solución de yoduro de potasio 2% (ver Anexo). El color café indica la presencia de peroxidasas. Posteriormente, se lavó el tejido con una solución de acetona-agua 70:30 (ver Anexo) cuatro veces. Para ello, a cada tubo se agregaron 10 ml de la solución de acetona, se agitaron con un mezclador de vórtice hasta romper el pellet y se homogeneizaron durante 45 s. Luego se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se colectó en tubos etiquetados. Transcurridos cuatro lavados, se centrifugaron todos los tubos una última vez a 3700 rpm a 4°C durante 15 min y el sobrenadante se añadió al obtenido previamente. El sobrenadante se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 10 min, se cuantificó y se mantuvo en congelación durante la noche. Al día siguiente, se agregaron 18 ml de DDH₂O por cada 25 ml de extracto para evitar la precipitación de fenoles. El extracto se evaporó en un rotovapor Büchi con bomba de vacío V-700, controlador V-850 y baño de calor B-491 entre 37-42°C y de 556-90 mbar durante cerca de 3 h.

La purificación se hizo utilizando como filtro Sephadex LH-20, mismo que se preparó en una suspensión con 800ml de etanol absoluto una noche antes y se dejó en refrigeración a 4°C. Al día siguiente se resuspendió agitando y se agregó el extracto acuoso recuperado y en frío, agitando levemente por 3min. Se montó un kitasato con un embudo de filtro poroso de 2 l y se agregó la suspensión de Sephadex, el extracto acuoso y etanol absoluto. Una vez filtrados 2 l de etanol se paró el vacío y se realizó una prueba colorimétrica del filtrado con 2 gotas de sulfato férrico de amonio + 2 gotas de ferrocianuro de potasio + 2 gotas del filtrado en una placa de ensayo a la gota (ver Anexo). El lavado con etanol se continuó mientras la prueba arrojaba un color azul intenso o verdoso; pero en cuanto se tornó amarillento se removió el etanol restante por vacío hasta secar casi por completo el Sephadex. Con el embudo aún en el kitasato, se agregó la solución de acetona

y se inició el filtrado por vacío. Nuevamente se realizó la prueba colorimétrica para cada 250 ml de acetona filtrados. El extracto en acetona se cuantificó y almacenó en un matraz a 4°C por una noche. El Sephadex se resuspendió en 800 ml de etanol y se almacenó en un matraz tapado y en refrigeración.

Posteriormente, el extracto en acetona se evaporó en un rotovapor Büchi con bomba de vacío V-700, controlador V-850 y baño de calor B-491 entre 37-57°C y de 556-90 mbar durante cerca de 9.5 h. El extracto se colocó en tubos de Nalgene y se congeló a -80°C. Si el extracto no se congela por completo es necesario evaporar de nuevo ya que presenta acetona que impide su congelación. Las muestras fueron liofilizadas durante 4 días hasta evaporar el agua por completo, obteniendo desechos sólidos y compactos, que nuevamente se mantuvieron en congelación a -80°C.

Defensas bióticas

Nectarios extraflorales

Se registró el número de NEF por hoja, así como su anatomía y morfología en plantas de distintos estadios. La cuantificación de los NEF por hoja se realizó por conteo durante los censos de herbivoría y las hojas registradas fueron las mismas que se utilizaron para estimar el daño foliar por herbívoros. Se calculó el promedio de NEF/hoja/planta para cada censo. La distribución normal de estos datos fue verificada mediante la prueba de bondad de ajuste Shapiro-Wilk y no fue necesario transformar los datos. Se realizó un análisis de MANDEVA para evaluar el efecto del estadio y del mes en la densidad foliar de NEF. Posteriormente, se realizaron ANDEVAs para cada censo y para estimar las diferencias entre estadios ontogenéticos se utilizaron pruebas de contrastes pareados *a priori*.

La micromorfología de los nectarios extraflorales se estudió mediante microscopía electrónica de barrido y los cambios ontogenéticos en la anatomía mediante inclusiones en paraplast, cortes y tinción para luego ser observados mediante microscopía de luz (Fig. 4).

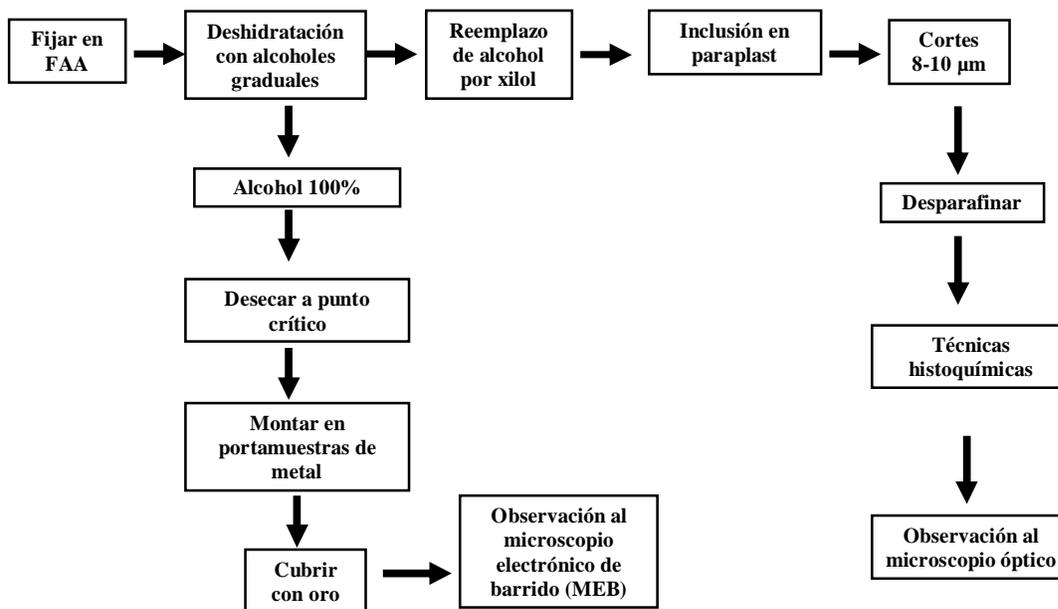


Figura 4. Diagrama que muestra la secuencia del análisis estructural de los NEF.

Tras haber elegido aleatoriamente 5 individuos juveniles, 5 pre-reproductivos y 5 reproductivamente maduros de *T. ulmifolia*, en junio del 2009 se colectaron hojas jóvenes y maduras de cada uno de ellos. Se utilizaron las mismas hojas que para la MEB de los tricomas. Éstas se preservaron por fijación en FAA y se procesaron conforme el método de López y colaboradores (2005) (ver Anexo). El material se disecó estando en alcohol al 70% para obtener de cada hoja un fragmento de peciolo con los dos NEF.

El tejido destinado a los análisis micromorfológicos mediante MEB se desecó a punto crítico y luego se montó en cilindros de aluminio con cinta conductiva y se cubrió con una aleación de oro-paladio para su posterior observación. El resto de las muestras que serían ocupadas para el estudio anatómico de los NEF se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales y se sometieron a un procedimiento de pre-inclusión e inclusión en paraplast (López *et al.*, 2005; ver Anexo: Tabla 2). Posteriormente, con navajas desechables se esculpió en los bloques una pirámide trunca que incluyera la muestra y éstos fueron cortados en un microtomo de rotación a 8 µm, previa refrigeración de 1 h a 4°C para endurecer el paraplast y facilitar su corte.

Los cortes fueron extendidos en un baño de agua con grenetina a 45°C y luego transferidos serialmente a portaobjetos. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 12 h y se seleccionaron las

laminillas adecuadas. Éstas fueron desparafinadas en una estufa a 56°C por 40 min y teñidas con safranina metilcelosolve-verde rápido (ver Anexo: Tabla 3). Una vez teñidas, se les aplicó resina Enthellan a las muestras, se cubrieron con cubreobjetos y se dejaron secar en la estufa de polimerización a 56°C por 48 h. Luego se observaron con microscopía de luz y se fotografiaron algunas laminillas. Las fotografías se retocaron utilizando Adobe Photoshop CS5.

Néctar extrafloral

En septiembre del 2010 se realizó una curva de producción de néctar para determinar el horario de los picos de producción en la población de estudio en la cual se cuantificaría la cantidad y concentración del néctar secretado. Durante dos días se registró la producción de néctar extrafloral en 20 plantas (9 juveniles y 11 reproductivas) cada 2 h durante 12 h (7:00, 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 19:00). Para ello, se aislaron 10 hojas apicales que fueron embolsadas la noche anterior al registro. El embolsado fue doble: primero se colocó una bolsa de organza cerrada con alambres plastificados para evitar el paso de hormigas a las hojas aisladas. Luego, se cubrió con una bolsa de papel encerado cerrada con cinta adhesiva para evitar que el néctar se humedeciera e incrementara su volumen con el rocío, o se deshidratará por el sol. Finalmente, se aplicó un poco de Tanglefoot sobre un trozo de cinta adhesiva enredada sobre el tallo para facilitar su remoción y evitar el contacto directo con el tallo de la planta. El Tanglefoot es una mezcla de distintas resinas que, de permanecer sobre los tallos y ramas, puede causar necrosis al tapar los estomas y evitar el intercambio gaseoso. El néctar de cada hoja se cosechó utilizando microcapilares de 1 μ l. El volumen se cuantificó midiendo la longitud de la columna de líquido en el capilar con un Vernier digital y la concentración de azúcares se estimó con un refractómetro (0-50°B). A partir de los datos obtenidos se obtuvo un volumen y concentración promedio por planta para cada horario utilizando el paquete de Microsoft Office Excel. El horario con la mayor producción de néctar se consideró como el pico de producción en el cual se registraron el resto de las plantas en días subsiguientes.

Una vez establecida la hora pico en la producción de néctar, ésta se determinó en 79 individuos (19 juveniles y 60 reproductivas) durante los dos días subsiguientes a la realización de la curva en septiembre del 2010. Para ello se aislaron pero no se embolsaron las 10 hojas apicales y durante el pico de producción (entre 11:00 y 13:00) se colectó y cuantificó el néctar, siguiendo también el protocolo anterior. No fue posible registrar individuos juveniles para la curva de producción ni para el pico de producción ya que los juveniles del censo anterior (junio del 2010) habían perecido o alcanzado el estadio pre-reproductivo para entonces y no se hallaron nuevo individuos de este estadio durante esta época del año. Sin embargo, el resto de los individuos muestreados eran individuos marcados y registrados en censos previos. Se calculó el volumen promedio de néctar y la concentración promedio de azúcares para cada planta. Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas ‘U’ de Mann Whitney.

Patrullaje de hormigas

El número de hormigas por planta se tomó como un estimador de la defensa mirmecofítica. Para ello, durante el censo de junio del 2010, se contó durante 1 min el número de hormigas presentes en cada una de las plantas censadas (18 juveniles, 23 pre-reproductivas y 46 reproductivas) por tres días (14, 15 y 16 de junio). El conteo se repitió cada 2 h entre 9:00 y 19:00, en horario de verano. El número total de hormigas por planta se dividió entre el número de hojas de la planta.

Los datos fueron analizados estadísticamente para encontrar diferencias significativas en el número de hormigas entre estadios mediante pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y posteriormente se efectuaron contrastes no paramétricos ‘U’ de Mann Whitney con la corrección de Bonferroni ($\alpha = \frac{0.05}{3} = 0.016$).

Todos los análisis estadísticos de este trabajo se hicieron utilizando el paquete de JMP 7.00, salvo excepciones indicadas anteriormente.

RESULTADOS

Historia natural

Durante los seis censos realizados se registraron 133 plantas, fue posible seguir algunas plantas a lo largo de todos los estadios, mientras que otras sólo fueron registradas en algunos estadios en particular (Tabla 1). Durante el periodo estudiado se registraron altos niveles de mortalidad. El estadio juvenil tuvo el mayor porcentaje de individuos muertos, seguido por las reproductivas y finalmente las pre-reproductivas (Tabla 1). El nivel de mortalidad se incrementó notablemente durante los meses invernales, pues entre enero y abril se registraron los niveles máximos para todos los estadios.

Tabla1. Seguimiento ontogenético de los individuos marcados y mortalidad a lo largo del periodo estudiado (junio de 2009 a junio de 2010).

	Juvenil ¹	Estadio ontogenético Pre-reproductiva ¹	Reproductiva
Número de plantas marcadas	41	83	93
Porcentaje de plantas que pasaron a la siguiente etapa	85.36%	59.03%	—
Porcentaje de plantas muertas al final del periodo	36.58%	7.22%	44.08%

¹Incluye plantas que cambiaron al siguiente estadio.

Esta especie produce una gran cantidad de frutos durante todo el año. Aproximadamente cada planta reproductiva produce 3 o 4 frutos por semana y durante el pico de floración (junio-agosto) puede producir más de un fruto por día. Considerando que cada fruto presenta cerca de 30 semillas pequeñas, en las temporadas menos favorables las plantas producen cerca de. 90 semillas/semana y cerca de. 210 semillas/semana durante el pico reproductivo (S. Ochoa-López, com. pers.).

Los NEF de la porción apical del brote presentan una mayor actividad que aquellos hallados en la porción basal. En la mayoría de los casos, la secreción de néctar se limitó a la porción apical.

Durante las observaciones al MEB para el análisis micromorfológico de tricomas en hojas de distintos estadios de *T. ulmifolia* se observaron gran cantidad de hilos atados entre los tricomas mismos que pueden ser hifas o hilos de seda secretados por algún insecto. También se observaron gran cantidad de bacterias en la epidermis de las hojas.

Crecimiento

El análisis multivariado de medidas repetidas mostró que existe un efecto significativo del estadio (*Wilks* $\lambda_{4,446} = 0.636$, $P < 0.0001$), la época del año (*Wilks* $\lambda_{2,223} = 0.269$, $P < 0.0001$) y la interacción (*Wilks* $\lambda_{4,446} = 0.914$, $P < 0.0005$) sobre el crecimiento de las plantas en términos de altura y número de hojas.

Durante la época de lluvias (junio-octubre de 2009) se observó mayor incremento en términos de altura en todos los estadios mientras que durante el invierno muchas plantas perdieron ramas y secciones del tallo, lo cual se refleja con valores negativos de crecimiento (Fig. 5). El estadio juvenil mostró el mayor incremento en altura durante todo el año, exceptuando los meses del periodo invernal y de secas cuando su crecimiento registró valores negativos (Fig. 5). En cuanto al número de hojas, las plantas reproductivas tuvieron la mayor producción en la época de lluvias, así como la mayor pérdida de hojas en la época seca (Fig. 6). Las pre-reproductivas mostraron niveles poco cambiantes en el número de hojas, aunque sí existió una ligera pérdida de hojas con la llegada de la época seca (Fig. 6). En los juveniles la cantidad de hojas permaneció prácticamente estática a lo largo de las distintas temporadas (Fig. 6).

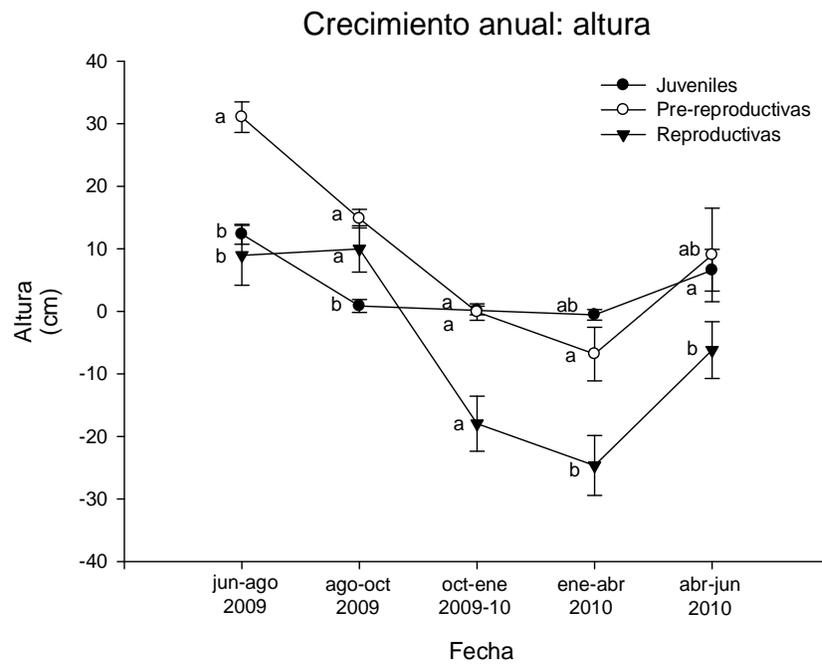


Figura 5. Cambios en la altura de plantas de los tres estadios de *Turnera ulmifolia* durante cinco periodos bimestrales a lo largo del año. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo.

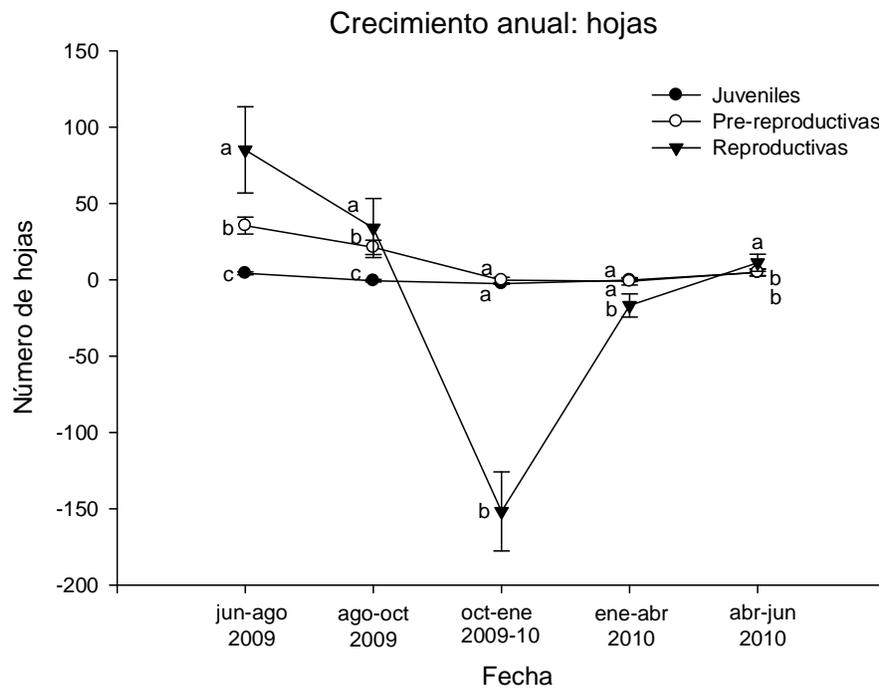


Figura 6. Cambios en el número de hojas de plantas de *Turnera ulmifolia* de los tres estadios durante cinco periodos bimestrales a lo largo del año. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo.

Daño foliar

Análisis univariados mostraron que hubo un efecto significativo de la ontogenia ($F_{2,618} = 55.08$, $P < 0.0001$, Fig. 7) sobre el nivel anual promedio de daño foliar que reciben las plantas de *T. ulmifolia*.

El estadio que presentó la mayor cantidad de daño foliar promedio a lo largo del año fue el juvenil (6.5%) con cerca de tres veces más daño que las pre-reproductivas (2.5%) ($F_{1,618} = 66.52$, $P < 0.0001$) y las reproductivas ($F_{1,618} = 108.62$, $P < 0.0001$). Las plantas reproductivas mostraron una tendencia marginalmente significativa de menor cantidad de daño que las plantas pre-reproductivas ($F_{(1,618)} = 3.36$, $P < 0.067$, Fig. 7).

El análisis de medidas repetidas mostró que hubo un efecto significativo del estadio ontogenético ($F_{2,603} = 26.36$, $P < 0.0001$, Fig. 8), la época del año ($F_{5,603} = 5.0004$, $P = 0.0002$, Fig. 8) y la interacción ($F_{10,603} = 2.84$, $P = 0.0018$, Fig. 8) en la cantidad de daño foliar que reciben las plantas. El pico de daño foliar ocurrió durante la temporada de lluvias, entre junio y octubre (Fig. 8). Durante el periodo lluvioso del 2009 las juveniles presentaron 5.68% de daño, poco más del doble del daño recibido por las pre-reproductivas y más de tres veces el daño recibido por las reproductivas (2.5% y 1.6%, respectivamente; Fig. 8) y en la siguiente temporada lluviosa (junio de 2010) la diferencia en el nivel de daño entre estadios se incrementó. Los menores niveles de daño foliar registrados se encontraron entre los meses de enero y abril de 2010 y variaron entre 1.6% y 4.6% (Fig. 8).

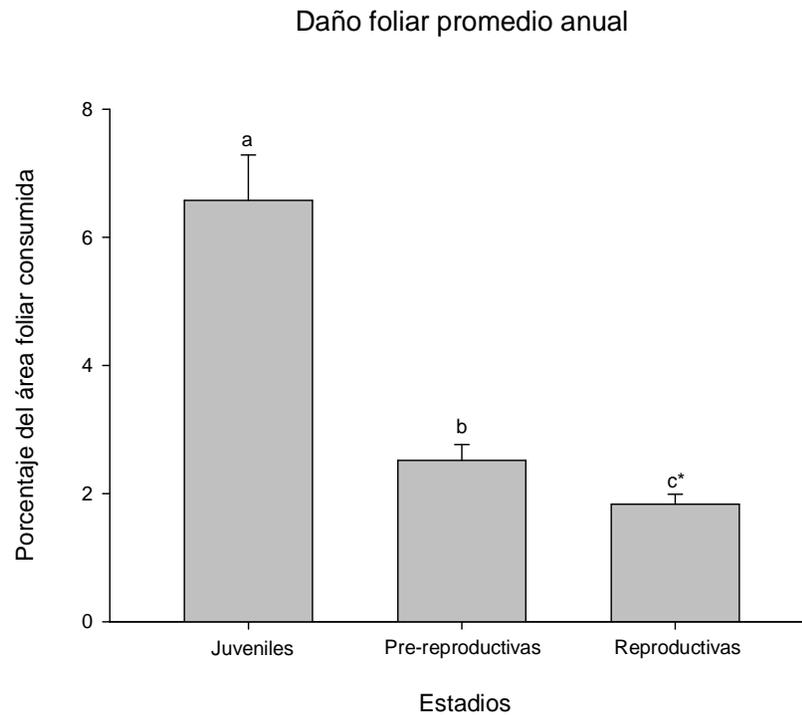


Figura 7. Diferencias totales en el nivel de daño foliar entre estadios en plantas de *Turnera ulmifolia*. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo. (* $p=0.067$)

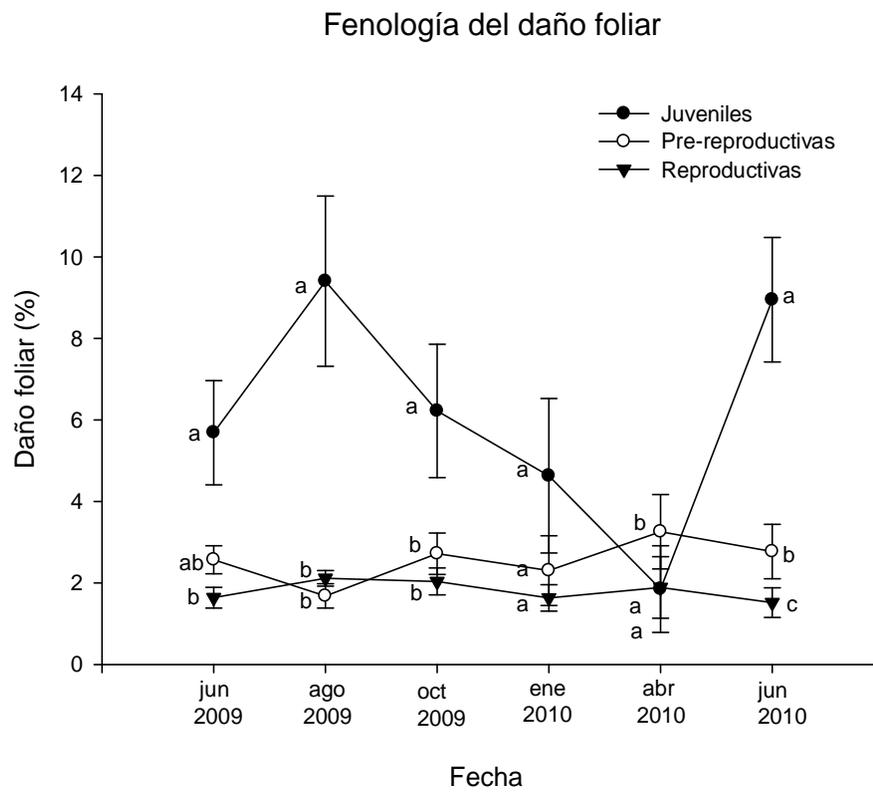


Figura 8. Diferencias en el nivel de daño foliar por herbívoros entre estadios y a lo largo del año en plantas de de *Turnera ulmifolia*. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo.

Tricomas foliares

Las plantas de *T. ulmifolia* presentan una gran diversidad de tricomas unicelulares y pluricelulares en la lámina foliar. A lo largo de las distintas etapas ontogenéticas se observaron seis tipos distintos de tricomas: dos morfos no glandulares, tres morfos glandulares y una emergencia mesetiforme (Fig. 9). Los tricomas unicelulares, microcapitados uniseriados, microcapitados biseriados y claviformes se encontraron en los tres estadios; los tricomas pluricelulares uniseriados únicamente se observaron en juveniles y reproductivas; y las emergencias mesetiformes se observaron en estadios pre-reproductivos y reproductivos. También se encontraron algunos tricomas en desarrollo que representan estadios tempranos de algunas de las morfologías encontradas (Fig. 10). Los tricomas fueron clasificados de acuerdo con González y Arbo (2004). A continuación se describen todos los tipos de tricomas observados.

Tricomas no glandulares

1. **Unicelulares:** Constan de una célula gruesa, lignificada y ornamentada con verrugas. En la base presentan varias células accesorias globosas e irregulares dispuestas en forma de roseta alrededor del tricoma que frecuentemente contienen taninos (Figs. 11A y B).
2. **Pluricelulares uniseriados:** Están conformados por células accesorias globosas, irregulares y reducidas y el cuerpo lo forma una hilera celular con nueve células de altura y carecen de ornamentaciones (Fig. 9C).

Tricomas glandulares

1. **Microcapitados uniseriados:** Constan de un pie uni o bicelular y células accesorias globosas alongadas o irregulares. El pedicelo es uniseriado y consta de una sola hilera celular de entre cinco y ocho células de alto. Presenta una cabeza formada por entre una y tres células cubiertas por una cutícula lisa, donde la célula apical parece ser la que contiene la secreción (Figs. 11D y E).
2. **Microcapitados biseriados:** Constan de un pie uni o bicelular y células accesorias globosas alongadas o irregulares. El pedicelo es biseriado y consta de dos hileras celulares con entre

tres y seis células de alto. Presenta una cabeza formada por entre una y tres células cubiertas por una cutícula lisa, donde la célula apical parece ser la que contiene la secreción (Figs. 11F y G).

3. **Claviformes:** Están formados por un pie bicelular, células accesorias globosas e irregulares y un pedicelo biseriado con tres o cuatro células de alto y una cabeza ancha y en forma de clava que, en la mayoría de los casos, presenta hendiduras apicales (Fig. 9H).

Emergencias

1. **Mesetiformes:** Son protuberancias continuas de la epidermis, es decir, un conjunto de células subepidérmicas que proliferan por debajo de la epidermis sin fragmentarla. En este caso, la porción basal es más ancha que la apical. Esta última está ligeramente aplanada y le confiere una forma de meseta a la estructura (Fig. 9I).

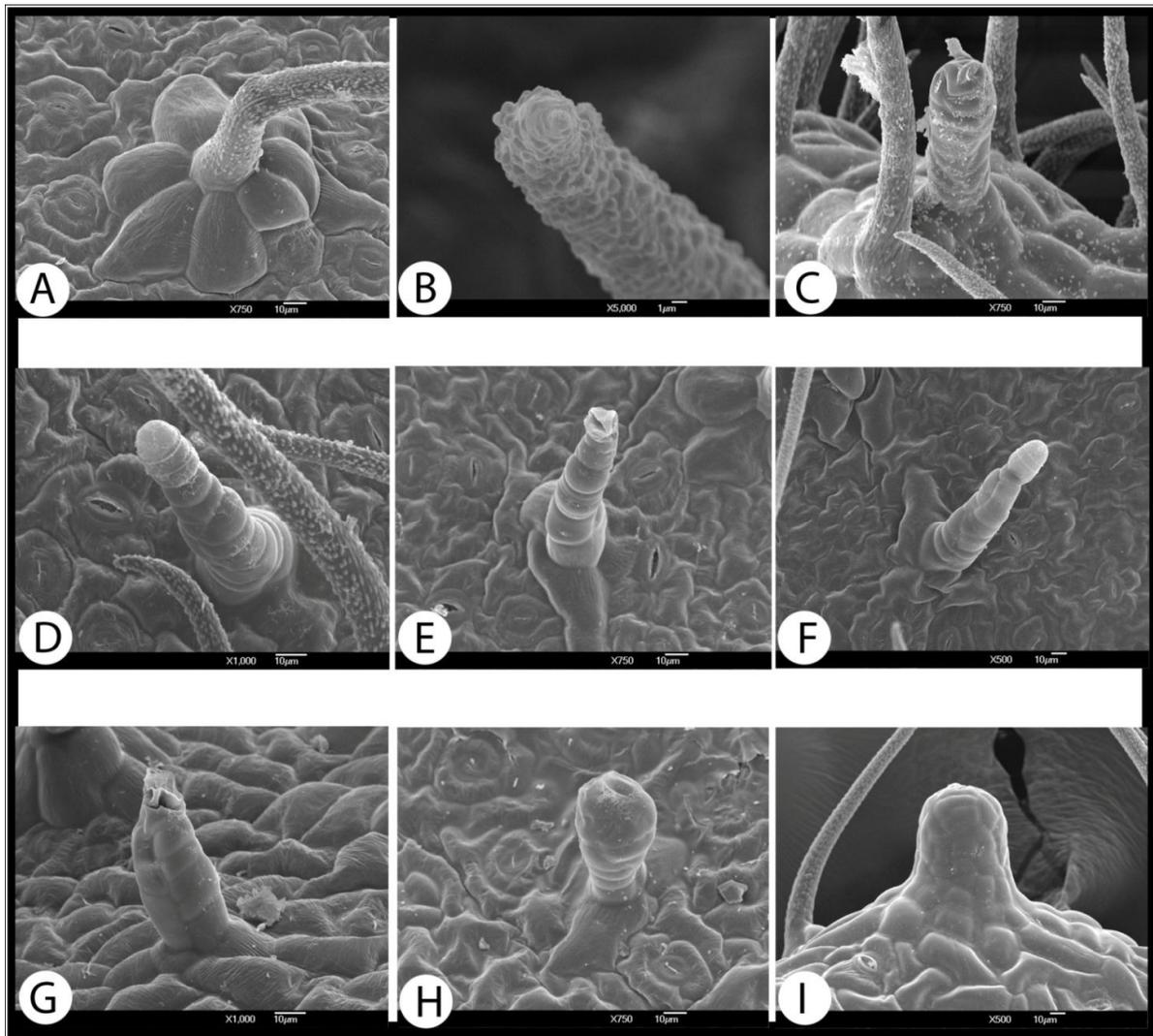


Figura 9. Diversidad de tricomas encontrados en las seis etapas foliares revisadas de *Turnera ulmifolia* mediante MEB. A) Células accesorias y porción basal de un tricoma unicelular (750×). B) Punta de un tricoma unicelular con ornamentaciones (5000×). C) Tricoma pluricelular uniseriado (750×). D) Tricoma microcapitado uniseriado con cabeza turgente (1000×). E) Tricoma microcapitado uniseriado colapsado (750×). F) Tricoma microcapitado biseriado con cabeza turgente (500×). G) Tricoma microcapitado biseriado colapsado (1000×). H) Tricoma claviforme (750×). I) Emergencia mesetiforme (500×).

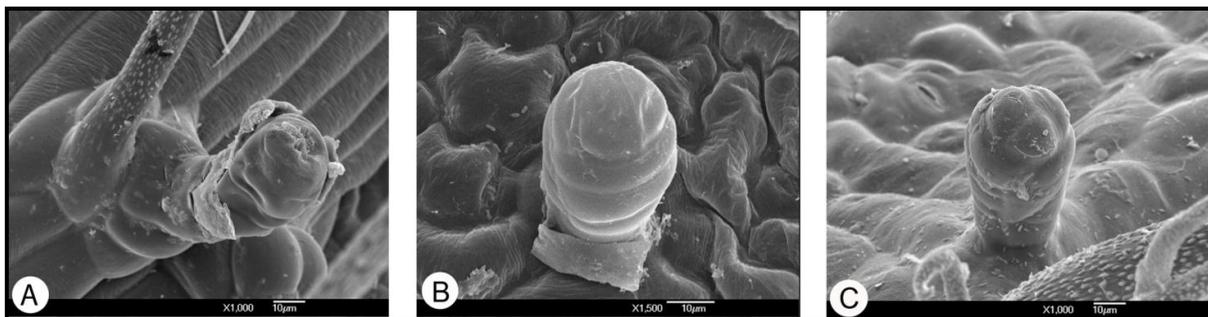


Figura 10. Tricomas en formación de distintas etapas foliares de *Turnera ulmifolia* mediante MEB. A) Tricoma pluricelular uniseriado emanando con restos de cutícula (1000×). B) Tricoma claviforme con restos de cutícula en la base (1500×). C) Tricoma pluricelular biseriado (1000×).

Se esbozaron algunos patrones de distribución de ciertos tipos de tricomas en ambas caras; sin embargo, no podemos hablar de patrones contundentes debido al reducido tamaño muestral que se exploró. Por ejemplo, los tricomas microcapitados uniseriados se hallaron siempre en el envés, con excepción de las hojas maduras de etapa reproductiva, en las que se observaron por ambos lados (Tabla 2). Lo mismo sucede con los tricomas microcapitados biseriados, los cuales se hallaron sólo en el haz de hojas jóvenes y maduras de etapas juveniles (Tabla 2). El resto de los tipos de tricomas se halló por igual en ambas caras de las hojas (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los estadios foliares en que se presentan los distintos tipos de tricomas. Símbolos: H, haz; E, envés.

Tipo de tricoma	Morfo	Juvenil				Pre-reproductiva				Reproductiva			
		Hoja nueva		Hoja madura		Hoja nueva		Hoja madura		Hoja nueva		Hoja madura	
		H	E	H	E	H	E	H	E	H	E	H	E
No glandular	Unicelular	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Pluricelular uniseriado	x								x			x
Glandular	Microcapitado uniseriado		x		x		x		x		x		x
	Microcapitado biseriado		x		x	x	x	x	x		x		
Otro	Claviforme	x		x		x	x			x	x	x	
	Emergencia mesetiforme						x			x			

Se encontró un efecto significativo del estadio ontogenético ($F_{2,122} = 32.09$, $P < 0.0001$, Fig. 11) y la cara de la hoja (haz y envés) ($F_{1,122} = 13.85$, $P = 0.0003$, Fig. 11), pero no de la interacción ($F_{2,122} = 2.29$, $P = 0.1056$, Fig. 11) sobre la densidad de tricomas foliares (número de tricomas/mm²). Con excepción de los individuos juveniles ($F_{1,122} = 0.23$, $P = 0.62$, Fig. 11), *T. ulmifolia* presenta una mayor densidad de tricomas en el envés que en el haz ($F_{1,122} = 13.85$, $P = 0.0003$, Fig. 11). El envés de las plantas pre-reproductivas es 38.4% más pubescentes que el haz y 36% más pubescente en las plantas reproductivas. Las plantas pre-reproductivas y reproductivas tuvieron dos veces más tricomas/mm² en el haz de las hojas que las juveniles ($F_{2,61} = 12.50$, $P <$

0.0001, Fig. 11). En el envés, la densidad aumentó en 47% de juveniles a pre-reproductivas y 17.6% de pre-reproductivas a reproductivas ($F_{2,61} = 19.73$, $P < 0.0001$, Fig. 11).

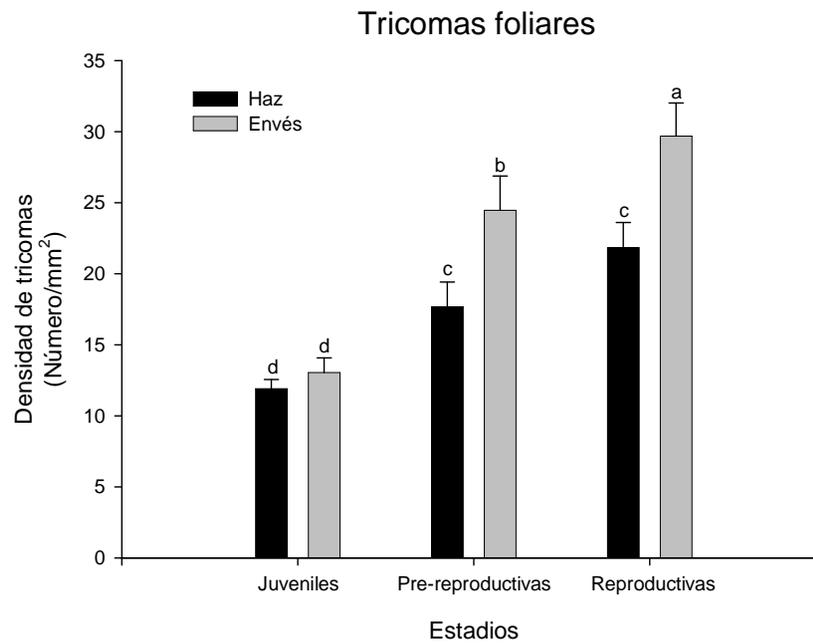


Figura 11. Diferencias en la densidad de tricomas foliares entre estadios ontogenéticos y en ambas caras de la hoja en plantas de *Turnera ulmifolia*. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo.

Dureza foliar

No se encontraron diferencias significativas en la dureza foliar entre individuos de distintos estadios de desarrollo ($F_{2,66} = 0.40$, $P = 0.66$, Fig. 12).

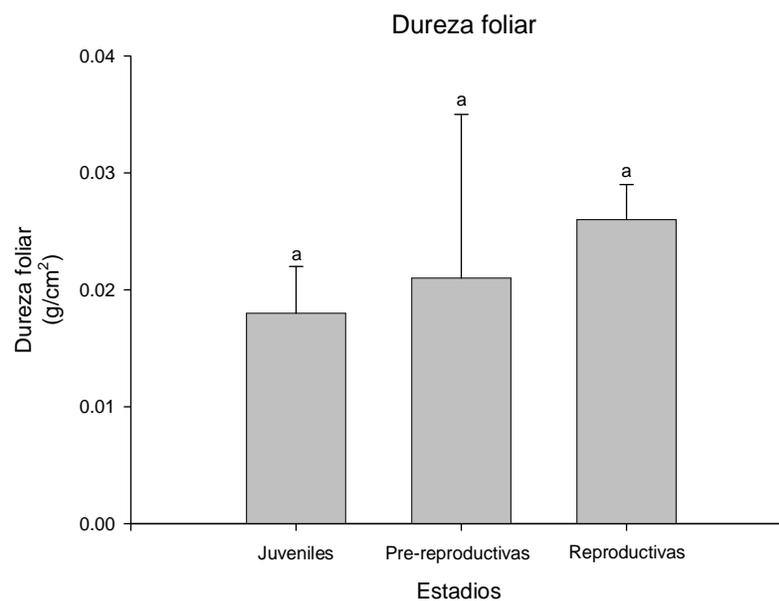


Figura 12. Diferencias en la dureza foliar entre estadios ontogenéticos en plantas de *Turnera ulmifolia*. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo.

Glucósidos cianogénicos

Los 101 individuos de *T. ulmifolia* (17 juveniles, 28 pre-reproductivos y 56 reproductivos) muestreados resultaron ser acianogénicos según las pruebas colorimétricas con picrato de sodio y ácido pícrico.

Taninos

No fue posible extraer ni la cantidad mínima de taninos condensados necesaria para la cuantificación a partir de hojas de 20 plantas adultas de *T. ulmifolia*, por lo que se concluye que estas plantas carecen de taninos condensados en las hojas.

Nectarios extraflorales

Las plantas de *T. ulmifolia* presentan nectarios peciolares ubicados en la unión entre la lámina foliar y el pecíolo. Éstos son pareados, opuestos, laterales y se hallan ligeramente desplazados hacia el envés de la hoja (Fig. 13). En la mayoría de los casos su inserción en el pecíolo es asimétrica. Presentan una estructura cupuliforme y cuentan con vascularización. Los NEF de esta especie están conformados por una cutícula, la epidermis secretora, un parénquima que conforma el cuerpo del nectario, inclusiones de taninos, drusas y haces vasculares. Las drusas son cristales de oxalato de calcio contenido en las células a los que se les ha aducido una función defensiva contra los herbívoros ya que supuestamente reducen la apetecibilidad de las plantas.

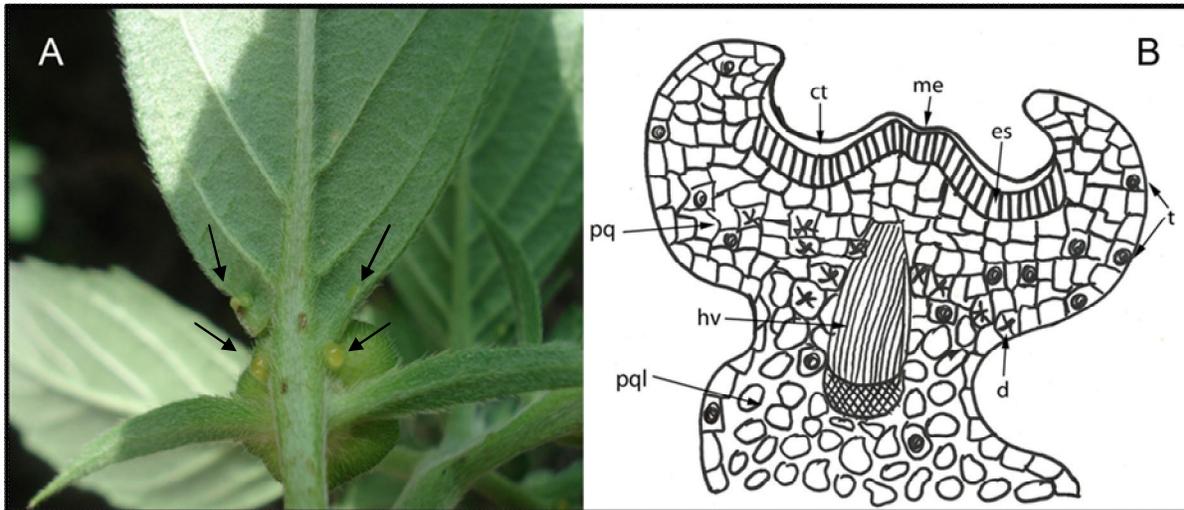


Figura 13. Topografía y anatomía de los nectarios extraflorales de *Turnera ulmifolia*. A) Envés de una hoja mostrando el peciolo y los NEF. B) Esquema de la anatomía de un NEF corte longitudinal. Símbolos: ct, cutícula; me, estructura mesetiforme apical; es, epidermis secretora; t, taninos; pq, parénquima del cuerpo del nectario; d, drusas; hv, haces vasculares; pql, parénquima de la base del nectario.

Anatomía de juveniles

En las plantas juveniles los NEF presentan una superficie secretora convexa y un reborde descendente marcado (Fig. 14). En el centro de la superficie secretora se observa una estructura elevada. El diámetro del nectario oscila entre 370 y 580 μm , mientras que el diámetro de la región apical elevada es de 108 μm (Fig. 14). Estos nectarios presentan una cutícula muy engrosada. Debajo de la cutícula se halla la epidermis secretora uniestratificada, formada por una capa de células en empalizada, ligeramente alargadas y con citoplasma denso. Posteriormente, se halla el tejido parenquimatoso que forma el cuerpo del nectario. Éste presenta células isodiamétricas de citoplasma claro y abundantes drusas. Hacia la porción basal del mismo podemos encontrar elementos vasculares que irrigan el nectario y cuyo floema proporciona los elementos necesarios para la elaboración del néctar (Fig. 14).

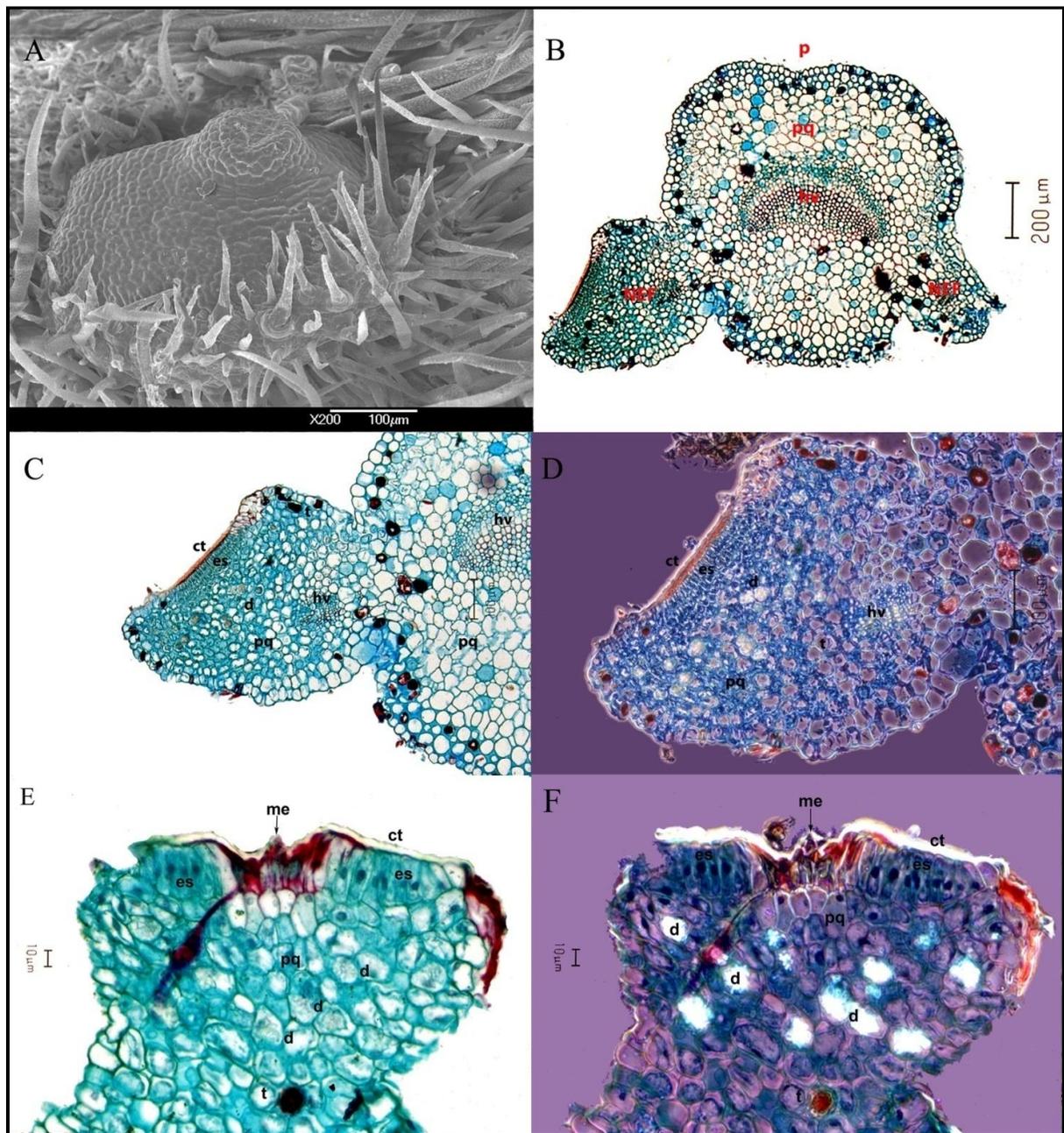


Figura 14. Micromorfología y anatomía de los NEF en plantas juveniles de *Turnera ulmifolia*. A) Micrografía al MEB de la morfología externa del nectario (200×). B) Corte transversal del pecíolo con los NEF insertados en forma asimétrica (campo claro). C) Corte longitudinal del NEF (campo claro). D) Corte longitudinal del NEF (contraste de fases). E) Corte mediano y longitudinal del nectario (campo claro). F) Corte mediano y longitudinal del nectario (contraste de fases). Símbolos: p, pecíolo; pq, parénquima; hv, haces vasculares; NEF, nectario extrafloral; ct, cutícula; es, epidermis secretora; d, drusas; me, estructura mesetiforme; t, taninos.

Anatomía de pre-reproductivas

En el estadio pre-reproductivo la superficie secretora de los NEF es cóncava y el reborde descendente (Fig. 15). En el centro de la superficie secretora se observa una estructura elevada con una meseta y una hendidura o cráter. El diámetro del nectario oscila entre 400 y 740 μm , mientras que el diámetro de la estructura mesetiforme en la región apical oscila entre 76 y 100 μm (Fig. 15). Estos nectarios presentan una cutícula muy engrosada en la mayor parte de la superficie secretora, la cual se adelgaza notoriamente al llegar a la porción apical de la estructura mesetiforme, llegando casi a desaparecer en el cráter. Debajo de la cutícula se halla la epidermis secretora uniestratificada formada por células en empalizada, alargadas y con citoplasma muy denso. Después, se halla un tejido parenquimatoso conformado por células cuadradas que forman el cuerpo del nectario. Debajo de éste se observa un parénquima más laxo con células isodiamétricas y citoplasma claro, las cuales forman el estípite del nectario. Se observan abundantes drusas. Hacia la porción basal del nectario podemos encontrar los elementos vasculares que lo irrigan y surten de elementos para la elaboración del néctar, así como algunos taninos (Fig. 15). El pecíolo presenta una cantidad moderada de taninos distribuidos en forma de anillo a lo largo de todo el contorno peciolar.

Anatomía de reproductivas

En plantas reproductivas los NEF presentan una estructura cupuliforme con superficie secretora cóncava y un reborde ascendente muy conspicuo (Fig. 16). En esta etapa es frecuente hallar más de un nectario en cada lado del pecíolo, y se llega a encontrar en ocasiones tres, cuatro o cinco. En estos casos, generalmente se halla un nectario principal y de mayores dimensiones y otro secundario de menor tamaño, aunque también suelen existir dos principales y un tercer nectario secundario hacia el limbo. En el centro de la superficie secretora se observa una estructura elevada y mesetiforme con una hendidura o cráter. El diámetro de la glándula oscila entre los 700 y 1000 μm y el diámetro de la región apical de la estructura mesetiforme es de 100 μm (Fig. 16). Estos nectarios presentan una cutícula muy engrosada en la mayor parte de la superficie secretora, misma

que se adelgaza notoriamente al llegar a la porción apical de la estructura mesetiforme, donde prácticamente desaparece. Debajo de la cutícula se halla la epidermis secretora ahora biestratificada, formada por células en empalizada, alargadas y con citoplasma muy denso (Fig. 16). Debajo, se halla un tejido parenquimatoso constituido por células cúbicas que forman el cuerpo del nectario. Debajo de éste se encuentra un parénquima más laxo con células isodiamétricas y citoplasma claro, las cuales forman el estípite del nectario. Se observan bastantes drusas en el parénquima y también taninos, que se ubican en forma de anillo a lo largo del contorno del nectario (Fig. 16). El pecíolo también presenta una gran cantidad de taninos. Hacia la porción basal del nectario se encuentra el inicio del parénquima peciolar así como los elementos vasculares que lo irrigan y cuyo floema proporciona los elementos necesarios para la elaboración del néctar, llegando muy cerca de la epidermis secretora (Fig. 16).

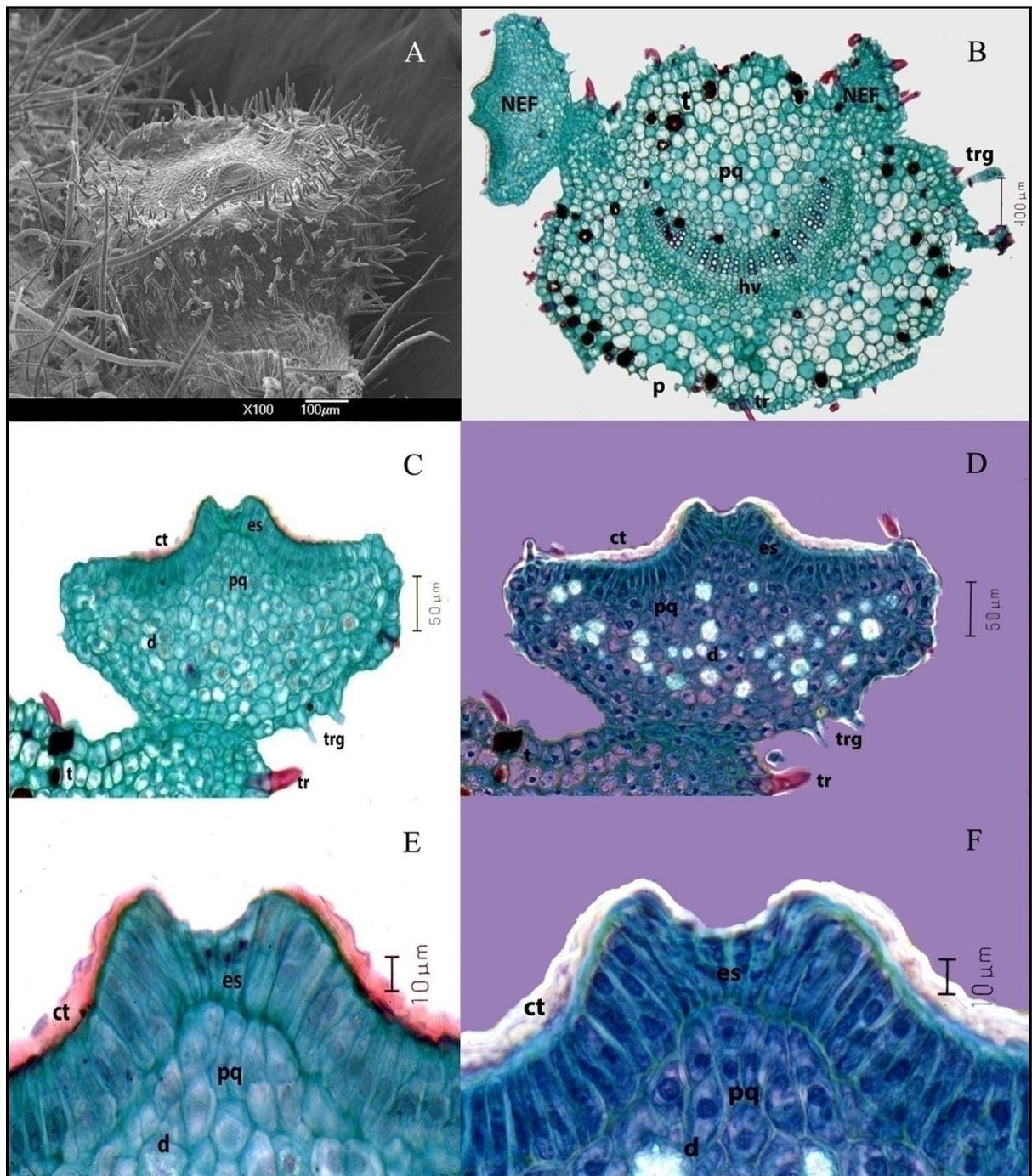


Figura 15. Micromorfología y anatomía de los NEF en plantas pre-reproductivas de *Turnera ulmifolia*. A) Micrografía al MEB mostrando la morfología externa del nectario (100×). B) Corte transversal del pecíolo con los NEF insertados en forma asimétrica (campo claro). C) Corte mediano longitudinal del NEF (campo claro). D) Corte mediano longitudinal del NEF (contraste de fases). E) Porción apical del NEF en corte mediano y longitudinal (campo claro). F) Porción apical del NEF en corte mediano y longitudinal (contraste de fases). Símbolos: p, pecíolo; pq, parénquima; hv, haces vasculares; NEF, nectario extrafloral; tr, tricoma unicelular simple; trg, tricoma glandular; t, taninos; ct, cutícula; es, epidermis secretora; d, drusas.

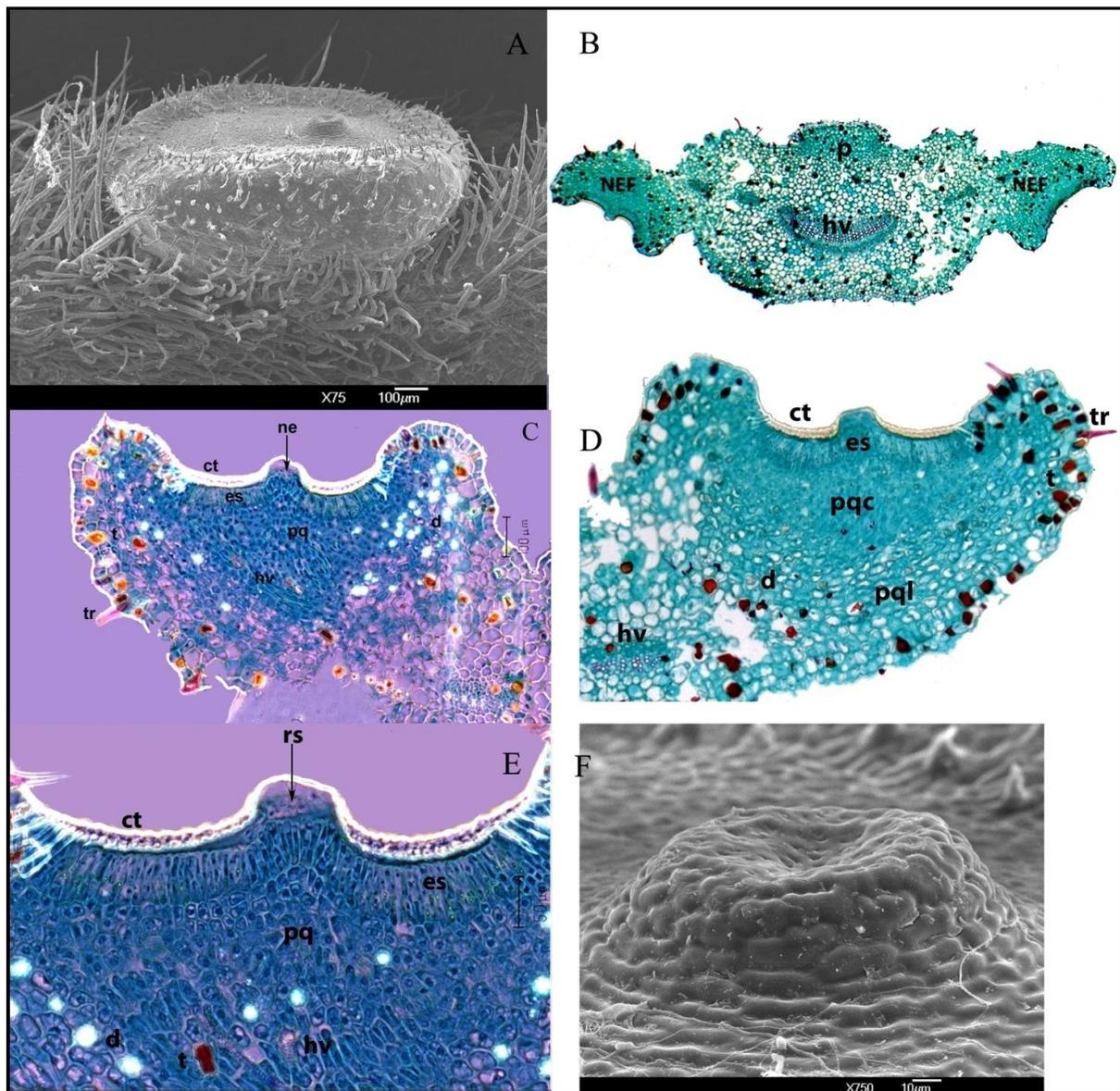


Figura 16. Micromorfología y anatomía de los NEF en plantas reproductivas de *Turnera ulmifolia*. A) Micrografía al MEB mostrando la morfología externa del nectario (100×). B) Corte transversal del pecíolo con los NEF insertados en forma asimétrica (campo claro). C) Corte mediano longitudinal del NEF (contraste de fases). D) Corte mediano longitudinal del NEF (campo claro). E) Acercamiento a la estructura de meseta crateriforme de la porción apical del NEF en corte mediano y longitudinal (contraste de fases). F) Micrografía al MEB de un acercamiento a la estructura de meseta crateriforme de la porción apical del NEF (750×). Símbolos: p, pecíolo; hv, haces vasculares; NEF, nectario extrafloral; ct, cutícula; ne, néctar acumulado; es, epidermis secretora; pq, parénquima; d, drusas; tr, tricoma unicelular simple; t, taninos; rs, ruta de secreción del néctar acumulado.

Modo de secreción del néctar extrafloral

En esta especie el néctar se produce en la epidermis secretora, principalmente en la región mesetiforme del nectario, y se acumula entre la epidermis y la cutícula, capa que se adelgaza notoriamente en esa zona (Fig. 17). El líquido producido fluye hacia el cráter de la meseta y se acumula elevando la delgada cutícula en esa zona de modo que el cráter se convierte en una ligera protuberancia (Fig. 17). Posteriormente, el néctar es secretado mediante un poro que se halla en el centro del cráter, donde la cutícula se invagina para formar un canal de salida que atraviesa hasta la epidermis secretora (Fig. 18). El líquido acumulado entre la epidermis y la cutícula emana por dicho canal y se acumula ahora en el exterior, entre los rebordes de la superficie cóncava del nectario para formar una gota que es contenida por la forma de copa del nectario. La copa del nectario se llena de esta secreción que se produce en abundancia y cuyas gotas se observan a simple vista.

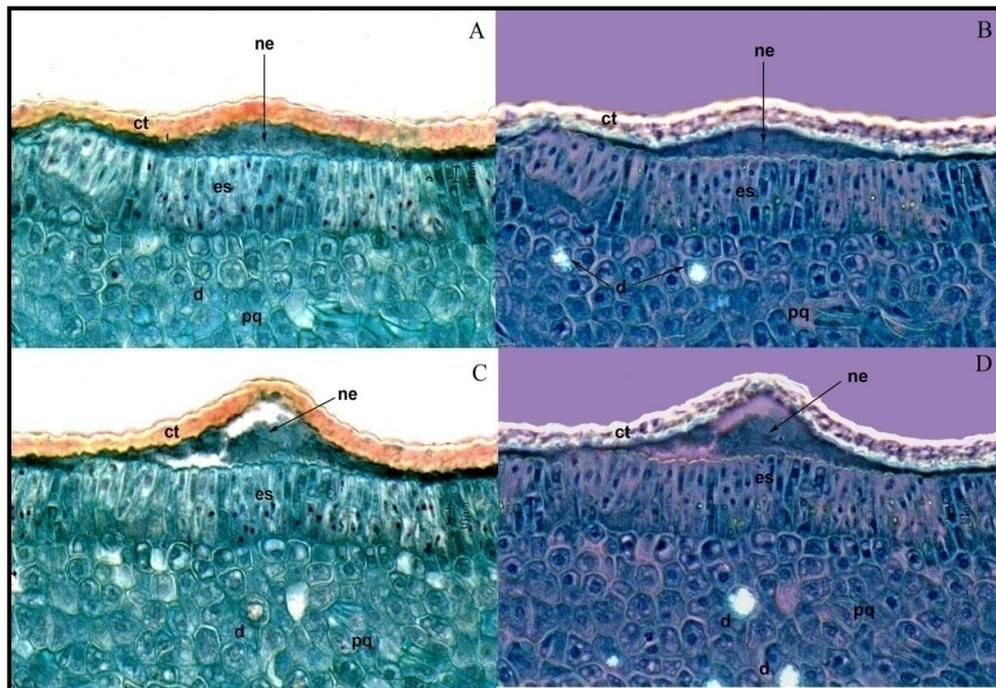


Figura 17. Ruta de secreción y acumulación del néctar extrafloral de *Turnera ulmifolia* debajo de la cutícula que recubre la estructura mesetiforme apical. (A y C: campo claro) (B y D: contraste de fases). Símbolos: rs, ruta de secreción; ct, cutícula; es, epidermis secretora, pqc, parénquima ceñido; pql, parénquima laxo; hv, haces vasculares; d, drusas; t, taninos.

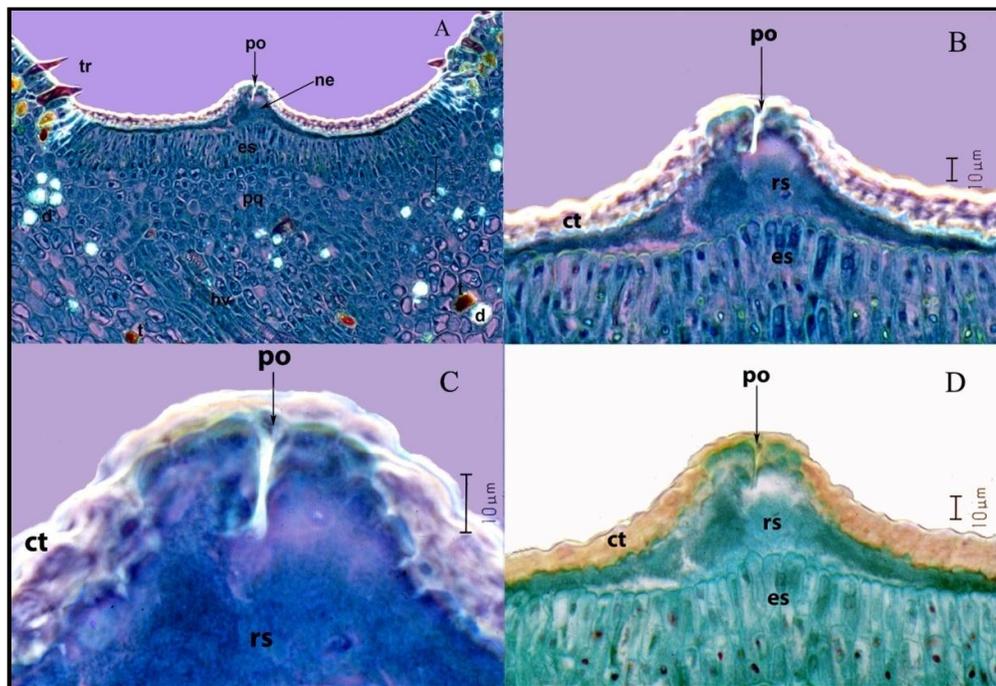


Figura 18. Secreción del néctar extrafloral de *Turnera ulmifolia* mediante un poro transcuticular ubicado en el centro del cráter de la estructura mesetiforme. A) Corte mediano y longitudinal de la estructura de meseta crateriforme de la porción apical del NEF en donde se muestra el poro transcuticular (contraste de fases). B) y C) Acercamientos al poro transcuticular (contraste de fases). D) Acercamiento al poro transcuticular (campo claro). Símbolos: ct, cutícula; po, poro transcuticular; es, epidermis secretora; pq, parénquima; hv, haces vasculares; tr, tricoma simple unicelular; d, drusas; t, taninos; po, poro; rs, ruta de secreción del néctar acumulado; ne: néctar acumulado.

Abundancia de NEF

En general, se hallaron entre 0 y 5 NEF por hoja, casi siempre de manera pareada aunque en ocasiones su distribución fue asimétrica. Hubo un efecto significativo de la ontogenia ($F_{2,612} = 86.80$, $P < 0.0001$), la fenología anual ($F_{5,612} = 14.95$, $P < 0.0001$) y la interacción de ambos factores ($F_{10,612} = 2.79$, $P = 0.0027$) sobre la abundancia de NEF por hoja. En todos los censos el estadio que presentó la mayor cantidad NEF/hoja fue el reproductivo, seguido por el pre-reproductivo y finalmente por los juveniles, que presentaron siempre la menor cantidad de NEF/hoja (Fig. 19). La mayor cantidad de NEF/hoja para todos los estadios se registró durante la temporada de lluvias (junio-octubre de 2009); en junio de 2009 se dio el pico de abundancia para los pre-reproductivo y juveniles, y en agosto de 2009 para los reproductivos. En enero de 2010 se registró la menor abundancia NEF, excepto en el estadio pre-reproductivo que registró la menor abundancia de NEF por hoja en abril de 2010. La abundancia de nectarios por hoja en junio de 2010

fue más baja que en junio de 2009 y hay una tendencia de incremento en el número de estos órganos secretores por hoja conforme inicia la temporada de lluvias.

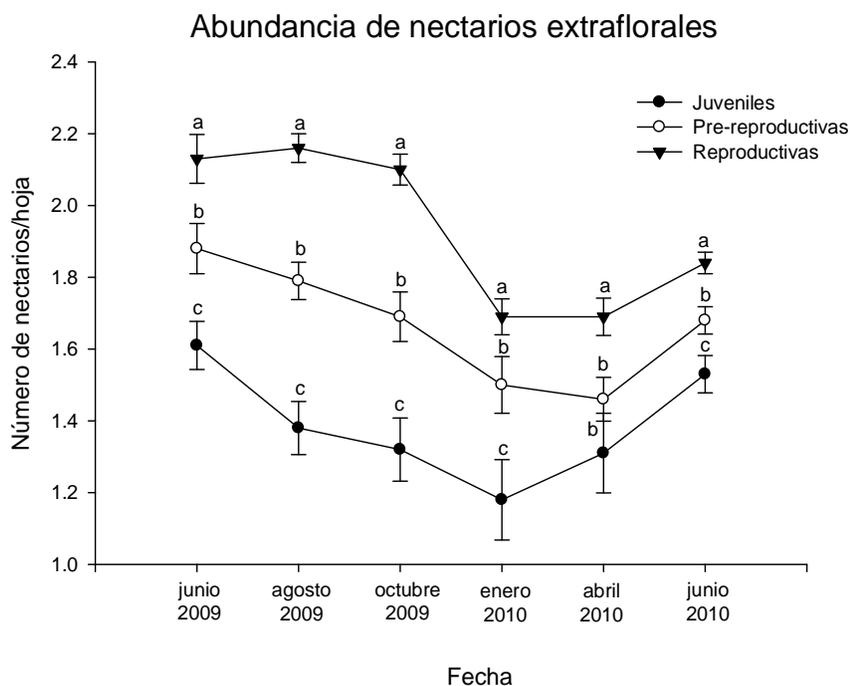


Figura 19. Diferencias en la abundancia de nectarios extraflorales entre estadios de *Turnera ulmifolia* y a lo largo del año. Las letras reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos para cada censo.

Néctar extrafloral y patrullaje de hormigas

Hubo un efecto significativo de la ontogenia sobre el volumen ($U_1 = 25.55$, $P < 0.0001$, Fig. 20) y concentración ($U_1 = 21.54$, $P < 0.0001$, Fig. 21) del néctar extrafloral, así como sobre el patrullaje de hormigas ($H_2 = 26.81$, $P < 0.0001$, Fig. 22). Las plantas reproductivas produjeron más y mejor néctar extrafloral que las plantas pre-reproductivas. El volumen de néctar/hoja de las reproductivas fue diez veces mayor que el volumen producido por las plantas pre-reproductivas (0.59 μl y 0.049 μl , respectivamente) ($U_1 = 25.55$, $P < 0.0001$, Fig. 20). Lo mismo sucede con la calidad del néctar, pues en las plantas pre-reproductivas la concentración de azúcares fue diez veces menor que en las reproductivas (3.11°B y 29.69°B, respectivamente) ($U_1 = 21.54$, $P < 0.0001$, Fig. 21). Las plantas reproductivas tienen en promedio más hormigas/hoja que las pre-reproductivas (0.05 \pm 0.025 hormigas/hoja y 0.07 \pm 0.026 hormigas/hoja, respectivamente).

No fue posible registrar de manera formal y con la misma metodología la cantidad y concentración del néctar extrafloral en individuos juveniles debido a que en los meses en que se registraron tales defensas (septiembre 2010) la población de juveniles casi había desaparecido. Sin embargo, se tienen observaciones personales que, sumadas a las evidencias anatómicas, indican que dicho estadio no produce néctar extrafloral.

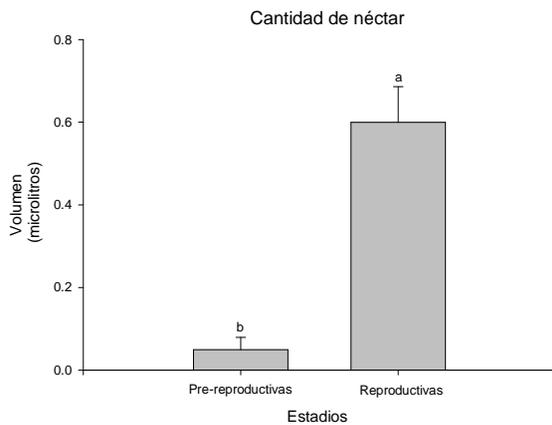


Figura 20. Diferencias en el volumen de néctar producido entre estadios de *Turnera ulmifolia*.

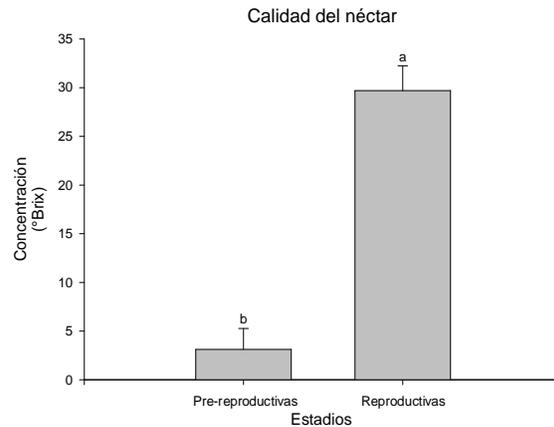


Figura 21. Diferencias en la concentración de néctar producido por estadios de *Turnera ulmifolia*.

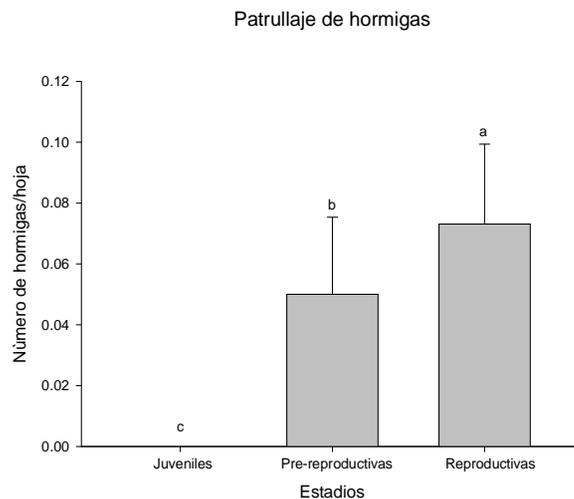


Figura 22. Diferencias en el patrullaje de hormigas entre estadios de *Turnera ulmifolia*.

DISCUSIÓN

Existen cambios ontogenéticos en la cantidad de daño foliar que reciben las plantas de *T. ulmifolia*, así como en los distintos tipos de defensa. A lo largo del desarrollo el nivel de defensa es inversamente proporcional a la cantidad de daño foliar por herbívoros recibido y directamente proporcional a la edad de la planta (Figs. 9, 13 y 21 a 24). Esta trayectoria ontogenética de la defensa puede ser explicada mediante la teoría de asignación de recursos, la cual también predice, por medio de factores intrínsecos como la capacidad de adquisición y asignación de recursos de la planta, un incremento en la defensa conforme las plantas crecen y son capaces de adquirir mayor cantidad de recursos (Feeny, 1975, 1976; Rhoades y Cates, 1976; Rhoades, 1979; Coley *et al.*, 1985; Weiner, 2004). Esta trayectoria ontogenética se presentó en la densidad de tricomas (Fig. 11), número de NEF/hoja (Fig. 19), volumen y concentración de néctar extrafloral (Figs. 22 y 23) y patrullaje de hormigas (Fig. 22). En contraste, la dureza foliar (Fig. 12) y los tricomas glandulares (Tabla 2) permanecieron constantes durante la ontogenia. Además, la población estudiada de *T. ulmifolia* mostró un patrón estacional que coincidió durante la época de lluvias con los niveles máximos de crecimiento, reproducción, daño por folívoros y densidad de NEF/hoja. Esta sincronía en la abundancia de NEF/hoja y la folivoría podría deberse a un efecto conjunto de la presión ejercida por los herbívoros, sumada a la mayor disponibilidad de recursos (agua) y al pico reproductivo. En síntesis, esta población muestra una trayectoria ontogenética complementaria de la defensa y un síndrome mixto de la defensa (Fornoni *et al.*, 2004).

Historia natural

Las plantas reproductivas mueren con menor frecuencia que las juveniles posiblemente porque cuentan con material de reserva que les permite hacer frente a las condiciones adversas; esto se da en particular, durante la temporada seca, cuando el agua es un factor escaso y limitante. Debido a que el suelo arenoso de las dunas cuenta con una gran proporción de poros grandes, retiene poca

agua y ésta se filtra rápidamente hasta capas más profundas (Thompson y Troeh, 1988) donde sólo acceden las raíces de mayor tamaño. Así, la capa en que se ubican las pequeñas raíces de las plántulas queda seca poco tiempo después de la lluvia.

Otro factor que incrementa la mortalidad de los estadios jóvenes es la herbivoría (Clark y Clark, 1985). Los herbívoros ejercen una presión importante sobre las plantas, y los estadios jóvenes son particularmente susceptibles. Estudios de demografía vegetal revelan que en muchas especies la mayor mortalidad ocurre en el estadio de plántulas (Barton 2008) y otros trabajos indican que los herbívoros son los responsables del 38% de tal mortalidad, aunque en ocasiones pueden ser causantes hasta del 100% de la muerte de individuos, dañando apenas el 8% del área foliar (Clark y Clark, 1985; Moles y Westoby, 2004). En el caso de *T. ulmifolia* los juveniles presentaron los niveles más altos de daño foliar (2-12%, según la temporada del año), que son suficientes, según Clark y Clark (1985), para reducir de manera importante su supervivencia.

Además, la escasez de individuos juveniles en los censos bimestrales puede deberse a la baja tasa de germinación y establecimiento de plántulas durante la temporada invernal (noviembre-abril). Como ya lo demostraron previamente Cuautle y colaboradores (2005) en el caso de *T. ulmifolia* las hormigas juegan un rol doble en la interacción: como dispersores de semillas y como defensoras contra herbívoros. De hecho, la germinación y buena parte del establecimiento de las plántulas depende directamente de las hormigas, especialmente de *Forelius analis*, ya que no se correlaciona el número de plántulas/área con el número de frutos/área, sino que la cantidad de plántulas se correlaciona con el índice de actividad de las hormigas (Cuautle *et al.*, 2005). Es posible entonces que la alta mortalidad de los individuos juveniles esté en parte explicada por la ausencia de hormigas en este estadio.

Patrones generales de los cambios ontogenéticos en la herbivoría y defensa

El patrón general de cambios ontogenéticos en la defensa y daño foliar hallado en esta población de *T. ulmifolia* consiste en un incremento en los niveles de la defensa y un decremento en los niveles

de daño foliar conforme crece la planta. Este resultado es contrario a lo que han encontrado algunos estudios previos con relación a la resistencia en otras especies (Wolfson y Murdock, 1990; Van Dam *et al.*, 2001; Boege *et al.*, 2007), pero concuerda con el patrón que presenta *Cecropia peltata*, una mirmecófita tropical (Del Val y Dirzo, 2003). Sin embargo, muy pocos estudios consideran la interacción planta-herbívoro en estadios jóvenes y aún no se logra establecer un patrón claro, ya que existen evidencias tanto de incremento como de decremento en el nivel temprano de defensa (Barton, 2008). Por lo tanto, hacen falta más estudios para establecer patrones generales sobre los cambios ontogenéticos en las defensas físicas, químicas y bióticas en las forbias (Barton, 2008; Barton y Koricheva, 2010). Los patrones de daño foliar de *T. ulmifolia* sí parecen coincidir con estudios previos, pues en general, los herbívoros invertebrados prefieren las etapas jóvenes sobre las maduras, por lo que las primeras reciben considerablemente más daño foliar (Barton y Koricheva, 2010).

Los altos niveles de defensa presentes en las plantas reproductivas de *T. ulmifolia* siguen el patrón ontogenético de cambios predicho por la teoría de asignación de recursos, la cual asume que las plantas de mayor edad cuentan con mayor cantidad de recursos para asignar a la defensa (Feeny, 1975, 1976; Rhoades y Cates, 1976; Rhoades, 1979; Weiner, 2004). Las plantas reproductivas presentan mucho mayor follaje que las juveniles o pre-reproductivas (Fig. 6) y también están más defendidas de manera física y biótica (Figs. 13 y 21 a 24).

Los individuos pre-reproductivos presentaron niveles intermedios de defensa y daño foliar, pero un gran crecimiento en altura (Fig. 5). Esto puede ser explicado por los cambios en las prioridades fisiológicas que suceden en estadios intermedios previos a la reproducción. El incremento en tamaño permite producir órganos responsables de la adquisición y almacén de recursos más grandes y productivos (McConnaughy y Coleman, 1999; Weiner, 2004). Por lo tanto, los individuos pre-reproductivos ya disponen de órganos de tamaño suficiente para producir y almacenar recursos suficientes (como son las raíces y hojas) que permiten solventar estrategias complementarias de defensa (Weiner, 2004; Boege *et al.*, 2007), tales como una mayor densidad de

tricomas junto con la diferenciación y maduración de NEF para iniciar la producción de néctar y con ello la mirmecofilia.

Los individuos juveniles fueron los menos defendidos tanto por mecanismos físicos como bióticos. Además, fueron el estadio que más daño foliar recibió y el que tuvo mayor mortalidad; sin embargo, su supervivencia es crucial para la adecuación de la planta. Por lo anterior es importante investigar cuáles son los mecanismos que permiten a los que individuos jóvenes de *T. ulmifolia* alcanzar estadios posteriores. Un mecanismo puede ser el escape gracias a la abundante descendencia producida. *T. ulmifolia*, al igual que la mayoría de las especies vegetales, presenta una estrategia reproductiva de tipo *r*, caracterizada por producir gran cantidad de prole con poca inversión en cada cría o semilla (Begon *et al.*, 2006). De este modo, cada individuo tiene pocas probabilidades de sobrevivir y gran parte de su supervivencia depende de las condiciones ambientales, ya que los padres no invierten muchos recursos para garantizarla; sin embargo, producen gran cantidad de semillas, con lo que las probabilidades globales de que algunos de sus descendientes sobrevivan son altas. Entonces, podemos afirmar que para su ciclo de vida resulta importante la cuantiosa producción de semillas por unidad de biomasa observada en este sistema (ver Historia natural) para aumentar la probabilidad de que las etapas jóvenes alcancen estadios posteriores, aun cuando muchos individuos mueran en las primeras etapas de desarrollo.

Un mecanismo alternativo podría ser la elevada tolerancia al daño por herbívoros durante los primeros estadios, aunque esto no fue explorado en este trabajo. Los altos niveles de tolerancia contribuirían a la recuperación y supervivencia de los estadios tempranos tras la depredación, logrando así alcanzar estadios posteriores. Como lo muestran estudios previos, la trayectoria ontogenética de la tolerancia parece ser fluctuante (Del Val y Dirzo, 2003; Boege y Marquis, 2005; Del Val y Crawley, 2005; Barton, 2007; Boege, *et al.*, 2007; Barton y Koricheva, 2010). Hipotéticamente, los cotiledones y plántulas muy jóvenes son tolerantes porque aún cuentan con reservas de la semilla, mismas que las dotan de recursos suficientes para compensar el tejido perdido (Weltzin *et al.*, 1998; Del Val y Crawley, 2005). En las plántulas y estadios juveniles esta

capacidad disminuye, pues los recursos de la semilla se agotan antes de que hayan logrado establecerse por completo, de modo que son incapaces de obtener los recursos necesarios para la compensación (Weltzin *et al.*, 1998; Del Val y Crawley, 2005). Al llegar a estadios posteriores en los que las plantas ya se encuentran completamente establecidas, como el pre-reproductivo y el reproductivo, esta capacidad se reanuda ya que los individuos ahora sí cuentan con recursos suficientes para compensar el daño foliar (Boege y Marquis, 2005; Del Val y Crawley, 2005). Por lo anterior, existe la posibilidad de que los estadios ontogenéticos muy tempranos (plántulas) de *T. ulmifolia* hagan frente al daño foliar mediante mecanismos compensatorios, mientras que los estadios más avanzados (pre-reproductivas y reproductivas) lo combatan mediante defensas directas e indirectas. Esto convierte a los estadios inmaduros intermedios, como el juvenil, en la fase más susceptible del ciclo de vida, desprovista de mecanismos compensatorios y defensivos. Para confirmar dicha suposición sería necesario explorar la tolerancia en distintas etapas de esta especie y también realizar estudios sobre daño foliar y mecanismos defensivos en estadios más tempranos, como plántulas y cotiledones.

Tricomas foliares

Los tricomas glandulares son un mecanismo de defensa en hojas jóvenes (Ascensao *et al.*, 1995; Valkama *et al.*, 2004). Valkama y colaboradores (2004) demuestran que las hojas jóvenes presentan mayor cantidad de flavonoides secretados por tricomas glandulares y una mayor actividad del metabolismo celular. Ambas características decrecen a medida que se incrementa la edad de las hojas, por lo que la fase secretora de los tricomas glandulares dura aproximadamente dos semanas y se da de forma simultánea con la expansión foliar, momento en el que madura la epidermis. Posteriormente, en hojas maduras y completamente expandidas, sólo se encuentran tricomas glandulares en fase post-secretora (*i. e.* colapsados). En consecuencia, se concluye que los tricomas glandulares tienen una función de protección equivalente a la de la epidermis en etapas foliares tempranas cuando ésta aún no ha madurado. La presencia de tricomas glandulares en hojas nuevas y

maduras de los tres estadios de *T. ulmifolia* indica que individuos juveniles, pre-reproductivos y reproductivos cuentan con este mecanismo de defensa. Sin embargo, dado los bajos niveles de los otros mecanismos defensivos evaluados en los juveniles, es probable que ésta sea una de sus estrategias más importantes de resistencia a la herbivoría.

La relación positiva encontrada entre la edad de la planta y la densidad de tricomas foliares es congruente con la teoría de la asignación de recursos, que predice un incremento en la defensa conforme aumenta, con la edad, la capacidad de adquirir recursos (Weiner, 2004; Barton y Koricheva, 2010; Llandres *et al.*, 2010). Además, coincide con los datos obtenidos en *Arabidopsis thaliana* donde la densidad de tricomas foliares aumenta con la ontogenia de la planta (Handley *et al.*, 2005). En el abedul (Valkama *et al.*, 2004), en *Arabidopsis thaliana* (Mauricio, 2005) y en muchas especies de Lamiaceae (Ascensao *et al.*, 1995), el número de células que se diferencian en tricomas se determina en etapas foliares muy tempranas y la densidad de tricomas foliares es mayor en hojas jóvenes que en hojas maduras de un mismo estadio ontogenético (Ascensao *et al.*, 1995; Valkama *et al.*, 2004; Mauricio, 2005). En este sentido, la densidad de tricomas disminuye conforme la hoja madura y se expande, ya que el número de tricomas permanece constante por unidad de área, la cual va en aumento (Ascensao *et al.*, 1995; Valkama *et al.*, 2004; Mauricio, 2005). Esto coincide con el modelo de diferenciación celular y desarrollo de tricomas propuesto por Hülskamp (2004), en el que se postula que la diferenciación de las células epidérmicas en tricomas se debe a un mecanismo de inhibición mutua. Partiendo de un campo uniforme de células epidérmicas no diferenciadas, cada una comienza a producir factores genéticos promotores de la diferenciación en tricomas. La secreción de dichos factores genéticos activa la expresión de otros factores genéticos que suprimen los factores promotores de tricomas de las células vecinas.

El modelo anterior posiblemente repercute en *T. ulmifolia* y otras especies con un patrón de incremento en la densidad de tricomas a lo largo de la ontogenia de la planta. Aunque la densidad de tricomas queda determinada en estadios foliares tempranos, el número de tricomas que se

diferencian en una hoja nueva depende de la cantidad de factor supresor que las células de dicha hoja sean capaces de expresar. A su vez, esto está en función de los recursos de la hoja, los cuales dependen del estadio de la planta. En consecuencia, una posibilidad es que las células de hojas nuevas en plantas reproductivas que cuentan con abundantes recursos y sean capaces de expresar con mayor intensidad los factores promotores de la diferenciación celular en tricomas. Esto ocasiona que se diferencien una gran cantidad de tricomas en muchas de las células, aumentando con ello la densidad en estadios avanzados. Se espera que suceda lo contrario en estadios tempranos, cuyas células disponen de menor cantidad de recursos, por lo que expresan factores de diferenciación en menor proporción, lo que explica la baja densidad de tricomas observada. No obstante, hacen falta estudios precisos para demostrar que efectivamente está acoplado de este modo el mecanismo de diferenciación celular en tricomas con la cantidad diferencial de recursos foliares entre estadios.

Para conocer cuál es el papel protector de los tricomas se deben evaluar los costos asociados a la presencia y producción de esta defensa en función de los beneficios aportados por éstos. Los principales beneficios de la protección contra herbívoros son la irritación bucal y el impedimento mecánico del desplazamiento (Gutschick, 1999), los cuales contribuyen a reducir el daño. Sin embargo, estos derivados epidérmicos también acarrearán costos ecológicos en tres sentidos fundamentales: costos de elaboración, costos de oportunidad, pues disminuyen la incidencia y captación de luz y costos por infección o herbivoría que incrementan las probabilidades de infección por hifas al proveerles medios de anclaje (Gutschick, 1999); además proveen puntos de anclaje para los hilos de seda producidos por las larvas de insectos fitófagos (Cardoso, 2008). En el caso de *T. ulmifolia* los costos reales son los de elaboración y los de infección o herbivoría. Los primeros son inevitables en cualquier sistema. Los costos de infección o herbivoría también se consideraron dadas las observaciones de hojas al MEB, donde se encontraron frecuentemente hilos atados entre los tricomas, que bien podrían ser hifas o seda, así como una gran cantidad de bacterias

(ver Historia natural). Además, existen reportes previos de infección en otros órganos de esta especie por hongos de los géneros *Acladium*, *Spegazzinia* y *Alternaria*, que proliferan en los NEF (González, 1996). Con respecto a los costos de oportunidad en términos de captación luminosa no se sabe si efectivamente representan un costo o un beneficio termorregulador para la planta, pues para dilucidarlo harían falta estudios y evidencias. Es probable que se paguen los costos de elaboración e infección a cambio de los beneficios relacionados con la disminución en el nivel de daño foliar por herbívoros. Por último, cabe mencionar que se encontraron dos tipos de tricomas que no habían sido reportados previamente por González y Arbo (2004) para esta especie: los tricomas pluricelulares uniseriados y las emergencias mesetiformes, lo cual amplía la diversidad del repertorio de *T. ulmifolia*.

Dureza foliar

Entre todas las características físicas de las hojas, la dureza foliar (estimada mediante la masa foliar específica) ha sido considerada como el factor más importante en algunos estudios que comparan el nivel de defensa con la cantidad de daño recibido (Thomas *et al.*, 2010; Carmona *et al.*, 2011). Reportes previos constatan cambios en la dureza foliar a lo largo de la ontogenia, tanto en angiospermas como en gimnospermas (Day *et al.*, 2000; Apple *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2010). Pese a ello, en el caso de *T. ulmifolia* la dureza foliar (estimada como masa foliar específica) mostró un patrón constante a lo largo de la ontogenia. Trabajos anteriores que evalúan la dureza foliar por distintos mecanismos han registrado cambios ontogenéticos. Por ejemplo, en *Pseudotsuga menziesii* se buscaron diferencias a través de la anatomía mediante cortes transversales de las acículas en plantas jóvenes y maduras (Apple *et al.*, 2002). En este caso, las acículas de organismos maduros presentan mayor cantidad de lignina, lo que les confiere más dureza. También en gimnospermas, Day y colaboradores (2000) trabajaron con el género *Picea* y estimaron la dureza foliar mediante un cociente del peso (g) por área (cm²), tal como se estimó en este trabajo y encontraron que la masa foliar específica disminuye con la edad de las plantas. Sería conveniente explorar otros métodos

para medir la dureza foliar antes de afirmar que, efectivamente la dureza permanece constante durante la ontogenia en *T. ulmifolia*, ya que tal vez esta forma de evaluar la dureza foliar no fue la óptima

Glucósidos cianogénicos

A pesar de que existen reportes de poblaciones cianogénicas de *T. ulmifolia* en Jamaica (Schappert y Shone, 1995), los tres estadios aquí estudiados de la población veracruzana resultaron ser acianogénicos. En este caso es poco probable que factores abióticos, como las bajas temperaturas, ejerzan una presión de selección negativa sobre la cianogénesis (Seigler, 1991; Schappert y Shone, 1995) dado que la población estudiada se localiza en una región tropical y crece en un ambiente cálido húmedo. Pero la acianogénesis podría ser explicada por la ontogenia (Seigler, 1991; Schappert y Shone, 1995), de modo que estadios más jóvenes como cotiledones y plántulas resulten sí ser cianogénicos (Ochoa-López, com. pers.). Estudios previos aportan evidencias de gran cantidad de metabolitos secundarios en estadios muy tempranos de desarrollo (Barton, 2007 y Barton y Koricheva, 2010) y apoyan la hipótesis de cianogénesis en plántulas de *T. ulmifolia*. Además, éste parece ser el caso de *Turnera ulmifolia* puesto que se ha detectado la presencia de compuestos cianogénicos en cotiledones (Ochoa-López, com. pers.). Por lo tanto, se sugiere realizar pruebas en estadios tempranos antes de descartar la cianogénesis en esta población.

Taninos

La purificación de taninos condensados a partir de las hojas de *T. ulmifolia* arrojó cantidades despreciables, por lo que estas plantas carecen de esta defensa química. Sin embargo, al igual que en el caso de los glucósidos cianogénicos, no se descarta la posibilidad de que en etapas jóvenes sí existan taninos condensados, por lo que se recomienda hacer estudios para detectar la presencia de estos compuesto en plántulas o cotiledones.

Dada la gran diversidad de metabolitos secundarios que poseen las plantas, es posible que la resistencia química sí sea parte de la estrategia defensiva de *T. ulmifolia* pero que sean otros los compuestos que actúen para reducir el daño. No obstante, ante la falta de metabolitos hallados en esta población de *T. ulmifolia* se sugiere que dependa fundamentalmente de sus defensas físicas y bióticas, que además han sido reportadas previamente como las más eficientes para otras especies (Llandres *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2010; Carmona *et al.*, 2011). Además, Llandres y colaboradores (2010) prueban que existe una disyuntiva en la asignación de recursos entre la defensa directa o indirecta. Mediante pruebas de apetecibilidad con orugas, ellos demuestran que los fitófagos prefieren plantas y estadios en los que ya se han desplegado mecanismos de defensa indirecta, sobre aquellos que aún carecen de ellos. Con ello comprueban que estadios jóvenes no colonizados de especies mirmecófitas dependen de mecanismos directos de defensa para defenderse de los herbívoros. También encontraron que los mecanismos bióticos de defensa son más efectivos, pues estas plantas presentan menores niveles de daño en campo a pesar de que los fitófagos en el laboratorio muestran una clara preferencia por ellas.

Defensas bióticas

Abundancia de los NEF

Los NEF de *Turnera ulmifolia* presentan, en todos los estadios, la organización típica de glándulas de vida media corta *sensu* Elias y colaboradores (1975). Dicha organización se caracteriza por la presencia de una base o estípita, un reborde, tejido secretor formado a partir de células epidérmicas modificadas y una vascularización propia (Elias *et al.*, 1975). Estos autores también observaron que la actividad de los NEF en *T. ulmifolia* no se sincroniza con la época de floración por lo que los clasifican como extranupciales. Afirman que su actividad se encuentra relacionada preferentemente con la edad de las hojas, siendo mayor en hojas jóvenes.

Los estudios realizados hasta ahora sobre la variación ontogenética de NEF muestran un patrón de reducción en la densidad de dichas glándulas a lo largo de la ontogenia en árboles de

Populus tremuloides, donde plantas más jóvenes poseen más NEF (Wagner *et al.*, 2007; Wooley *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios de plantas mirmecófitas demuestran que cuando éstas inician su vida carecen aún del mutualismo, el cual se establece en etapas ontogenéticas posteriores (Del Val y Dirzo, 2003) a causa de los grandes costos asociados con mantener dicha interacción. Los resultados en *T. ulmifolia* muestran un patrón de incremento de NEF con la ontogenia, que concuerda con muchos otros estudios de mirmecofilia, pero pueden explicarse de manera conjunta con base en la teoría de la defensa óptima y la teoría de asignación de recursos. Las plantas reproductivas cuentan con mayor cantidad de recursos, necesarios para diferenciar más NEF/hoja y además las hojas apicales de plantas reproductivas son muy valiosas ya que están asociadas con las estructuras reproductivas, y por ello es necesario dotarlas de mayor protección.

Anatomía y ecología de la secreción del néctar extrafloral

Muchos estudios ecológicos dan gran importancia a las diferencias en la asignación de recursos a distintas estructuras y funciones y desdeñan los mecanismos fisiológicos a nivel molecular o celular (Küppers, 1994; Schwinning y Weiner, 1998). Este enfoque ha impedido complementar las evidencias ecológicas con evidencias moleculares, celulares, fisiológicas y mecánísticas para explicar ciertos patrones en la producción de defensas. Por ejemplo, aunque el ámbito de la mirmecofilia ha sido muy estudiado y los NEF son uno de los componentes fundamentales para dicha interacción, aún no se cuenta con estudios que vinculen datos de la anatomía de los NEF con los efectos que tienen sobre la adecuación de las plantas o la reducción del daño foliar por herbívoros. Este trabajo refleja un primer esbozo sobre la relación que existe entre la anatomía de los nectarios, la secreción y las consecuencias ecológicas de ello en la interacción con los herbívoros y el tercer nivel trófico.

Debido a la alta mortalidad de los juveniles, no fue posible registrar el volumen o concentración del néctar extrafloral ni el patrullaje de hormigas en este estadio. Pese a ello, es posible establecer que las plantas de *T. ulmifolia* carecen de defensas indirectas durante los

primeros estadios por la falta de secreción y patrullaje de hormigas, lo coincide y se confirma con las evidencias anatómicas y estructurales encontradas. Los nectarios extraflorales de los juveniles son inmaduros e histológicamente incapaces de secretar néctar por ser glándulas con una epidermis secretora incipiente (Fig. 14). Su morfología carente de bordes ascendentes también impide que contengan la gota de secreción en caso de producirla, de modo que ésta se escurriría por el peciolo. La maduración de las glándulas se da hasta el estadio pre-reproductivo y el auge de la secreción ocurre durante la etapa reproductiva, cuando se duplican los estratos de la epidermis secretora (Figs. 17, 18, 22 y 23).

Lo anterior coincide con lo reportado en trabajos previos que afirman que, en la mayoría de los casos conocidos de especies con defensas bióticas, el mutualismo se establece en estadios ontogenéticos avanzados (Del Val y Dirzo, 2003; Wooley *et al.*, 2007; Llandres *et al.*, 2010; Narbona y Dirzo, 2010). Por ejemplo, Del Val y Dirzo (2003) afirman que la asociación mirmecoflica aumenta la adecuación de las plantas exitosamente colonizadas, pero resaltan el hecho de que algunas plantas, como *Cecropia peltata*, no comienzan su vida asociadas a las hormigas, sino que éstas arriban a la planta hasta que cuenta con las estructuras morfo-fisiológicas capaces de proveerles refugio y alimento para las hormigas. Esta madurez se da cuando la planta alcanza aproximadamente 1-1.3 m de altura.

El notable incremento en el volumen y concentración del néctar extrafloral producido por las plantas reproductivas (Figs. 22 y 23), en comparación con aquel secretado en plantas pre-reproductivas, podría estar explicado por los cambios de tamaño, anatomía y estructura tanto de las glándulas como de la planta en su conjunto: un aumento en las dimensiones de la planta implica órganos responsables de la adquisición y producción de nutrientes de mayor tamaño, lo cual se ve reflejado en una mayor disponibilidad de recursos para las plantas reproductivas (Boege y Marquis, 2005). Esto permite destinar mayor cantidad de recursos a la defensa y explica el incremento en el grosor de la epidermis secretora junto con el aumento en el tamaño de la glándula. Estas características hacen posible una mayor secreción y mejor contención del néctar extrafloral en el

exterior del nectario (Figs. 17 y 18), ya que sus pronunciados rebordes ascendentes y su amplia estructura de copa contienen eficientemente gotas de néctar de mayor tamaño. Estos cambios parecen ser responsables de una mayor protección contra los herbívoros ya que atraen más hormigas.

Atracción de hormigas y patrullaje

El grado de atracción que los NEF ejercen sobre las hormigas reditúa en el nivel de defensa indirecta del que gozan las plantas mirmecófitas. La atracción de depredadores mediante NEF es un mutualismo facultativo que ayuda a la planta a protegerse contra los herbívoros (Sugiura *et al.*, 2006; Bentley, 1976). Sin embargo, la mera presencia de hormigas no es sinónimo de protección contra los herbívoros, pues ésta ocurre en función del tamaño y tipo de alimentación de las hormigas visitantes, pues algunas de ellas buscan los frutos y semillas (Cuautle *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso de *T. ulmifolia*, se ha demostrado que las plantas que son visitadas por hormigas presentan menores niveles de daño por herbívoros (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Cuautle y Rico-Gray, 2003).

Según Díaz-Castelazo y colaboradores (2005), el tamaño de la glándula no es un indicador directo del nivel de protección que ofrece a la planta. Un mejor indicador de ello sería la estructura anatómica de la glándula. En particular, tanto el grado de diferenciación tisular del órgano, como la vascularización y el número de estratos del tejido secretor pueden proveer un buen estimador de la capacidad secretora del nectario. De ser complementados con información sobre las dimensiones del nectario, estos factores pueden aportar un panorama completo del nivel de protección que el nectario está ofreciendo, pues se correlacionan con el volumen y tasa de secreción de la glándula (Díaz-Castelazo *et al.*, 2005). Con las bases morfológicas anteriores, podemos afirmar que los nectarios capaces de atraer más hormigas son aquéllos presentes en plantas reproductivas, ya que poseen un tejido secretor de mayor grosor con una epidermis secretora biestratificada. Bentley (1976) demuestra que existe una relación inversamente proporcional entre el nivel de daño y la

cantidad de néctar presente, ya por vía natural o experimental, en las hojas de una planta. Dicha relación también parece cumplirse para *T. ulmifolia* ya que la gran cantidad y calidad del néctar extrafloral secretado por las hojas de plantas reproductivas parece explicar los bajos niveles de daño por herbívoros y por ende la mirmecofilia en esta especie representa un mecanismo de defensa indirecto, como ha sido demostrado previamente (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Cuautle y Rico-Gray, 2003; Cuautle, 2005; Díaz-Castelazo, 2005).

Modo de secreción

Elias y colaboradores (1975) clasifican los NEF de *T. ulmifolia* como “Grubennektarien”, es decir, nectarios en forma de copa, y afirman que son similares a aquellos presentes en las familias Leguminosae y Passifloraceae ya que poseen vascularización ramificada, una hendidura o cavidad apical carente de poro y epidermis delgada (Fig. 23). La liberación del néctar en estas familias se da mediante su acumulación por debajo de la cutícula, lo que genera una elevada presión que la fractura y el néctar queda alojado en la cavidad apical (Elias *et al.*, 1975). Sin embargo, los NEF del género *Turnera*, y en particular los de *T. ulmifolia* (Fig. 18), se distinguen de la mayoría de los presentes en Passifloraceae y Leguminosae por presentar un poro (González y Ocantos, 2006).

La ruta de secreción y de acumulación en esta especie está clara y ha sido aceptada unánimemente por varios autores (Elias *et al.*, 1975; Díaz-Castelazo *et al.*, 2005). Sin embargo, en torno al modo de secreción y detalles de la cutícula existe una polémica. Elias y colaboradores (1975) afirman que la secreción se da mediante una ruptura de la cutícula por la presión del líquido acumulado entre ésta y la epidermis secretora. Sin embargo, esta explicación es poco convincente por varias razones. La primera estriba en que estos autores no realizaron cortes histológicos para evidenciar su hipótesis y únicamente tomaron fotografías macroscópicas de los nectarios. Además, ni en los trabajos con cortes histológicos (González, 1996; González y Ocantos, 2006) ni en el presente, existen evidencias de una cutícula reventada. Podría suponerse que la cutícula se regenera tras cada evento de secreción, pero esto implicaría una veloz regeneración de la cutícula en pocas

horas, dada la secreción activa y constante de néctar durante todo el día en *T. ulmifolia*. Esta situación que resulta poco probable.

La explicación alternativa postula que el néctar se acumula entre la epidermis y la cutícula y se libera a través de la porción más delgada de la cutícula que coincide con un poro (González, 1996; González y Ocantos, 2006). El problema de esta explicación estriba en su definición del poro, pues afirman que anatómicamente no existe ninguna apertura y que dicho poro es una protuberancia del parénquima glandular que eleva la epidermis secretora en una zona limitada de la depresión central de la cúpula del nectario (González, 1996). También sostienen que las células de la epidermis secretora poseen cuñas cuticulares que permiten el anclaje de la cutícula a las células, aun cuando el néctar acumulado presiona elevando la cutícula, de forma que ésta no se interrumpa nunca. Entonces, el néctar emana a través del centro de la depresión donde la cutícula se adelgaza notablemente y por ende ofrece el lugar más favorable para su salida (González, 1996; González y Ocantos, 2006). Debido a lo anterior y a la falta de rupturas cuticulares, concluyen que la secreción debe ser transcuticular (González y Ocantos, 2006), lo cual implica que una capa muy delgada pero cerosa, como es la cutícula, se torne permeable al paso de una sustancia principalmente acuosa, como es el néctar.

Las evidencias histológicas de este trabajo coinciden con algunos reportes previos sobre los nectarios de esta especie en donde los clasifican como nectarios elevados (según la clasificación de Zimmermann, 1932), es decir, glándulas vascularizadas y bien diferenciadas que se encuentran por encima del tejido foliar (Díaz-Castelazo *et al.*, 2005). Este trabajo también respalda con evidencias anatómicas que la secreción del néctar en esta especie se da a través de un poro transcuticular, una estructura anatómica concreta, y por ende discrepa del resto de las explicaciones (Elias *et al.*, 1975; González, 1996; González y Ocantos, 2006). Se define el poro como una estructura anatómica que presenta una apertura y un canal que atraviesa la cutícula y conecta el exterior con el interior de la glándula, lo cual permite que el néctar que se acumula entre la cutícula y la epidermis salga gradualmente hasta alojarse en la cúpula externa del nectario.

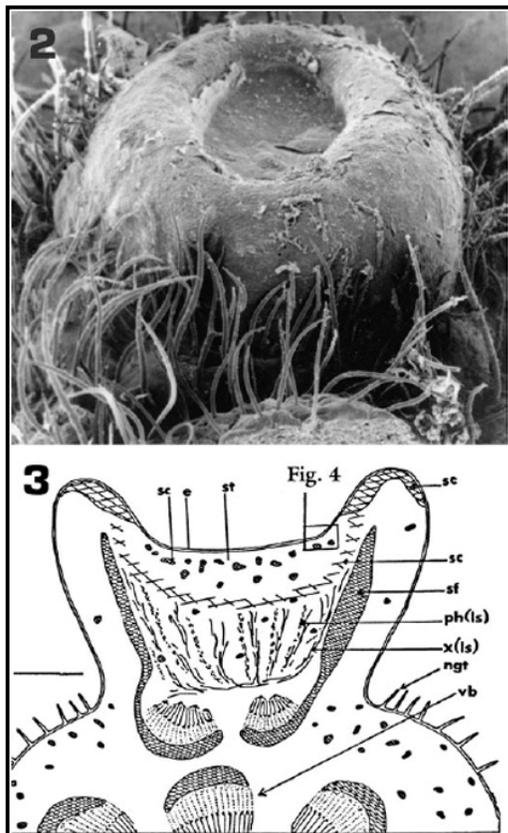


Figura 23. Nectario en forma de copa (Grubennectarien) de *Inga feuillei* (Leguminosae) para ejemplificar la histología de los NEF de *Turnera ulmifolia* ya que se argumentaba que guardan un gran parecido. 2) Morfología externa mediante MEB. 3) Diagrama de un corte histológico transversal del nectario.

Símbolos: sc, células de esclerenquima; e, epidermis; st, tejido secretor; sf, fibras de esclerenquima; ph(ls), elementos del floema en corte longitudinal; x(ls), xilema en corte longitudinal; ngt, tricomas no glandulares; vb, haces vasculares.

Tomado de Pascal *et al.*, 2000.

El néctar extrafloral de esta planta posee una concentración balanceada de azúcares de uso directo (Elias *et al.*, 1975). Esto convierte a la secreción en una buena alternativa para la dieta de los insectos forrajeadores asociados. Por lo mismo, Elias (1975) postula que estos atributos son propios de una glándula evolutivamente derivada. Lo anterior es congruente con las observaciones morfológicas y taxonómicas de Díaz-Castelazo y colaboradores (2006), quienes afirman que, de acuerdo con los caracteres florales, las series más avanzadas del género *Turnera* son Anomalae y *Turnera*, y la serie *Turnera* (=Canaligerae) presenta además los NEF más especializados. Las tendencias evolutivas para los nectarios extraflorales de este género apuntan a que existen nectarios poco especializados que morfológicamente son planos sin poro (*Turnera*: Anomalae); formas intermedias, planos con poros foveolados (*T. blanchetiana* y *T. panamensis*); glándulas más especializadas elevadas, globosas, hemisféricas o cupuliformes (*Turnera*: Anomalae, *Stenodyctia*, *Leiocarpae* y *Turnera* con un poro no conspicuo o no observado); y finalmente, las glándulas más derivadas, que son cupuliformes y con un poro crateriforme/mesetiforme (*Turnera*: *Turnera* y *Leiocarpae*) (González, 1996 y Díaz-Castelazo *et al.*, 2005).

Sectorización de las defensas indirectas

La mayor secreción de los NEF se observó en hojas apicales de plantas reproductivas, y casi siempre en aquéllas asociadas a estructuras reproductivas (ver Historia natural). Las observaciones en campo sobre la producción de néctar principalmente en la porción apical del brote apuntan a que los NEF ubicados en hojas apicales de la planta presentan una mayor actividad que aquellos hallados en la porción basal. Este patrón de sectorización de las defensas indirectas, es decir, la concentración de las mismas en una sección de la planta, había sido reportado previamente para *T. ulmifolia* (Elias *et al.*, 1975 y González, 1996) y también se reporta para otras especies como *Populus tremuloides* (Wooley *et al.*, 2007). Sin embargo, esto no implica a los NEF en una función nupcial, aunque no se descarta debido a trabajos previos que muestran el papel múltiple de ciertos insectos como polinizadores, dispersores y guardianes (Cuautle *et al.*, 2005; Narbona y Dirzo, 2010). Por el contrario, confirma que las hojas asociadas a estructuras reproductivas son de mayor valor para la planta en términos de adecuación. Además, considerando que estas plantas son perennes, iteróparas y que las estructuras reproductivas se ubican en la sección apical del brote, podría ser muy importante para la adecuación proteger más las flores y frutos, como lo predicen los cuatro supuestos de la teoría de la defensa óptima (Stamp, 2003).

En el caso de las mirmecofíticas de *T. ulmifolia* ya se ha demostrado que las hormigas tienen un papel dual como dispersoras y defensoras (Cuautle *et al.*, 2005), pero ahora se discute cómo esto repercute en la sectorización de las defensas indirectas. Entre las plantas cuya dispersión de semillas depende de las hormigas existen tres mecanismos que favorecen el hallazgo del fruto con semillas por estos insectos (Cuautle *et al.*, 2005). El primero de ellos consiste en postrar el fruto en el suelo o cerca de éste mediante la expansión del pedúnculo y es característico de las hierbas del hemisferio norte. El segundo consiste en tirar el fruto ya maduro, que explota al caer y libera las semillas directamente en el suelo; es típico de las hierbas del hemisferio sur. El tercer mecanismo, típico de

T. ulmifolia, consiste en la presencia de NEF que favorecen un forrajeo continuo de hormigas omnívoras, situación que influye positivamente sobre la dispersión de semillas atrayendo a una determinada comunidad de hormigas.

Considerar varias o todas las recompensas vegetales de manera simultánea al analizar la interacción nos lleva a pensar la forma en que éstas pueden influirse mutuamente y nos ayuda a entender mejor la historia evolutiva de dicha interacción. Se ha sugerido que un mecanismo que presentan las plantas para obtener fidelidad por parte de los mutualistas es ofrecer una variedad de recompensas cuyo suministro sea constante espacial y temporalmente (Beattie y Hughes, 2000). *T. ulmifolia* efectivamente produce de manera constante durante el año un par de recompensas (elaiosomas y néctar extrafloral) que conforman parte importante de la dieta de sus hormigas mutualistas (Cuautle *et al.*, 2005), aunque la cantidad producida es variable (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Díaz-Castelazo *et al.*, 2004).

A pesar de que se ha descrito la asociación planta-hormiga en el caso de *T. ulmifolia* como difusa, facultativa y fortuita, la selección natural beneficia a aquellos individuos que atraen un conjunto amplio y diverso de hormigas (Torres-Hernández *et al.*, 2000), pues una mayor diversidad de hormigas proporciona más ventajas para la planta: servicios más variados como la dispersión y la defensa (Cuautle *et al.*, 2005). Además, distintas hormigas son capaces de remover o combatir una mayor diversidad de enemigos vegetales y le garantizan a la planta forrajeo en una escala espacio-temporal mayor (Torres-Hernández *et al.*, 2000). Por lo tanto, debido al rol múltiple de las hormigas en la interacción mirmecofílica con *T. ulmifolia* a ésta le resulta provechoso, en términos de adecuación, atraer una gran variedad de hormigas. De hecho, *T. ulmifolia* es la especie vegetal asociada con la comunidad de hormigas más grande en las dunas costeras de La Mancha (25 especies) y la segunda especie vegetal con más diversidad de hormigas asociadas a los NEF (8 a 11 especies) (Díaz-Castelazo *et al.*, 2004; Cuautle *et al.*, 2005). Entre las hormigas asociadas a las poblaciones veracruzanas de *T. ulmifolia* existen algunas que son buenas dispersoras de semillas y malas defensoras y viceversa, como *Forelius analis* y *Camponatus atriceps* (Cuautle *et al.*, 2005);

sin embargo, un arreglo similar se ha encontrado en las poblaciones del sureste de Brasil (Cogni *et al.*, 2000). Únicamente desde esta perspectiva es posible entender por qué la planta mantiene asociaciones con hormigas diminutas incapaces de brindar servicios defensivos, pero que parecen tener un rol fundamental en la dispersión de semillas (Cuautle *et al.*, 2005).

Estacionalidad de las defensas indirectas

En la mayoría de los casos, las poblaciones de herbívoros incrementan su abundancia con el inicio de la época de lluvias y decrecen con su fin (Coley y Barone, 1996). Por otro lado, algunas estrategias de defensa contra la herbivoría dependen de la estacionalidad. Por ejemplo, existen especies que escapan de los herbívoros produciendo sus hojas durante la temporada seca, cuando las poblaciones de éstos disminuyen (Aide, 1992; Aide, 1993), mientras que otras presentan una producción rápida y sincrónica de hojas (Coley y Barone, 1996) para disminuir la probabilidad de cada hoja de ser encontrada y atacada por un fitófago, dada la abundancia de hojas disponibles. Los datos de un año obtenidos en este trabajo indican que la población de *T. ulmifolia* estudiada no es una excepción, aunque faltan estudios más prolongados para confirmarlo. A pesar de que esta especie es perenne, parece presentar una clara estacionalidad marcada por la época de lluvias y de mayor temperatura (junio a octubre). Durante esta temporada las plantas gozan de condiciones favorables para su crecimiento en altura y follaje, enfrentan bajos niveles de mortalidad y ocurre el pico de floración. Pero con la llegada del invierno, cuando la temperatura y la precipitación disminuyen drásticamente, las plantas sufren abscisión de buena parte de sus hojas e incluso parte de sus tallos pueden secarse o morir, lo que se refleja en un crecimiento negativo de altura y follaje. El invierno resultó ser también la época de mayor mortalidad. Aunque las reproductivas y juveniles sufrieron altos niveles de mortalidad, las plantas más afectadas en este periodo fueron las juveniles, lo cual puede deberse a que las reproductivas tienen grandes probabilidades de retoñar apenas mejoren las condiciones. La capacidad de rebrote de las plantas reproductivas quizás se deba a los recursos almacenados en sus raíces, los cuales son capaces de mantenerlas en latencia durante el

periodo en que pierden sus hojas por completo. Debido a que las juveniles no cuentan con tal ventaja, la mayoría muere al perder sus hojas.

El nivel de daño por herbívoros que reciben las plantas también presentó un patrón estacional marcado, cuyo pico máximo se reporta durante la temporada de lluvias y el mínimo en el invierno. Los niveles mínimos y máximos de daño también coinciden temporalmente con los picos en el crecimiento en altura y follaje, la reproducción y el pico de la defensa indirecta medida como cantidad de NEF/hoja. Por lo tanto, cuando las plantas poseen más hojas y mayores dimensiones, reciben también mayor daño y presentan mayor densidad de NEF/hoja. Sin embargo, ninguno de los mecanismos de escape mencionados parece estar presente en esta población. Puesto que el resto de las defensas no se registró a lo largo de todo el año, no es posible conocer si estos mecanismos defensivos también presentan un patrón estacional, tal como lo han mostrado en otros sistemas (Forkner *et al.*, 2008).

Es posible atribuir la coincidencia temporal entre los picos de las variables antes mencionadas a tres factores distintos en torno a los cuales se sincronizan los demás:

- a) El daño por herbívoros. La sincronía entre el pico en la densidad de NEF/hoja y el de daño foliar reflejan una defensa inducida ante altos niveles de daño concentrados en un periodo anual y cíclico. Por lo tanto, la selección natural ha favorecido a aquellos individuos de esta población capaces de diferenciar mayor cantidad de glándulas nectaríferas en el tejido peciolar durante la época de lluvias.
- b) La reproducción. Durante el verano una gran cantidad de hojas portan estructuras reproductivas y por lo tanto cobran mayor valor para la planta en términos de adecuación. Por esta razón, la selección natural favorece a aquellos individuos que defienden mejor sus hojas contra los herbívoros diferenciando mayor cantidad de nectarios. Además, las hojas portadoras de frutos requieren atraer hormigas para la dispersión de las semillas, como ya se mostró previamente (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Cuautle *et al.*, 2005).

- c) La cantidad de recursos. Durante la temporada de lluvias, las plantas disponen de más recursos, principalmente agua. Esto les permiten invertir recursos en la defensa indirecta por medio del costoso proceso de diferenciación del tejido peciolar en glándulas nectaríferas. Lo mismo sucede con los herbívoros, quienes disponen del follaje y niveles adecuados de temperatura y humedad para su desarrollo y, por tanto, su población aumenta durante esta temporada y con ello su daño a las plantas hospederas. Por estos motivos, se asume que la sincronía es consecuencia directa de la cantidad de recursos presentes en el ecosistema.

Sin embargo, la explicación más plausible involucra la acción conjunta de los tres factores. La temporada de lluvias representa un periodo de recursos abundantes para todo el ecosistema, de tal modo que el desarrollo de la fase larvaria de los fitófagos y del daño ocasionado por éstos se concentra en el mismo periodo. De manera paralela, las plantas disponen de recursos suficientes para crecer, reproducirse y diferenciar estructuras de defensa indirecta. Y, de forma adicional, la reproducción imprime un mayor valor para la adecuación sobre las hojas apicales portadoras de estructuras reproductivas, así como una mayor dependencia de los servicios de las hormigas, lo cual actúa como una presión de selección doble que favorece un incremento en los NEF y la secreción en estas hojas. El incremento en el daño por herbívoros también actúa como una presión de selección adicional que favorece un incremento en los mecanismos indirectos de la defensa.

Consecuencias poblacionales y evolutivas de las trayectorias

El concepto de sucesión ontogenética propuesto por Fonseca y Benson (2003) parte de la definición de un fenómeno sucesional de Begon y colaboradores (1996) como un patrón no estacional, direccional y continuo de colonización y extinción de distintas poblaciones de especies, pero disparado por el nacimiento y regulado por los subsiguientes cambios morfológicos y estructurales durante el desarrollo del hospedero que permiten la colonización progresiva de distintas especies. Algunos estudios demográficos sugieren que plantas más longevas se ven favorecidas en ambientes impredecibles (Cole, 1954; Orzack y Tuljapurkar, 1989) y para los mutualistas la variación en la

calidad de la planta representa una variación ambiental. Por lo tanto, interactuar con múltiples socios de calidad variable favorece la longevidad de las especies mutualistas (Palmer *et al.*, 2010). Los modelos demográficos proveen un marco teórico para entender los costos específicos de los mutualistas a lo largo de la ontogenia ya que predicen la importancia relativa de las distintas tasas de crecimiento poblacional a lo largo de la ontogenia (Enright *et al.*, 1995; Caswell, 2001; Palmer *et al.*, 2010). Otros modelos muestran que las correlaciones negativas entre diversas medidas del desempeño a través del tiempo pueden aminorar el efecto negativo de la variación ambiental e incluso incrementar la adecuación (Doak *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2010). Esto explica cómo conjuntos de simbioses que generan efectos negativos en los mutualistas pueden finalmente contribuir a aumentar la adecuación aún más que aquellos mutualistas considerados óptimos (Palmer *et al.*, 2010). Estos enfoques han sido empleados para explicar las trayectorias ontogenéticas de la defensa (Boege y Marquis, 2005).

Puesto que la selección natural actúa sobre la adecuación del individuo a lo largo de toda su vida, la adecuación de los mutualistas más longevos (*i.e.* las plantas) está determinada por la integración múltiple de los distintos mutualistas temporales (*i.e.* las hormigas) (Fonseca y Benson, 2003; Palmer *et al.*, 2010). Se ha demostrado en al menos tres especies distintas (*Acacia drepanolobium* (Palmer *et al.*, 2010), *Tachigali myrmecophila* y *Tachigalei polyphylla* (Fonseca y Benson, 2003)) que la comunidad de hormigas asociada cambia durante la ontogenia. En los tres casos, los efectos de una especie de hormigas en la adecuación de la planta dependen de sus asociaciones pasadas y futuras con otras hormigas, por lo que es necesario conocer los efectos de los mutualistas de manera integrada para entender cómo la selección natural moldea las estrategias de historia de vida de las especies mutualistas (Fonseca y Benson, 2003; Palmer *et al.*, 2010).

Los estudios demográficos sobre *A. drepanolobium* demuestran que ninguna de las cuatro especies de hormigas asociadas es un mutualista ideal, pues todas tienen efectos distintos e incluso contrastante- sobre la reproducción y supervivencia de la planta. No obstante, la adecuación de las plantas aumenta cuando se asocian con todas las especies de hormigas mutualistas, aún cuando

entre éstas se incluyen especies castrantes (Palmer *et al.*, 2010). En el caso de *Tachigali*, dos especies hermanas (*T. myrmecophila* y *T. polyphylla*) albergan ocho especies diferentes de hormigas a lo largo de su ontogenia, de modo que cada especie se especializa en colonizar una etapa ontogenética específica (Fonseca y Bensonsn, 2003). En este ejemplo, las interacciones directas sugieren que la competencia es la fuerza que guía la comunidad de hormigas, pues las distintas colonias se ven obligadas a pelear por sitios de anidamiento (Fonseca y Benson, 2003), mismos que han probado ser el factor más importante en la regulación del tamaño de las colonias (Fonseca, 1993). Sin embargo, al considerar la cadena de interacciones indirectas es posible notar que las hormigas de etapas sucesionales tempranas garantizan el crecimiento del hospedero y con ello la supervivencia de colonias posteriores. Asimismo, la protección brindada por las últimas colonias de hormigas permite una gran producción de semillas vegetales en el único evento reproductivo del árbol, lo cual repercute en un beneficio para las colonias de etapas tempranas. De este modo, se genera una cadena de interacciones indirectas, transgeneracionales y benéficas entre las distintas especies colonizadoras de hormigas que repercute también en una mayor adecuación del hospedero (Fonseca y Benson, 2003).

Algo similar sucede con *T. ulmifolia*, donde existe un gradiente de servicios que va desde especies que promueven la dispersión hasta aquellas otras que defienden contra los herbívoros (Cuautlte *et al.*, 2005). Por lo tanto, la selección natural favorece a las plantas hospederas que se asocian con una amplia variedad de especies de hormigas (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2010). La diversa comunidad de hormigas asociadas con *T. ulmifolia* ya ha sido explicada previamente en términos de los diferentes servicios que esta diversidad de especies aportan como dispersoras o defensoras ahuyentando una amplia gama de herbívoros y patógenos (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Cuautle *et al.*, 2005). Sin embargo, sería interesante conocer los cambios en la comunidad y la eficiencia de las hormigas, así como los distintos beneficios o servicios que ofrece esta amplia comunidad a lo largo de la ontogenia de *T. ulmifolia*.

Todos los mutualismos entre plantas e insectos tienen un común denominador: involucran un mutualista móvil y uno sedentario y se espera que la selección natural no opere de igual modo en ambos agentes (Bronstein *et al.*, 2006). Los agentes sedentarios requieren desarrollar señales visuales u olfatorias que permitan su rápida localización por parte del agente móvil. El agente sedentario también debe ofrecer recompensas que capturen la atención del agente móvil por el tiempo durante el cual se requieren los servicios. Las recompensas ofrecidas también tienden a maximizar los servicios, por ejemplo, los azúcares del néctar extrafloral son una fuente rápida de energía que permite el despliegue de conductas más agresivas por parte de las hormigas (Bronstein *et al.*, 2006). Por su parte, los agentes móviles, con excepción de algunos mutualistas obligados, son capaces de visitar múltiples plantas, compararlas y decidir cuáles visitar, cuáles abandonar o ignorar y cuánto tiempo permanecer en cada una de ellas. En el caso particular de las hormigas, éstas generalmente forrajean cerca de sus nidos y aquéllas asociadas en mutualismos obligados lo hacen exclusivamente en sus individuos huéspedes. Sin duda alguna, esto representa una presión de selección sobre la recompensas de las plantas (Bronstein *et al.*, 2006). A través de la selección natural, los mutualistas mirmecofílicos también han modelado otras características vegetales no necesariamente asociadas con el mutualismo como la pérdida de mecanismos alternativos de defensa, por ejemplo, las defensas químicas. Sin embargo, se sabe muy poco de las características de las hormigas que están bajo selección a consecuencia del mutualismo (Bronstein *et al.*, 2006) y conocerlas ayudaría a comprender qué características del insecto favorecen su adecuación y convienen a la planta.

En algún momento se pensó que las plantas con defensas bióticas carecían de defensas químicas (Rehr *et al.*, 1973), asunto que planteó el dilema acerca de por qué la pérdida de un mecanismo de defensa no repercutía en niveles masivos de daño (Bronstein *et al.*, 2006). Ahora se sabe que algunas plantas asociadas con hormigas también presentan ciertas defensas químicas (Heil *et al.*, 2002) y que en algunas familias no se correlaciona la expresión de defensas químicas con la secreción del néctar extrafloral (Rudgers, 2004). Algunos autores postulan que la expresión de

defensas químicas en plantas mirmecófitas facilita la transición mediante la cual las plantas se alejan del mutualismo (Palmer *et al.*, 2010). Sin embargo, un meta-análisis muy reciente reconsidera el efecto real de las defensas químicas contra la herbivoría y cuestiona el papel tradicional y preponderante que se ha dado a este mecanismo como la principal defensa contra la herbivoría, al no encontrar una correlación entre la expresión de compuestos defensivos específicos y una reducción en el daño por herbívoros (Carmona *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en las poblaciones veracruzanas de *T. ulmifolia*, donde hay una fuerte asignación de recursos a la defensa biótica mientras que no se encontraron defensas químicas (glucósidos cianogénicos ni taninos condensados), pueden explicarse a la luz del debate anterior. Quizás la selección natural haya favorecido a aquellos individuos que destinan más recursos a las defensas bióticas y físicas que a las químicas. Esto puede deberse a dos razones: en primer lugar tanto las defensas bióticas como las físicas han mostrado ser más eficientes para disminuir el daño por herbívoros que las químicas (Cuautle *et al.*, 2005; Bronstein *et al.*, 2006; Carmona *et al.*, 2011) y por lo tanto deben tener más beneficios en términos de adecuación; en segundo lugar, porque *T. ulmifolia* también requiere de los servicios de las hormigas para su reproducción (Cuautle *et al.*, 2005). Sin embargo, sería interesante explicar por qué las poblaciones jamaicanas aún conservan la cianogénesis y también comparar el éxito reproductivo de ambas poblaciones. Con ello podríamos saber si la cianogénesis representa una forma de defensa eficiente o más bien es un costo sin beneficio que la selección natural aún no ha logrado depurar en algunas poblaciones.

Estas observaciones abren el panorama a preguntas acerca de los escenarios ecológicos en los cuales se mantiene o desaparece la mirmecofilia. En lo que se refiere al mantenimiento de la mirmecofilia, los beneficios de la asociación dependen ampliamente del contexto, pues cuando no existen enemigos la asociación mutualista carece de beneficio alguno para las plantas (Bronstein *et al.*, 2006), a menos de que también dependan de éstas para la reproducción, como es el caso de *T. ulmifolia* (Cuautle *et al.*, 2005). En este caso, los costos de la asociación pueden acumularse y llegar incluso a superar los beneficios, lo cual tendría efectos negativos en la adecuación y se esperaría

una tendencia hacia la desaparición del mutualismo. Sin embargo, la asociación se mantiene cuando los beneficios superan los costos, ya sea por una ganancia pequeña pero consistente o eventual pero muy grande. En estas condiciones, la selección natural opera para reducir los costos de la asociación maximizando los beneficios. Para lograr esto existen diversos mecanismos: la producción del néctar extrafloral puede estar inducida por el daño, la presencia de herbívoros o de hormigas, incluso la diferenciación del tejido en NEF puede estar inducida, como se ha visto en este estudio (Fig. 19) y se ha demostrado previamente (Mondor y Addicott, 2003).

PERSPECTIVAS DE ESTUDIO

A partir de este trabajo queda pendiente confirmar de manera definitiva el carácter acianogénico de esta población. Para ello es necesario experimentar con plántulas y cotiledones. También queda por confirmar la presencia de taninos condensados en estadios tempranos y la presencia de taninos hidrolizables a lo largo de toda la ontogenia. Con respecto a la dureza, sería conveniente medirla con otros métodos, anatómicos o estructurales para comparar cualitativamente la cantidad de lignina en hojas de distintos estadios, o bien con ayuda de un penetrómetro. Esto permitiría comparar el patrón obtenido mediante el peso específico con el nuevo patrón y determinar si *T. ulmifolia* presenta este tipo de defensa.

Sería interesante conocer la tolerancia y su variación ontogenética en esta especie, ya que esto nos permitiría caracterizar de manera completa la defensa contra herbívoros en *T. ulmifolia*. Algunas de las preguntas que podrían responderse cuando se explore la tolerancia son: ¿es el nivel de tolerancia en las plántulas o juveniles el mecanismo mediante el cual esta especie enfrenta los altos niveles de depredación por herbívoros en estadios tempranos? Siguiendo la línea de los mecanismos de defensa no explorados aquí, se sugiere también evaluar las diferencias en la calidad nutricional de los distintos estadios. ¿Son la tolerancia o la calidad nutricional síndromes de la defensa en esta especie? ¿Existen dentro de esta población distintos genotipos que expresen distintos síndromes de la defensa? ¿Alcanzan los distintos genotipos resultados similares en la evasión del daño foliar por herbívoros? ¿Cuál de ellos es el más eficiente en términos de adecuación? En relación con las trayectorias ontogenéticas de la defensa sería interesante poder contestar si hay variación genética en las trayectorias ontogenéticas descritas y si éstas se encuentran bajo selección natural.

Producto del trabajo estructural aquí descrito surgieron algunas preguntas interesantes, por ejemplo: ¿cómo y dónde se da el proceso de secreción del néctar extrafloral? Aunque sabemos que

de ello se encargan las glándulas peciolares, sería interesante conocer la contribución de cada uno de los diferentes tejidos en la producción del néctar extrafloral. Sin embargo, para ello se requieren microtécnicas especializadas que aportarían un gran conocimiento acerca de la fisiología de secreción, tales como las tinciones histoquímicas particulares para buscar los azúcares predominantes en el néctar en los distintos tejidos del nectario.

Gracias a las observaciones con el microscopio electrónico de barrido fue posible conocer la gran diversidad de tricomas foliares en esta especie. Tras hallar tres morfos de tricomas glandulares, dos de ellos presentes durante toda la ontogenia, sería interesante conocer las sustancias almacenadas y secretadas por éstos. Dicha información permitiría confirmar o conocer la función de los tricomas glandulares de esta especie.

CONCLUSIONES

- 1) Existen cambios ontogenéticos en la cantidad de daño foliar que reciben las plantas de *T. ulmifolia*, así como en los niveles de defensa que expresan. El patrón ontogenético del daño y de la defensa son opuestos: decreciente y creciente, respectivamente. De tal modo que la cantidad de daño que reciben las plantas de un estadio es inversamente proporcional al nivel de defensa directo e indirecto que expresan.
- 2) La densidad de los tricomas unicelulares simples aumenta con la ontogenia, aunque su número se determina en etapas tempranas del desarrollo foliar. Esto coincide con lo propuesto por la teoría de asignación de recursos y el modelo de diferenciación de Hülskamp (2004). Este trabajo registra la existencia de dos nuevos morfos de tricomas no glandulares no reportados previamente para este género: pluricelulares uniseriados y emergencias mesetiformes.
- 3) No se encontraron cambios ontogenéticos en la dureza foliar y es posible que el peso específico no sea un buen criterio para evaluar la dureza foliar de esta especie.
- 4) Los estadios juveniles, pre-reproductivos y reproductivos de la población estudiada resultaron ser acianogénicos a pesar de que existen registros de que esta especie es cianogénica (Schappert y Shone, 1995).
- 5) Se purificó una cantidad insignificante de taninos condensados a partir de plantas reproductivas, por lo que podemos afirmar que estadios adultos de esta especie no cuentan con esta clase de metabolitos secundarios.
- 6) Al igual que en el resto de los estudios ontogenéticos de la mirmecofilia, las plantas de esta población no presentan el mutualismo desde el inicio de su vida. Éste comienza a

establecerse en los individuos pre-reproductivos, quienes presentan ya una diferenciación de los NEF suficiente para la secreción. Los cambios anatómicos ocurridos en los NEF de las plantas reproductivas explican sus altos niveles de secreción, tanto en volumen como en concentración del néctar. Por consiguiente, los NEF de las plantas reproductivas resultan más atractivos para las hormigas, quienes patrullan más dicho estadio brindándole una defensa indirecta más eficiente.

- 7) La sectorización y estacionalidad de las defensas indirectas en esta población puede explicarse combinando un enfoque fisiológico y ecológico plural en el cual se contemplen los distintos servicios de la mirmecofilia. Los NEF aumentan en la región apical de las plantas reproductivas pues es allí donde se concentran mayor cantidad de recursos, las hojas con mayor valor para la adecuación, así como los frutos con las semillas que son dispersadas por las hormigas. Todo esto sucede durante la época húmeda, cuando abunda el factor limitante, el agua, y también durante el pico de actividad de los fitófagos. Esto se atribuye a múltiples presiones de selección sobre los NEF que se concentran en una ventana espacio-temporal específica.
- 8) La secreción del néctar extrafloral en *T. ulmifolia* ocurre a través de una estructura anatómica concreta: un poro transcuticular que permite la salida continua del néctar acumulado entre la epidermis secretora y la cutícula.
- 9) Esta población presenta una trayectoria ontogenética complementaria de la defensa que consiste en que todos los mecanismos muestran una tendencia de incremento a lo largo del desarrollo.
- 10) Se sugiere que la población estudiada presenta un síndrome mixto de la defensa en el cual se aprovechan las interacciones sinérgicas entre los diversos mecanismos defensivos y se obtiene una protección más efectiva contra los herbívoros.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Agrawal, A. y M. Fishbein. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology*. **87**(7): S132-S149, S166.
2. Aide, M. 1992. Dry season leaf production: An escape from herbivory. *Biotropica*. **24**(4): 532-537.
3. Aide, M. 1993. Patterns of leaf development and herbivory in a tropical understory community. *Ecology*. **74**(2): 455-466.
4. Andres, M.R. y E.F. Connor. 2003. The community-wide and guild-specific effects of pubescence on the folivorous insects of manzanitas *Arctostaphylos* spp. *Ecological Entomology*. **28**: 383-396.
5. Ascensao, L., N. Marques y M.S. Pais. 1995. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*. **75**. 619-626.
6. Apple, M., K. Tiekotter, M. Snow, J. Young, A. Soeldner, D. Phillips, D. Tingey y B.J. Bond. 2002. Needle Anatomy changes with increasing tree age in Douglas-fir. *Tree Physiology*. **22**: 129-126.
7. Barrett, R. y A. Agrawal. 2004. Interactive effects of genotype, environment, and ontogeny on resistance of cucumber (*Cucumis sativus*) to the generalist herbivore, *Spodoptera exigua*. *Journal of Chemical Ecology*. **1**: 37-51.
8. Barto, K., y D. Cipollini. 2005. Testing the optimal defense theory and the growth differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia*. **146**: 169-178.
9. Barton, K. 2007. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): Genetic variation and trade-offs. *American Journal of Botany*. **94**(1): 56-66.
10. Barton, K. 2008. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. *Oikos*. **117**: 917-925.

11. Barton, K. y J. Koricheva. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist*. **175**(4): 481-493.
12. Beattie, A.J. 1985. The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. Cambridge University Press.
13. Beattie, A.J. y L. Hughes. 2002. 'Ant-plant interactions'. En: Herrera, C. y O. Pellmyr. Plant-Animal Interactions. An Evolutionary Approach. Blackwell Science Ltd.
14. Begon, M., C. Townsend y J. Harper. 2006. Ecology. From individuals to ecosystems. Blackwell Publishing. 4^a edición.
15. Bentley, B. 1976. Plants bearing extrafloral nectarines and the associated ant community: interhabitat differences in the reduction of herbivore damage. *Ecology*. **57**: 815-820.
16. Bentley, B. 1977. Extrafloral nectarines and protection by pugnacious bodyguards. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **8**: 407-427.
17. Bentley, B. y T. Elias. 1983. The Biology of Nectarines. Columbia University Press.
18. Boege, K. y R. Marquis. 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trend in Ecology and Evolution*. **8**: 441-448.
19. Boege, K. 2005. Herbivore attack in *Casearia nitida* influenced by plant ontogenetic variation in foliage quality and plant architecture. *Oecologia*. **143**: 117-125.
20. Boege, K., R. Dirzo, D. Siemens y P. Brown. 2007. Ontogenetic switches from plant resistance to tolerance: minimizing costs with age. *Ecology Letters*. **10**: 177-187.
21. Bronstein, J.L., R. Alarcón y M. Geber. 2006. The evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*. **172**: 412-428.
22. Cardoso, M. 2008. Herbivore Handling of a plant's trichome: the case of *Heliconius charithonia* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Passiflora lobata* (Killip) Hutch. (Passifloraceae). *Neotropical Entomology*. **37**(3): 247-252.
23. Carmona, D., M.J. Lajeunesse y M.T.J. Johnson. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology*. **25**: 358-367.

24. Caspary, R. 1848. *De Nectariis*. Bonn: Elverfeld. Dato tomado de Bentley y Elias, 1983.
25. Castillo-Campos, G. y A.C. Travieso-Bello. 2006. La flora. En: *Entornos veracruzanos: La costa de La Mancha*. Editado por Moreno-Casasola, P. Instituto de Ecología A.C.
26. Caswell, H. 2001. *Matrix population models: construction, analysis and interpretation*. Sinauer.
27. Clark, D.B., y D.A. Clark. 1985. Seedling dynamics of a tropical tree: Impacts of herbivory and meristem damage. *Ecology*. **66**(6): 1884-1892.
28. Cogni, R., R.L.G. Raimundo y A.V.L. Freitas. 2000. Daily activity of ants associated with extrafloral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae) in a suburban area in Southeast Brazil. *Entomologist's Monthly Magazine*. **136**: 141-147.
29. Cole, L.C. 1954. The population consequences of life history phenomena. *Q. Rev. Biol.* **29**:103-137.
30. Coley, P.D. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs* **53**(2): 209-234.
31. Coley, P.D., Bryant J.P. y Chapin F.S. III. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*. **230**:895-899.
32. Coley, P.D. y J.A. Barone. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**: 305-335.
33. Cuautle, M. y V. Rico-Gray. 2003. The effect of wasps and ants on the reproductive success of the extrafloral nectaried plant *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Functional Ecology*. **17**: 417-423.
34. Cuautle, M., V. Rico-Gray y M. Díaz-Castelazo. 2005. Effects of ant behaviour and presence of extrafloral nectaries on seed dispersal of the Neotropical myrmecochore *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*. **86**: 67-77.

35. Day, M.E., M.S. Greenwood y A.S. White. 2001. Age-related changes in foliar morphology and physiology in red spruce and their influence on declining photosynthetic rates productivity with tree age. *Tree Physiology*. **21**: 1195-1204.
36. De la Cruz, M. y R. Dirzo. 1987. A Survey of the Standing Levels of Herbivory in Seedlings from a Mexican Rain Forest. *Biotropica*. **19**(2): 98-106.
37. Delpino, F. 1875. Rapporti tra insetti e tra nettarii estranuziali in alcoune piante. *Bull. della Soc. Entomol. It.* (Florencia). **7**: 69-90. Dato tomado de Bentley y Elias, 1983.
38. Del Val, E. y R. Dirzo. 2003. Does ontogeny cause changes in the defensive strategies of the myrmecophyte *Cecropia peltata*? *Plant Ecology*. **169**: 35-41.
39. Del Val, E. y M.J. Crawley. 2005. Are grazing increaser species better tolerators than decreasers? An experimental assessment of defoliation tolerance in eight British grassland species. *Journal of Ecology*. **93**: 1005-1016.
40. Díaz-Castelazo, C., V. Rico-Gray, F. Ortega y G. Ángeles. 2005. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz, Mexico. *Annals of Botany*. **96**: 1175-1189.
41. Díaz-Castelazo, C., V. Rico-Gray, P.S. Oliveira y M. Cuautle. 2004. Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: richness, occurrence, seasonality and ant foraging patterns. *Écoscience*. **11**: 472-481.
42. Dirzo, R. y J.L. Harper. 1982. Experimental studies on slug-plant interactions: III. Differences in the acceptability of individual plants of *Trifolium repens* to slugs and snails. *Journal of Ecology*. **70** (1):101-117.
43. Doak, D.F., W.F. Morris, C. Pfister, B.E. Kendall y E.M. Bruna. 2005. Correctly estimating how environmental stochasticity influences fitness and population growth. *Am. Nat.* **166**: E14-E21.
44. Elias, T.S., W.R. Rozich y L. Newcombe. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. *Amer. J. Bot.* **62**(6): 570-576.

45. Enright, N.J., M. Franco y J. Silvertown. 1995. Comparing plant life-histories using elasticity analysis: The importance of life span and the number of life-cycle stages. *Oecologia*. **104**:79–84.
46. Fahn, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press.
47. Fahn, A. 1990. Plant anatomy. Pergamon Press. 4^a edición.
48. Fritz, R., C. Hochwender, D. Lewkiewicz, S. Bothwell y C. Orians. 2001. Seedling herbivory by slugs in a willow hybrid system: developmental changes in damage, chemical defense, and plant performance. *Oecologia*. **129**: 87-97.
49. Feeny, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*. **51**(4): 565-581.
50. Feeny, P. 1975. Biochemical coevolution between plants and their insect herbivores. En: *Coevolution of Animals and Plants*. Editado por L.E. Gilbert y P.H. Raven. University of Texas Press.
51. Feeny, P. 1976. Plant apparency and chemical defense. En: *Recent Advances in Phytochemistry*. Editado por J.W. Wallace y R.L. Mansell. Vol. 10. Plenum Press.
52. Fellows, F. y R. Geiger. 1974. Structural and physiological change in beet sugar leaves during sink to resource conversion. *Plant. Physiol.* **54**: 877-885.
53. Fonseca, C.R. 1993. Nesting space limits colony size of the plant-ant *Pseudomyrmex concolor*. *Oikos*. **67**: 473-482.
54. Fonseca, C.R. y W.W. Benson. 2000. Ontogenetic succession in Amazonian ant tree. *Oikos*. **102**(2): 407-412.
55. Forkner, R., R.J. Marquis, J.T. Lill y J. Le Corff. 2008. Timing is everything? Phenological synchrony and population variability in leaf-chewing herbivores of *Quercus*. *Ecological Entomology*. **33**: 276-285.
56. Fornoni, J., J. Nuñez-Farfán, P. Valverde y M. Rausher. 2004. Evolution of mixed strategies on plant defense allocation against natural enemies. *Evolution*. **58**(8): 1685-1695.

57. Gama, L., H. Narvae y N.P. Moreno. 1985. Flora de Veracruz: Turneraceae. Fascículo 47. INIREB.
58. Goffreda, J.C., E.J. Szymkowiak, I.M. Sussex y M.A. Mutschler. 1990. Chimeric tomato plants show that aphid resistance and triacylglycerol production are epidermal autonomous characters. *The Plant Cell*. **2**: 643-649.
59. González, A.M. 1996. Nectarios extraflorales en *Turnera*, series Canaligeræ y Leiocarpeæ. *Bonplandia*. **9**(1-2): 129-143.
60. González, A.M. y M.M. Arbo. 2004. Trichome complement of *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **144**: 85-97.
61. González, A.M. y M.N. Ocantos. 2006. Nectarios extraflorales en *Piriqueta* y *Turnera* (Turneraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* **41**(3-4): 269-284.
62. Gruner, D.S., A.D. Taylor y R.E. Forkner. 2005. The effects of foliar pubescence and nutrient enrichment on arthropod communities of *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *Ecological Entomology*. **30**: 428-443.
63. Guimarães, Jr. P.R., V. Rico-Gray, S. Furtado dos Reis y J.N. Thompson. 2006. Asymmetries in specialization in ant-plant mutualistic networks. *Proc. R. Soc. B*. **273**: 2041-2047.
64. Gutschick, V. 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytol.* **143**: 3-18.
65. Hagerman, A.E. y G. Butler. 1991. Tannins and lignins. En: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. 2° ed. Vol. I: The Chemical Participants. 1991. Academic Press. Inc.
66. Hagerman, A.E. 2002. The tannin handbook. Universidad de Miami. Versión electrónica disponible en: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>.
67. Handley, R., B. Ekbom y J. Agren. 2005. Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecological Entomology*. **30**: 284-292.

68. Handley, M.E. y R.J. Sykes. 2009. Impacts of seedling herbivory on plant competition and implications for species coexistence. *Annals of Botany*. **103**(8): 1347-1353.
69. Heil, M. 2007. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*. **178**: 41-61.
70. Herms, D.A. y W.J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*. **67**:283-335.
71. Hochuli, D. 2001. Insect herbivory and ontogeny: How do growth and development influence feeding behavior, morphology and host use? *Austral Ecology*. **26**: 563-570.
72. Hülskamp, M. 2004. Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 471-480.
73. Jackson, B.D. 1953. A Glossary of Botanic Terms. Gerald Duckworth & Co. Ltd. 4^a edición.
74. Krings, M., T.N. Taylor y D.W. Kellogg. 2002. Touch-sensitive glandular trichomes: a mode of defence against herbivorous arthropods in the Carboniferous. *Evolutionary Ecology*. **4**: 779-786.
75. Leishman, M.R. y B.R. Murray. 2001. The relationship between size and abundance in plant communities: model predictions and observed patterns. *Oikos*. **94**: 151-161.
76. Lill, J.T., R.J. Marquis, R.E. Forkner, J. Le Corff, N. Holmberg y N.A. Barber. 2006. Leaf pubescence affects distribution and abundance on generalist slug caterpillars (Lepidoptera: Limacodidae). *Environ. Entomol.* **35**(3): 797-806.
77. Llandres, A.L., M. Rodríguez-Girones y R. Dirzo. 2010. Plant stages with biotic, indirect defences are more palatable and suffer less herbivory than their undefended counterparts. *Biological Journal of the Linnean Society*. **101**: 536-543.
78. López, M.L., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de laboratorio. Las prensas de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
79. Maas, P., L. Westra y A. Farjon. 1997. Neotropical plant families. Koeltz Scientific Books. 2^a edición.

80. Martínez, M. 1994. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México.
81. Martínez, M.L., J.G. García-Franco y V. Rico-Gray. 2006. Las adaptaciones y las interacciones de especies. En: *Entornos veracruzanos: La costa de La Mancha*. Editado por Moreno-Casasola, P. Instituto de Ecología A.C.
82. Mauricio, R. 2005. Ontogenetics of QTL: the genetic architecture of trichome density over time in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica*. **123**:75-85.
83. McConnaughay, K.D.M. y J.S. Coleman. 1999. Biomass allocation in plants: Ontogeny or optimality? A test along three resource gradients. *Ecology*. **80**: 2581-2593.
84. McKey, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist*. **108**:305–320.
85. McKey, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants. En: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Editado por Rosenthal, G.A. y D.H. Janzen. Academic Press.
86. McLean, R.C. y W.R. Ivimey-Cook. 1956. The angiospermae: pollination: an introduction to floral biology. En: McLean, R.C. y W.R. Ivimey-Cook. *Textbook of theoretical botany*. Volumen II. Longman Green and Co.
87. Medina, A. 2004. Descripción anatómica vegetativa de tres cultivares de *Amaranthus cruentus* L. y cuatro de *A. hypochondriacus* L. cultivadas en Montecillo, Estado de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Los Reyes Iztacala.
88. Miura, K. y N. Ohsaki. 2004. Relationship between physical leaf characteristics and growth and survival of polyphagous grasshopper nymphs, *Parapodisma subastris* (Orthoptera: Catantopidae). *Popul. Ecol.* **46**: 179-184.
89. Moles, T.A. y M. Westoby. 2004a. What do seedlings die from and what are the implications for evolution of seed size? *Oikos*, **106**:193–199.

90. Moles, T.A. y M. Westoby. 2004b. Small-seeded species produce more seeds per square metre of canopy per year, but not per individual per lifetime. *Journal of Ecology*. **92**: 384-396.
91. Moles, T.A., D. Falster, M. Leishman y M. Westoby. 2006. Seed size and plant strategy across the whole life cycle. *Oikos*. **113**: 91-105.
92. Moreno-Casasola, P. 1982. Ecología de la vegetación de dunas costeras: factores físicos. *Biotica*. **7**(4): 577-602.
93. Moreno-Casasola, P. y R. Monroy. 2006. Introducción. En: *Entornos veracruzanos: La costa de La Mancha*. Editado por Moreno-Casasola, P. Instituto de Ecología A.C.
94. Moreno-Casasola, P. y A.C. Travieso-Bello. 2006. Las playas y las dunas. En: *Entornos veracruzanos: La costa de La Mancha*. Editado por Moreno-Casasola, P. Instituto de Ecología A.C.
95. Narbona, E. y R. Dirzo. 2010. A reassessment of the function of floral nectar in *Croton suberosus* (Euphorbiaceae): A reward for plant defenders and pollinators. *American Journal of Botany*. **97**(4): 672-679.
96. Oigiangbe, O.N., L.E.N. Jackai, F.K. Ewete, L. Lajide y J.D'A. Hughes. 2006. Effect of pubescence on the oviposition and feeding behaviour of *M. vitrata* (Fab.) on *Vigna* species. *Ghana J. Sci.* **46**: 55-65.
97. Orzack, S.H. y S. Tuljapurkar. 1989. Population dynamics in variable environments: The demography and evolution of iteroparity. *Am. Nat.* **133**:901-923.
98. Palmer, T.M., D. Doak, M.L. Stanton, J.L. Bronstein, E.T. Kiers, T.P. Young, J.R. Goheen y R.M. Pringle. 2010. Synergy of multiple partners, including freeloaders, increases host fitness in a multispecies mutualism. *PNAS*. **107**(40): 17234-17239.
99. Pascal, L.M., E.F. Motte-Florac y D.B. McKey. 2000. Secretory structures of the leaf rachis of Caesalpinieae and Mimosoideae (Leguminosae): implications for the evolution of nectary glands. *American Journal of Botany*. **87**(3): 327-338.

100. Pemberton, R.W. 1992. Fossil extrafloral nectaries, evidence for the ant-guard antiherbivorous defense in an oligocene *Populus*. *American Journal of Botany*. **79**(11): 11242-1246.
101. Ranwell, D.S. 1972. *Ecology of salt marshes and sand dunes*. Chapman and Hall.
102. Reich, P.B. 1995. Phenology of tropical forests: Patterns, causes, and consequences. *Canadian Journal of Botany*. **73**(2): 164-174. 1995.
103. Reich, P.B., C. Uhl, M.B. Walters y D.S. Ellsworth. 1991. Leaf lifespan as a determinant of leaf structure and function among 23 Amazonian tree species. *Oecologia*. **86**: 16-24.
104. Rhoades, D.F. 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. En: *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Editado por: Rosenthal G.A. y D.H. Janzen. 2° ed. Vol. I: The Chemical Participants. Academic Press Inc.
105. Rhoades, D.F. y R.G. Cates. 1976. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. En: *Recent Advances in Phytochemistry*. Editado por: Wallace J.W. y R.L. Mansell. Vol. 10. Plenum Press.
106. Rojas, A. 2001. Anatomía foliar comparada de *Senecio* sección *Mulgediifolii* (Asteraceae: Senecioneae) y especies relacionadas. Tesis de maestría (Biología vegetal). Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
107. Rudgers, J.A. y M.C. Gardener. 2004. Extrafloral nectar as a resource mediating multispecies interactions. *Ecology*. **85**(6): 1495-1502.
108. Salminen, J-P., M. Karonen. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*. **25**: 325-338.
109. Sánchez-Peña, P., K. Oyama, J. Núñez-Farfán, J. Fornoni, S. Hernández-Verdugo, J. Márquez-Guzmán y J.A. Garzón-Tiznado. 2006. Sources of resistance to whitefly (*Bemisia* spp.) in wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) Spooner G.J. Anderson et R.K. Jansen in Northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **53**: 711-719.

110. Schappert, P.J. y J.S. Shore. 1995. Cyanogenesis in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). I. Phenotypic distribution and genetic variation for cyanogenesis on Jamaica. *Heredity*. **74**: 392-404.
111. Schwinning, S. y J. Weiner. 1998. Mechanisms determining the degree of size asymmetry in competition among plants. *Oecologia*. **113**: 447-455.
112. Seigler, D. 1991. Cyanide and Cyanogenic Glycosides. En: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Editado por: Rosenthal G.A. y D.H. Janzen. 2° ed. Vol. I: The Chemical Participants. Academic Press Inc.
113. Stamp, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The quarterly review of Biology*. **1**: 23-51.
114. Stevens, P.F. 2011. Angiosperm Phylogeny Website. Universidad de Missouri. Version 9. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>
115. Strauss, S. y A. Zangerl. 2002. Plant-insect interactions in terrestrial ecosystems. En: *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Editado por: Herrera C. y O. Pellmyr. Blackwell Science.
116. Sugiura, S., T. Abe y Shun'ichi, M. 2006. Loss of extrafloral nectary on an oceanic island plant and its consequences for herbivory. *American Journal of Botany*. **93**(3): 491-495.
117. Travieso-Bello, A.C. y A. Campos. 2006. Los componentes del paisaje. En: *Entornos veracruzanos: La costa de La Mancha*. Editado por: Moreno-Casasola, P. Instituto de Ecología A.C.
118. Thomas, S.C., A.J. Sztaba y S.M. Smith. 2010. Herbivory patterns in mature sugar maple: variation with vertical canopy and strata tree ontogeny. *Ecological Entomology*. **35**: 1-8.
119. Thompson, L.M. y F.R. Troeh. 1988. Los suelos y su fertilidad. Reverté. 4ª edición.
120. Torres-Hernández, L., V. Rico-Gray, C. Castillo-Guevara y J.A. Vergara. 2000. Effect of nectar-foraging ants and wasps on the reproductive fitness of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) in a coastal sand dune in Mexico. *Acta Zool. Mex.* **81**: 13-21.

121. Valkama, E., J-P. Salminen, J. Koricheva y K. Pihlaja. 2004. Changes in leaf trichomes and epicuticular flavonoids during leaf development in three birch taxa. *Annals of Botany*. **94**: 233-242.
122. Van Dam, N.M., H.M. Mares y L:T. Baldwin. 2001. Ontogeny constrains systematic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuate*. *J. Chem. Ecol.* **27**: 547-568.
123. Wagner, D., P. Doak y A. Watson. 2007. Variable extrafloral nectar expression and its consequences in quaking aspen. *Canadian Journal of Botany*. **85**(1): 1-9.
124. Wagner, G. 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology*. **96**: 675-679.
125. Weiner, J. 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. **6**(4): 207-215.
126. Wolfson, J.L. y L.L. Murdock. 1990. Growth of *Manduca sexta* on wounded tomato plants: role of induced proteinase inhibitors. *Entomol. Exp. Appl.* **54**: 257-264.
127. Wooley, S., J. Donaldson, A. Gusse, R. Lindroth y M. Stevens. 2007. Extrafloral nectaries in Aspen (*Populus tremuloides*): heritable genetic variation and herbivore-induced expression. *Annals of Botany*. **100**: 1337-1346.
128. Young, B., D. Wagner, P. Doak y T. Clausen. 2010. Within-plant distribution of phenolic glycosides and extrafloral nectarines in trembling aspen (*Populus tremuloides*; Salicaceae). *American Journal of Botany*. **97**(4): 601-610.
129. Zimmermann, J.G. 1932. Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. *Beih. Bot. Centralbl.* **49**: 99-196. Dato tomado de Bentley y Elias, 1983.

ANEXOS

Fijador FAA

Se deben mezclar los siguientes componentes en un matraz o vaso de precipitados de 1 l:

- a. 100 ml de formaldehído
- b. 500 ml de alcohol etílico al 95%
- c. 50 ml de ácido acético glacial
- d. 350 ml de agua destilada

Solución de ácido pícrico [0.5% m/m]

Se deben mezclar en un matraz aforado de 10 ml:

- a. 50 mg de ácido pícrico
- b. Aforar a 10 ml con DDH₂O

Agitar hasta disolver por completo. Si el ácido no se disuelve puede calentarse ligeramente.

Guardar la solución en un frasco ámbar debidamente etiquetado y en oscuridad.

Mantener en un sitio fresco y seco.

Solución de carbonato de sodio [5% m/m]

Se deben mezclar en un matraz aforado de 10 ml:

- a. 500 mg de carbonato de sodio (Na₂CO₃)
- b. Aforar a 10 ml con DDH₂O

Agitar hasta disolver por completo.

Se debe mantener en un frasco ámbar debidamente etiquetado y en un lugar fresco.

Solución de ioduro de potasio [2% m/m]

Se deben mezclar en un matraz aforado de 10 ml:

- c. 0.2 g de KI
- d. Aforar a 10 ml con DDH₂O

Agitar hasta disolver por completo.

Se debe mantener en un frasco ámbar debidamente etiquetado y en un lugar fresco.

Solución de acetona:agua 70:30 v/v

Se deben mezclar en un matraz aforado de 1 l:

- a. 700 ml de acetona
- b. 0.17612 g de ácido ascórbico
- c. Aforar a 1 l con DDH₂O

Se debe mantener en un frasco ámbar debidamente etiquetado y en un lugar fresco.

Solución de sulfato férrico de amonio

Se deben mezclar en un matraz aforado de 100 ml:

- a. 4.82 g de sulfato férrico de amonio
- b. 0.83 ml de HCl concentrado
- c. Aforar a 100 ml con DDH₂O

Se debe mantener en un frasco ámbar debidamente etiquetado y en un lugar fresco.

Solución de ferricianuro de potasio

Se deben mezclar en un matraz aforado de 100 ml:

- a. 0.263 g de ferricianuro de potasio
- b. Aforar a 100 ml con DDH₂O

Se debe mantener en un frasco ámbar debidamente etiquetado y en un lugar fresco.

Tabla 1. Tiempos de deshidratación con una serie de alcoholes graduales.

Alcohol	Tiempo
30%	1 h
50%	1 h
70%	1 h
85%	1 h
96%	1 h
100%	2 cambios de 1h

Tabla 2. Tiempos de deshidratación y pre-inclusión en paraplast.

Sustancia	Tiempo
Alcohol 30%	1 h
Alcohol 50%	1 h
Alcohol 70%	1 h
Alcohol 85%	1 h
Alcohol 96%	1 h
Alcohol 100%	3 d
Alcohol 100%	30 m
Alcohol-xilol (1:1)	30 m
Xilol	30 m
Xilol-paraplast (1:1)	12 h
Paraplast	12 h
Bloques	

Tabla 3. Método de desparafinación y tren de tinción con safranina metil-celosolve verde rápido.

Acción y sustancia	Tiempo
Baño en xilol	9 min
Baño en xilol-alcohol (1:1)	3 min
Baño en alcohol 100%	3 min
Baño en alcohol 96%	3 min
Tinción con safranina	12 h
Lavado con agua	30 s
Lavado con alcohol 96%	8 s
Diferenciar con alcohol 96% + ácido pícrico (1:1)	8 s
Lavado con alcohol 96%	8 s
Lavado con alcohol 96% + amoníaco (1:1)	8 s
Lavado con alcohol 96%	8 s
Tinción con verde rápido	8 s
Lavado con aceite de clavo	8 s
Aclarado con alcohol 100% + aceite de clavo + xilol (1:1:1)	8 s
Aclarado con xilol	5 min