



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

**“Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa y tolerancia de
Turnera velutina y su variación genética”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

PRESENTA:

SOFIA OCHOA LÓPEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. KARINA BOEGE PARÉ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

DR. ZENÓN CANO SANTANA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de octubre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de la **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **OCHOA LÓPEZ SOFÍA** con número de cuenta **302068425** con la tesis titulada: **"CARACTERIZACIÓN DE LAS TRAYECTORIAS ONTOGENÉTICAS DE LA DEFENSA Y TOLERANCIA DE *Turnera velutina* Y SU VARIACIÓN GENÉTICA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. KARINA BOEGE PARÉ**:

Presidente: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
Vocal: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
Secretario: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI
Suplente: DR. VÍCTOR RICO GRAY
Suplente: DR. MARTÍN HEIL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para la realización de estudios de Maestría y al proyecto PAPIIT-IN215010 por el financiamiento para la realización del trabajo de campo y laboratorio.

A la Dra. Karina Boege Paré toda mi gratitud por adentrarme en el mundo de las interacciones bióticas. Gracias por guiarme a través de mi formación, por darme algunas herramientas y por permitirme encontrar otras por mí misma.

A los doctores Zenón Cano Santana y Juan Fornoni Agnelli por acompañarme en la construcción de este proyecto. Gracias por compartir su conocimiento y por

A los doctores Juan Núñez Farfán, Ek del Val de Gortari, Victor Rico Gray y Martin Heil por sus valiosos comentarios que permitieron enriquecer el presente proyecto.

A Rubén Pérez por todo el apoyo en la organización de las salidas al campo, la obtención del material y su constante ayuda en todo el proceso.

A todos los integrantes del Laboratorio Interacción Planta-Animal; Mariana, Angie, Toño, Betsa, Vero, Blanca, Nora, Xochitl, Sergio, Diego, Luz, Violeta, Fer, Paula, Lupita, Julio, Augusto, Itzel, Nallely, Ana, Juan, Karina, Cesar y Rubén. Gracias por crear una dinámica de cooperación y apoyo, por la discusión de artículos y la resolución de dudas.

A Enrique, Tacho, Héctor, Fernando y a la Sombra por su grata compañía y su apoyo en todo momento durante mi estancia en la el CICOLMA. Gracias por hacer el trabajo de campo más placentero.

A Nora, Carlos, Marco, Tania, Xochitl, Violeta, Yilotl, Canek y Gaby por su valiosa ayuda con el trabajo de campo. Gracias por aguantar el aislamiento, la insolación y el trabajo en el campo e invernadero con entusiasmo y paciencia.

Agradecimientos personales

A lo largo de la vida hay relaciones que generan un cambio en nosotros, y nos hacen ser quienes somos. Soy afortunada de tener muchas personas que han contribuido a mi formación como persona, amiga y bióloga, Gaby, Viri, Mateo, Chekum, Tona, Nata, Monse, Canek, Sara, Yara, Zu, Bere, David, Marco. Todos ustedes saben cuánto los quiero y todo lo que les agradezco. Aunque la distancia puede estar presente, saben que siempre pienso en ustedes y agradezco poder compartir mis logros, que son suyos también.

Alfredo y Gaby, gracias por cultivar en mi la curiosidad y la voracidad lectora, además por enseñarme a no rendirme nunca. Esto me ha permitido llegar hasta donde me encuentro. Sobre todo, gracias por el apoyo incondicional al camino que he elegido. Mi eterno amor y agradecimiento.

Ceci y Lucy, gracias por compartir tantos momentos de diversión y complicidad. Mi vida se complemento por su presencia.

A Carlos, gracias por compartir este camino a mi lado, por ayudarme a ser más fuerte, por estar a mi lado cuando te necesito y también cuando no. Pero sobre todo, por recordarme siempre que no hay obstáculo que no podamos afrontar.

Dedicatoria

En memoria de Francisco Ochoa Aguilera, quien desde el principio me apoyo y aprecio mis locuras biológicas. Me hubiera gustado que vieras el resultado final. Te extraño.

“Todo lo que aprendemos en nuestras breves vidas no es más que una pizca insustancial arrancada de la enormidad de lo que nunca sabremos”

Rosa Montero – Instrucciones para salvar al mundo

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Introducción.....	1
Hipótesis.....	8
Objetivos.....	8
Metodología.....	9
Resultados.....	21
Discusión.....	35
Conclusión.....	45
Referencias.....	46

RESUMEN

El desarrollo de las plantas tiene como consecuencia cambios en la adquisición y asignación de los recursos que pueden ser destinados a la defensa y tolerancia contra los herbívoros, dependiendo de las prioridades fisiológicas que la planta tenga en cada estadio ontogenético. Además, la presencia e intensidad de la herbivoría varía a lo largo del desarrollo, por lo que algunos estadios son más atacados que otros. Estas presiones intrínsecas y extrínsecas pueden moldear las trayectorias ontogenéticas de los atributos defensa y tolerancia, ajustando los cambios entre estrategias a aquellas que optimicen la relación costo-beneficio para la planta. En este contexto, se espera encontrar que los atributos de defensa y tolerancia cambien durante el desarrollo de la planta y que estos cambios sean diferentes entre sí. Además, si encontramos que existe variación genética y heredabilidad en las trayectorias ontogenéticas de los atributos, se podría considerar que estas trayectorias pueden ser blanco de la selección natural.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) describir las trayectorias ontogenéticas de la defensa constitutiva física, química y biótica de *Turnera velutina*, 2) determinar si existen trayectorias ontogenéticas de la defensa inducida física, química y biótica en *T. velutina*, 3) describir las trayectorias ontogenéticas de la tolerancia de *T. velutina*, 4) evaluar los costos de cada estrategia defensiva durante el desarrollo de *T. velutina*, y 5) determinar la presencia de variación genética de dichas trayectorias.

Para caracterizar las trayectorias de defensas constitutivas, se cultivaron 268 plantas de *T. velutina* pertenecientes a seis estadios ontogenéticos. Los atributos de defensa medidos fueron la densidad de tricomas, la masa foliar específica, el porcentaje de agua, presencia de ácido cianogénico, número de nectarios extraflorales (NEF) y producción de néctar extrafloral y la concentración de azúcar del mismo. Para determinar la inducción de defensas, se cultivaron 494 plantas de *T. velutina* pertenecientes a tres estadios ontogenéticos (plántulas, juveniles y reproductivas) y diez familias maternas. La mitad de las plantas de cada estadio fue destinada a un grupo control, y la otra mitad fue sometida a un tratamiento de daño foliar artificial. En todas las plantas se cuantificaron los mismos atributos de defensa y el crecimiento compensatorio (diámetro basal, altura, número de

hojas, área foliar promedio, índice de contenido de clorofila y la biomasa seca total producida).

Se encontró que la mayoría de los atributos de la defensa constitutiva, tanto física como biótica (densidad de tricomas, dureza, NEF y producción de néctar), aumentaron durante el desarrollo de la planta. En contraste, el contenido de agua fue más alto en estadios juveniles y la cianogénesis estuvo presente sólo en estadios de cotiledón y plántula. Asimismo, encontramos que ante el daño artificial la densidad de tricomas aumentó para todos los estadios mientras que la masa foliar específica y el contenido de agua aumentaron sólo en las plantas juveniles. No se observó un efecto de inducción en el número de NEF ni en la producción de néctar. Las plántulas fueron más tolerantes, ya que lograron compensar el área perdida con un mayor crecimiento. Sin embargo, encontramos que la asignación de recursos cambia: las plántulas mantienen la misma cantidad de recursos asignada a las raíces, mientras que las plantas reproductivas incrementan la asignación a la parte aérea de la planta. Para todos los atributos tanto de defensa como de tolerancia encontramos variación genética de las trayectorias ontogenéticas.

Este estudio muestra que existen trayectorias ontogenéticas particulares y simultáneas en sus cambios para los diferentes atributos de defensa y tolerancia, de manera que para cada estadio ontogenético existe un arreglo diferente de los atributos que contrarrestan el daño por herbivoría. Además, las trayectorias ontogenéticas de los atributos tuvieron variación genética, por lo que podrían ser objeto de selección natural.

Palabras clave: densidad de tricomas, masa foliar específica, nectarios extraflorales, HCN, herbivoría, biomasa, crecimiento compensatorio, asignación de recursos.

Forma sugerida de citar: Ochoa-López, S. 2013. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa y tolerancia de *Turnera velutina* y su variación genética. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 55 p.

ABSTRACT

Plant development generates changes in the ability of plants to acquire and allocate resource for defense and tolerance against herbivory, according to the physiological priorities of each ontogenetic stage. In addition, the intensity of herbivore damage can change along the ontogeny of the plant; therefore some stages receive more damage than others. These intrinsic and extrinsic factors could shape the defense and tolerance trajectories in order to make adjustments that optimize the relationship between cost and benefit. In this context, we expect to find ontogenic trajectories in defense and tolerance attributes and differences between these trajectories. As well, if these changes in trajectories are the result from natural selection, we should find a genetic variation in these ontogenic trajectories.

The aims of this study were to: 1) describe the ontogenic trajectories of physical, chemical and biotic constitutive defense in *Turnera velutina*, 2) determine the existence of ontogenic trajectories of physical, chemical and biotic induced defense in *T. velutina*, 3) describe the ontogenic trajectories of tolerance in *T. velutina*, 4) Assess the costs of each strategy along the development in *T. velutina*, 5) determine if there is genetic variation of those ontogenic trajectories.

We grew 268 plants of *T. velutina* belonging to six ontogenic stages to characterize the ontogenic trajectories of constitutive defense. We measured trichome density, leaf mass area (LMA), water content, cyanogenics, number of extrafloral nectaries (NEF) and extrafloral nectar production. In order to characterize defense induction, we grew additional 494 plants of *T. velutina* belonging to three ontogenetic stages (seedling, juvenile and reproductive), and ten maternal families. Half of the plants in each stage were assigned to a control group, and the other half received a treatment of artificial foliar damage. In all plants we quantified the same defense attributes and characterized compensatory growth (plant diameter, plant height, number of leaves, average foliar area, chlorophyll content index and total dry biomass).

We found that most of the constitutive attributes of physical and biotic defense (trichome density, LMA, number of NEF and nectar) increased linearly as plant grows. In

contrast, water content was higher in juvenile, and cyanogenics were only present in seedlings. In addition, artificial damage increased trichome density for all stages and LMA and water content increased only in juveniles. We did not find any induction effect in NEF and nectar production. Seedlings were more tolerant, compared with the other stages, and resource allocation changes from seedlings with more biomass in root, to reproductive with more biomass in shoot and leaves. All ontogenic trajectories of defense and tolerance attributes present genetic variation.

This study shows that each defense and tolerance attribute has a particular ontogenic trajectory, and these trajectories have simultaneous switches between them; therefore for each stage there is a different arrange of these attributes. In addition, genetic variation in the ontogenic trajectories could indicate that these ontogenic trajectories could be target of natural selection.

Keywords: ontogenic trajectories, defense, tolerance, *Turnera velutina*, genetic variation, trichome density, LMA, NEF, cyanogenics, herbivory, biomass, compensatory growth, resources allocation.

Ochoa-López, S. 2013. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa y tolerancia de *Turnera velutina* y su variación genética. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 55 p.

INTRODUCCIÓN

La herbivoría es una interacción en la cual las plantas son consumidas total o parcialmente por animales (Strauss y Zangerl, 2002). Sin embargo, la presencia e intensidad de esta interacción pueden variar a lo largo del desarrollo de las plantas; así como sus efectos en el desempeño y adecuación. En respuesta a la herbivoría, las plantas pueden expresar diferentes atributos para reducir el daño ó disminuir sus efectos negativos sobre la adecuación. Estos atributos se pueden clasificar en escape, defensa y tolerancia (Boege y Marquis, 2005).

El escape consiste en la expresión de atributos que disminuyen la posibilidad que la planta tiene de ser encontrada por los herbívoros, por ejemplo, la fenología foliar. La resistencia reduce el daño por herbívoros de manera directa, al disminuir la calidad alimenticia de las plantas para los herbívoros, o indirecta su calidad como refugio (Strauss y Zangerl, 2002; Boege y Marquis, 2005). La tolerancia se expresa una vez que se ha producido el daño por herbívoros. Algunos mecanismos de tolerancia son la capacidad de compensar el tejido perdido por la herbivoría, incrementos en las tasas fotosintéticas o la reasignación de recursos (McNaughton, 1983; Del Val y Crawley, 2005). Finalmente, estos atributos defensivos pueden encontrarse de manera permanente en la planta, (i. e., constitutivamente), o bien, pueden producirse solamente después de un daño por herbivoría, (i. e., defensa inducida; Karban y Baldwin, 1997).

La cantidad y el tipo de defensa pueden cambiar dependiendo de su estadio ontogenético. Esta variación ontogenética es producto de cambios en la adquisición y asignación de recursos a las diferentes funciones que desempeña durante su ciclo de vida, tales como el crecimiento, el almacenamiento, la producción de defensas y la reproducción (Farnsworth, 2004; Weiner, 2004; Boege y Marquis, 2005). Cada una de estas funciones tiene cierta prioridad dependiendo de la etapa del ciclo de vida en el que se encuentre la planta. Por ejemplo, para una plántula la función principal es el crecimiento ya que necesita adquirir tejidos fotosintéticos y de almacén para lograr la adquisición y distribución de recursos para otras funciones como lo es la defensa contra herbívoros o patógenos. En contraste, cuando la planta es reproductiva la producción de gametos y dispersión de semillas pueden ser funciones prioritarias (Barton y Koricheva, 2010).

Dentro de los mecanismos de resistencia directa podemos encontrar una gran diversidad de atributos que disminuyen el ataque de los herbívoros, los cuales se pueden clasificar principalmente en defensas físicas, químicas y bióticas. Los atributos de resistencia física actúan como primera línea de defensa al mantener a los herbívoros alejados de la planta (Scott, 2008). Muchas especies de plantas han desarrollado una gran variedad de espinas que se pueden encontrar en tallos, hojas, flores y frutos y pueden presentar variación en el tamaño y funcionalidad, dependiendo del herbívoro (Strauss y Zangerl, 2002; Scott, 2008). Otro ejemplo de resistencia física son los tricomas, estructuras pilosas derivadas de la epidermis de la hoja (Jackson, 1953), que pueden interferir con los herbívoros ya sea secretando sustancias pegajosas o con efectos tóxicos e irritantes (Wagner, 1991), o bien, dificultan su movimiento, la oviposición e incluso pueden lastimar directamente a las larvas mediante su morfología de ganchos o picos (Cardoso, 2008).

Un segundo frente de resistencia es la gran diversidad de sustancias químicas, conocidas como metabolitos secundarios, producidas por las plantas que son utilizadas para disuadir a los herbívoros de alimentarse de sus tejidos. Para que estas sustancias sean consideradas características defensivas deben reducir la intensidad con la que una planta es atacada y tener una correlación positiva con el desempeño de la planta (Karban y Badwin, 1997). El modo de acción de los metabolitos secundarios varía dentro y entre clases químicas. Por ejemplo, los compuestos cianogénicos producen HCN que bloquea la cadena transportadora de electrones en los herbívoros (Gleadow y Woodrow, 2002), mientras que los taninos se adhieren a las proteínas haciéndolas indigeribles (Strauss y Zangerl, 2002), y también pueden causar estrés oxidativo en los herbívoros (Salminen y Karonen, 2011).

Un tercer tipo de resistencia involucra aquellos atributos que facilitan la acción de los enemigos naturales de los herbívoros, como pueden ser hormigas, avispas u hongos. Muchas plantas ofrecen recompensas, como cuerpos alimenticios y néctar extrafloral, para atraer hormigas y obtener el beneficio del patrullaje contra herbívoros (Strauss y Zangerl, 2002). En un estudio con *Turnera velutina*, Cuautle y Rico-Gray (2003) encontraron que la presencia de hormigas y avispas tiene un efecto significativo en la disminución de la herbivoría y el incremento en la producción de botones, flores, frutos y semillas, esto debido a que la actividad de patrullaje de las hormigas puede reducir la actividad de

forrajeo de los herbívoros. Otro tipo de resistencia biótica es la que ejercen las avispas parasitoides que responden a las sustancias químicas volátiles producidas por las plantas al ser consumidas por herbívoros (Turlings *et al.*, 1991). En muchos casos la planta se ve beneficiada de este tipo de interacción indirecta con un aumento en su adecuación (Schappert y Shore, 1999; van Loon *et al.*, 2000; Heil *et al.*, 2001; Cuautle *et al.*, 2003, 2005).

La tolerancia se expresa una vez que se ha producido el daño por herbívoros. Distintos mecanismos de tolerancia permiten reducir el impacto negativo causado por la herbivoría, a través del crecimiento compensatorio, el aumento de la fotosíntesis o la activación de los meristemos (Tiffin, 2000; Boege y Marquis, 2005), con el fin de compensar el tejido perdido por la herbivoría (McNaughton, 1983; Del Val y Crawley, 2005)

Existen varios estudios que reportan el cambio de algunos atributos defensivos contra la herbivoría durante la ontogenia de la planta. En el algodón se demostró que las plantas se vuelven más resistentes al ataque de ácaros conforme maduran del estadio de cotiledón a tener hojas verdaderas (Karban y Thaler, 1999). Otro ejemplo es *Cecropia peltata*, cuyas plantas adultas producen altas concentraciones de metabolitos secundarios (fenoles y taninos), además tienen una alta densidad de tricomas y se encuentran colonizadas por hormigas del género *Azteca* que ofrecen patrullaje; en contraste, sus plantas juveniles que no están colonizadas por hormigas tienen tasas de crecimiento más altas, sugiriendo que la compensación les ayuda a sobrevivir al mayor índice de herbivoría que presentan (Del Val y Dirzo, 2003). En *Casearia nitida* se han reportado diferencias ontogenéticas entre árboles jóvenes y adultos en la calidad del follaje como alimento para los herbívoros. Los árboles adultos tienen concentraciones mayores de fenoles totales y menor intensidad de daño por herbivoría, aunque otros atributos como dureza, contenido de agua y nitrógeno de las hojas no varían entre estadios (Boege, 2005a). Además, en esta planta se encontró que durante su desarrollo, las plantas disminuyen la habilidad de reemplazar tejido perdido así como las respuestas fisiológicas (movilización y almacenaje de recursos), sobre todo cuando la defoliación es intensa (Boege, 2005b).

Para explicar el cambio ontogenético de los mecanismos de resistencia existen dos teorías que proponen fuerzas selectivas opuestas: por un lado, la teoría de asignación de recursos predice que factores intrínsecos, como la adquisición y asignación de recursos, limitan la producción de metabolitos secundarios en las plantas juveniles, lo que llevaría a un incremento de la defensa conforme la planta madura (Herms y Mattson, 1992; Boege y Marquis, 2005). Por otro lado, la hipótesis de defensa óptima predice que los factores extrínsecos, como la selección por herbívoros, favorecen altos niveles de defensa en los estadios juveniles, seguido por un decremento conforme la planta crece y se vuelve menos susceptible a la reducción de la adecuación por los ataques de los herbívoros (Bryant *et al.*, 1992).

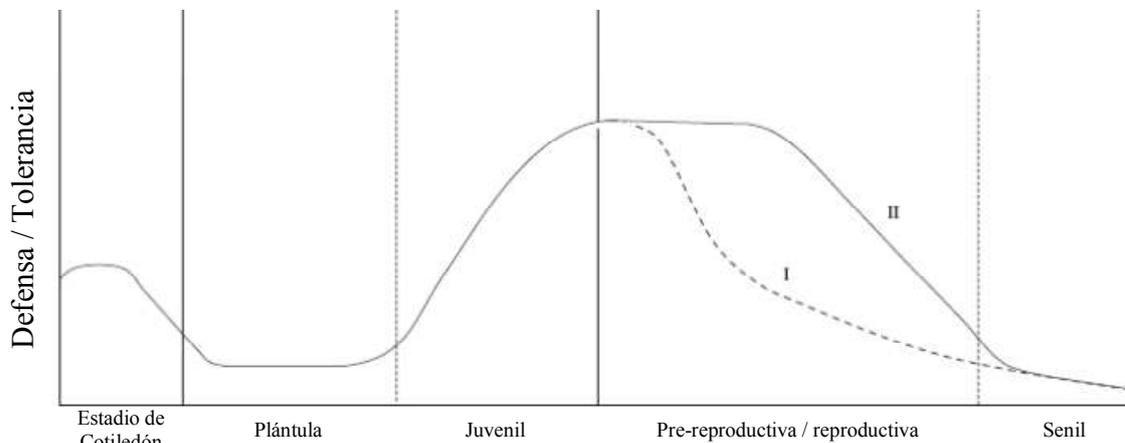


Figura 1. Patrones ontogenéticos de la defensa y tolerancia propuestos basados en hipótesis de asignación de recursos (Boege y Marquis, 2005).

De manera alternativa, patrones ontogenéticos no lineales han sido propuestos por Boege y Marquis (2005; Fig. 1) bajo el supuesto que la expresión de la defensa está restringida por los recursos. En este escenario, se esperaría que la etapa de cotiledón fuera más resistente que las plántulas jóvenes, ya que cuentan con recursos almacenados en la semilla y los cotiledones que pueden utilizarse para la defensa. Conforme la planta crece estos recursos son mermados para la formación de hojas verdaderas, por lo que la plántula tendría un bajo nivel de defensa en este estadio. Posteriormente, conforme la planta genera más área fotosintética es capaz de adquirir y almacenar recursos que puede asignar a la defensa. Durante la etapa reproductiva, este nivel puede mantenerse o disminuir, dependiendo de la estrategia reproductiva de la planta. Finalmente, cuando la planta se

vuelve senescente, disminuyen todas las funciones básicas, incluyendo la resistencia, hasta que la planta muere.

Sin embargo, mediante un metanálisis, Barton y Koricheva (2010) identificaron que los patrones de resistencia y tolerancia son diferentes entre plantas leñosas y herbáceas, y dependen de los atributos estudiados (Fig. 2). Por ejemplo, en el caso de la defensa química constitutiva, se observó un incremento considerable durante la etapa de plántula, tanto en plantas leñosas como herbáceas. Sin embargo, durante el estadio juvenil, estos patrones se vuelven más variables, ya que en las plantas leñosas se observa un aumento de la defensa física mientras que en las plantas herbáceas aumenta la defensa química constitutiva, pero disminuyen la inducida. Finalmente, las plantas leñosas reproductivas disminuyen los atributos de defensa química, mientras que en las hierbas se incrementa la defensa química constitutiva y disminuye la inducida. Cabe resaltar que no se reporta ningún patrón ontogenético consistente en la tolerancia de las plantas, tanto herbáceas como en leñosas.

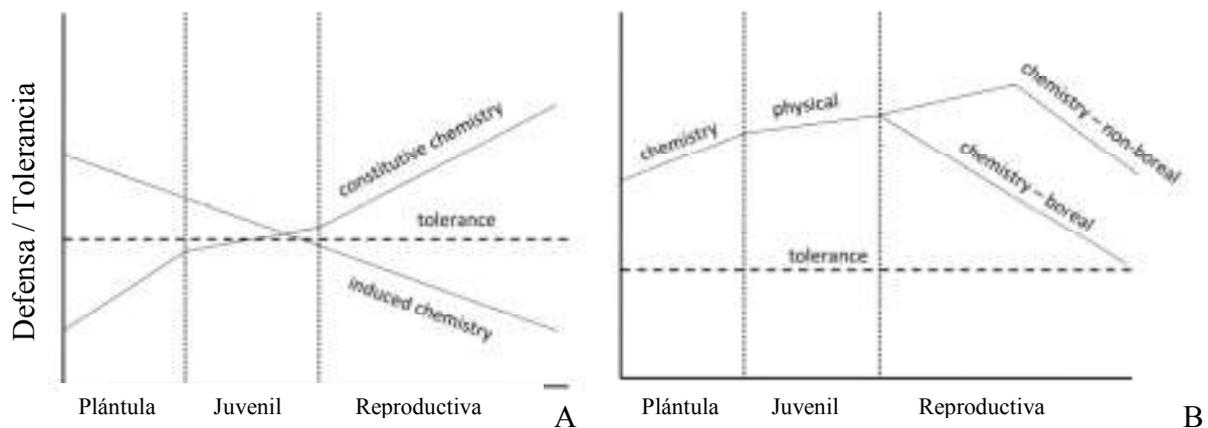


Figura 2. Patrones ontogenéticos de la defensa detectados por un meta-análisis en a) plantas herbáceas y b) leñosas (Barton y Koricheva, 2010)

La existencia de estos patrones generales sugiere que existen factores que limitan la cantidad de recursos disponibles para la defensa. Un enfoque novedoso ha sido propuesto por Schlichting y Pigliucci (1998), quienes consideran la variación ontogenética como normas de reacción. En esta perspectiva, la selección natural puede operar sobre los mecanismos fisiológicos que controlan la estabilidad del fenotipo de la planta. Sin embargo, esta acción requiere sólo ocurrir en ciertos puntos a lo largo de la trayectoria

ontogenética, modificando así el desarrollo del organismo y por lo tanto su norma de reacción de desarrollo.

Para que las trayectorias ontogenéticas puedan considerarse como un atributo adaptativo y brindar beneficios en términos de adecuación en un ambiente específico bajo selección natural, éstas deben variar genéticamente, lo cual ha sido explorado sólo por pocos estudios (Goodger y Woodrow, 2002; Barton, 2007; Lindroth *et al.*, 2007), y ninguno ha evaluado si las trayectorias pueden ser blancos de la selección natural. Finalmente, la mayoría de los estudios que han buscado caracterizar las trayectorias ontogenéticas lo hacen comparando dos estadios ontogenéticos (Jogia *et al.*, 1989; Swihart y Briant, 2001; van Bael *et al.*, 2003; Barret y Agrawal, 2004) o en algunos casos tres o más (Quintero y Bowers, 2011; Villamil *et al.*, 2013), o bien etapas tempranas y tardías de un mismo estadio (Kearsley y Whitham, 1989; Karban, 1990; Hanley *et al.*, 1995; del Val y Dirzo, 2003), por lo que hacen falta estudios que abarquen toda la ontogenia de la planta.

Dado que las plantas pueden mejorar su adecuación al evitar el daño por herbivoría (Marquis 1992), la expresión de atributos defensivos debería ser favorecida por la selección natural. Sin embargo, se ha observado que la defensa puede traer consigo costos impuestos por otros procesos fisiológicos y bioquímicos (Bergelson y Purrington 1996, Strauss *et al.* 2002), que podrían restringir su expresión. Por ejemplo, la construcción de defensas como espinas y tricomas puede generar una disminución en la asignación de recursos de para el almacenamiento, que a su vez puede reducir el crecimiento o el éxito reproductivo de las plantas (Herms y Mattson 1992, van Dam y Baldwin 1998, Agrawal *et al.* 1999, Zavala *et al.* 2004). Inclusive la producción de una defensa puede generar la disminución en la expresión de otra (Koricheva *et al.* 2004), esto debido a posibles disyuntivas en la asignación de recursos o de rutas metabólicas involucradas en la expresión de estos atributos (Thaler *et al.*, 2002).

La evolución conjunta de diferentes atributos defensivos ha sido analizada tanto teórica como experimentalmente (Simms y Triplett 1994; Fineblum y Rausher, 1995; Mauricio *et al.*, 1997; Roy y Kirchner, 2000), bajo el supuesto de que la tolerancia y la resistencia son opciones alternativas de defensa. Debido a que la asignación de recursos ambas estrategias sería redundante, algunos trabajos han predicho que la selección natural

no tendría que favorecer un incremento en ambas estrategias, sino la inversión en una u otra, generando plantas resistentes o tolerantes. Sin embargo, existe evidencia de un escenario contrastante, donde se propone la existencia de niveles intermedios de tolerancia y resistencia (Fornoni *et al.*, 2004). Este modelo considera que los costos y beneficios de ambas estrategias defensivas son variables, y que existe una relación no lineal entre costos y beneficios. Entonces, cuando la forma de función de costo es mayor a la de beneficio, podemos esperar un pico adaptativo correspondiente a niveles intermedios de la expresión de resistencia y tolerancia.

Una revisión de la disyuntiva entre resistencia y tolerancia reporta que estas estrategias de defensa tienden a estar correlacionarse positivamente en sistemas agrícolas y negativamente en sistemas naturales (Leimu y Koricheva, 2006). Esto podría que puede indicar que el factor que determina la relación entre estrategias defensivas es la cantidad de recursos disponibles, ya que los sistemas agrícolas carecen de limitación de recursos. Sin embargo, la mayoría de los estudios ha descrito la trayectoria ontogenética de uno o dos tipos de defensa, por lo que aún queda como interrogante si como parte de estrategias de defensa mixta, ocurren cambios opuestos en distintos mecanismos de defensa (switches ontogenéticos; Boege *et al.*, 2007).

HIPÓTESIS

Suponiendo que la producción de defensas es costosa para las plantas y que la herbivoría no se presenta con la misma intensidad durante la ontogenia de la planta, la selección natural debería favorecer la minimización del costo/beneficio de la producción de defensa mediante la expresión de trayectorias ontogenéticas en distintos atributos. Por otro lado, si dichas trayectorias representan un atributo adaptativo bajo selección natural, requieren tener un componente genético y heredabilidad.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto fue caracterizar las trayectorias ontogenéticas de la defensa de la planta *Turnera velutina*, e identificar si existe variación genética en las mismas.

Específicamente, se abordaron los siguientes objetivos particulares:

- 1) Describir las trayectorias ontogenéticas para tres mecanismos de resistencia constitutiva de *T. velutina*: física, química y biótica.
- 2) Describir las trayectorias ontogenéticas de la resistencia inducida física, química y biótica en *T. velutina*.
- 3) Describir las trayectorias ontogenéticas de la tolerancia de *T. velutina*.
- 4) Evaluar los costos de cada estrategia defensiva durante el desarrollo de *T. velutina*.
- 5) Determinar la presencia de variación genética de dichas trayectorias.

MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones Costeras de La Mancha (CICOLMA), ubicado en el municipio de Actopan, Veracruz (Fig. 3; 19°36'N, 96°22'). Esta región presenta un clima cálido subhúmedo, con régimen de lluvias en verano. La temperatura promedio anual es de 21.1°C en enero a 27.3°C en junio. La región se caracteriza por presentar dos épocas marcadas durante el año: la época de lluvias que abarca de junio a septiembre, y la de secas de octubre a mayo. En la época de lluvias ocurre alrededor del 78% de la precipitación total anual, la cual oscila entre 899 a 1829 mm, con un promedio de 1286 mm (Travieso-Bello y Campos, 2006).

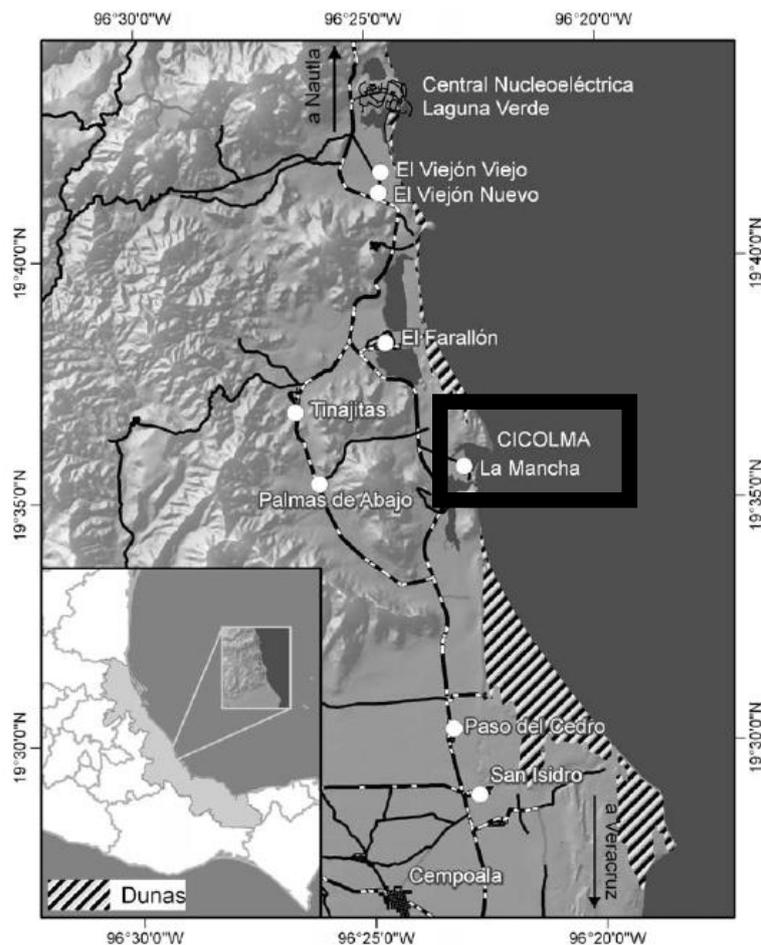


Figura 3. Ubicación del CICOLMA.
(Moreno-Casasola y Paradowska, 2009)

El aporte de humedad se debe, en gran medida, a los vientos alisios, siendo los provenientes del noreste y norte los más dominantes; además éstos son determinantes en los patrones de lluvia. La temporada de nortes ocurre durante los meses de noviembre a febrero, donde la combinación de fuertes vientos y poca precipitación provocan una disminución en la cobertura vegetal. De manera incidental se han observado ciclones tropicales al final del verano y principios del otoño (Travieso-Bello y Campos, 2006).

Existen varios tipos de suelos en la región, sin embargo, en el área de dunas solo se encuentran tres tipos de arenosol: lúvico, calcárico poco humidificado y calcárico ligeramente humidificado. Estos tres tipos de suelos se caracterizan por ser profundos, ligeramente básicos y altamente permeables. Con excepción del arenosol calcárico poco humidificado, los otros suelos presentan una alta cantidad de materia orgánica y de cobertura vegetal (Travieso-Bello y Campos, 2006).

Los tipos de vegetación dominantes en el área de estudio son: bosque tropical caducifolio, bosque tropical seco, matorral de dunas y manglar (Moreno-Casasola *et al.*, 1982). De estas comunidades, la perturbación es más evidente en la selva baja caducifolia y en la vegetación de dunas costeras, donde se observa su transformación en acahuales y pastizales cultivados (Castillo-Campos y Travieso-Bello, 2006). En particular, la vegetación de las dunas muestra un conjunto de comunidades florísticas que varían conforme al grado de estabilización de éstas. Por ejemplo, en las zonas de mayor movimiento de arena, donde la cobertura vegetal es poca se pueden encontrar especies pioneras como *Croton punctatus* Jacq., *Palafoxia lindenii* y *Chamaecrista chamaecristoides*. Conforme aumenta la estabilización de las dunas, las comunidades vegetales son más cerradas, con plantas que presentan raíces delgadas que se extienden hasta alcanzar la zona de humedad y con esto modificar las condiciones del suelo lo que facilitará la colonización por otras especies como *Trachypogon plumosus*, *Andropogon glomeratus* y *Cynanchum schlechtendalii* (Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2006).

Las dunas tienen una complejidad topográfica tal que resulta un factor ecológico muy importante, su variabilidad en la profundidad del manto freático, el contenido de materia orgánica y la movilidad del suelo, promueve tres tipos de ambientes: dunas costeras activas (sustrato móvil y alta salinidad), hondonadas (alto contenido de humedad edáfica) y

dunas estabilizadas (poca fluctuación de temperatura y humedad, sin movimiento del sustrato y mayor cantidad de nutrientes). En el ambiente de dunas estabilizadas podemos encontrar una mayor diversidad vegetal, y ésta disminuye en las dunas costeras activas, donde las condiciones ambientales son poco constantes (Castillo y Moreno-Casasola, 1998).

Las especies más comunes en el matorral, que es la comunidad más estable en términos del suelo, son: *Caesalpinia crista* L., *Chamaecrista chamaecristoides* Green (Leguminosae), *Hibiscus tiliaceus* L. (Malvaceae), *Opuntia stricta* Haw. (Cactaceae), *Randia laetevirens* Standl. (Rubiaceae) y *Turnera velutina* (Turneraceae) (Moreno-Casasola *et al.*, 1982; Castillo-Campos y Medina-Abreo, 2002). Dadas las condiciones de las dunas, se puede pensar que la capacidad de dispersión de las plantas puede ser un factor importante para la colonización y establecimiento, así como las adaptaciones a condiciones de movimiento de arena, la salinidad y la sequía (Martínez *et al.*, 2006; Moreno-Casasola y Travieso-Bello, 2006).

Sistema de estudio

Turnera velutina Presl (Passifloraceae: Turneroideae; Fig. 4) es un arbusto endémico de México que se distribuye en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Fig. 5). Crece en playas y dunas costeras, así como en el bosque tropical caducifolio, desde el nivel del mar hasta los 1300 m de altitud. Esta especie era una variedad considerada como perteneciente al complejo de *Turnera ulmifolia* (*T. ulmifolia* var. *velutina*) pero fue renombrada por Arbo (2005) como *T. velutina*. Por este motivo, todos los trabajos realizados previamente en la región utilizan el nombre de *T. ulmifolia*.



Fig. 4. Fotografías de a) habito, b) nectarios extraflorales, c) fruto y d) semillas de *Turnera velutina*.

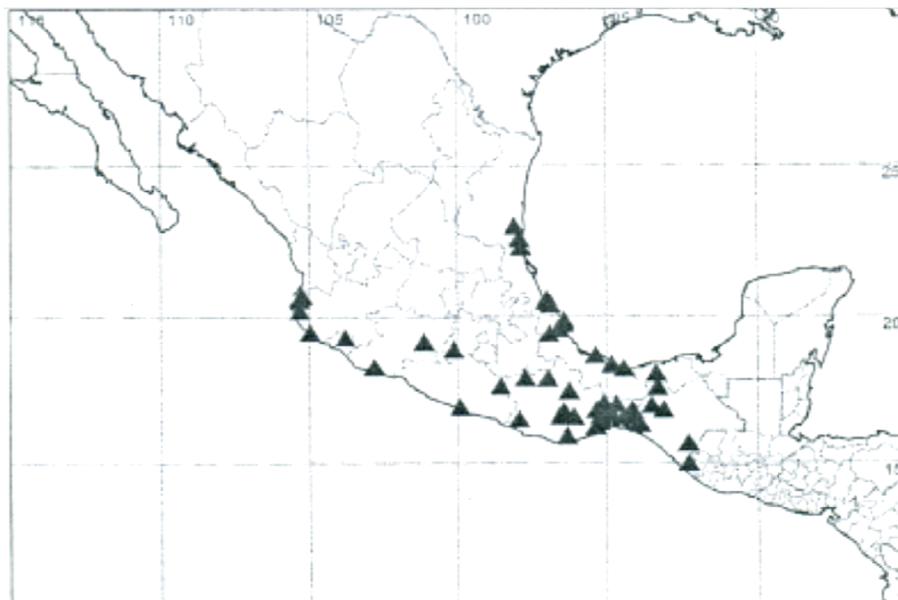


Figura 5. Mapa de distribución de *Turnera velutina* en México (Arbo, 2005).

T. velutina presenta hojas lanceoladas con margen dentado, pubescentes en ambas superficies, con el envés más claro y la venación ligeramente prominente arregladas en verticilo a lo largo de un tallo ramificado que mide de 0.6 a 2 m de largo cuando es adulta (Fig. 4a; Arbo, 2005; Alvarado-Cárdenas, 2006).

Las hojas poseen nectarios extraflorales (NEF; Fig. 4b), de forma cupular a ambos lados del peciolo, cercanos a su inserción con el tallo. El néctar extrafloral está compuesto por sacarosa, glucosa y fructuosa en porcentajes similares (Elias *et al.*, 1975). La producción del néctar extrafloral es continua a lo largo del día; sin embargo, suele aumentar en la mañana y la tarde (obs. pers.). El néctar extrafloral es colectado principalmente por hormigas (*Camponotus planatus*, *C. abdominalis*, *Conomrema* sp., *Crematogaster brevispinosa*, *Forelius* sp. y *Pseudomyrmez* sp.; Cuautle *et al.*, 2005), y en menor medida por abejas (*Apis mellifera*; Torres-Hernández *et al.*, 2000) y avispas (*Polistes instabilis* y *Polybia occidentalis*). Se ha encontrado una relación entre la presencia de las avispas con el aumento de la producción de botones y flores, además de un aumento del daño por herbívoros ante la ausencia de hormigas y avispas (Cuautle y Rico-Gray, 2003).

El principal herbívoro de *T. velutina* es la oruga *Euptoieta hegesia* Cramer (Lepidoptera: Nymphalidae), que tiene un pico de actividad entre junio a agosto, aunque puede encontrarse durante todo el año. Sin embargo, el daño generado por herbivoría no es el mismo para las plantas en diferentes estadios ontogenéticos, las plantas juveniles reciben más daño (6.5%) que las plantas reproductivas (2.5%; Villamil, 2012). Ante el ataque de los herbívoros, *T. velutina* presenta diferentes atributos defensivos, entre los que se hallan tricomas foliares (Villamil, 2012) y NEF (Cuautle y Rico-Gray, 2003; Cuautle *et al.*, 2005; Villamil, 2012).

En la especie hermana *T. ulmifolia*, se ha encontrado variación en los niveles de producción de HCN entre poblaciones en Jamaica, con un gradiente de poblaciones cianogénicas y acianogénicas. Además, se encontró un componente ontogenético de la cianogenesis, ya que en algunas poblaciones cianogénicas tanto plántulas como plantas reproductivas tuvieron niveles de cianogenesis similar, mientras que en otras poblaciones donde las plantas reproductivas tuvieron bajos niveles de cianogenesis, las plántulas tuvieron niveles mayores (Schappert y Shore, 1995). Villamil (2012) reporta la ausencia de

HCN en los estadios juveniles y reproductivos de una población veracruzana de *T. velutina*, sin embargo, cabe explorar su presencia en las plántulas de esta población.

Las flores son axilares de entre 1.5 y 3 cm, de color amarillo y con pétalos que se unen en la parte inferior formando un tubo (hipanto). Los estambres son insertos, cerca de la base del hipanto, el ovario es súpero y los estigmas son densamente fimbriados (Gama *et al.*, 1985). Las flores pueden abrir de una a tres cada día y duran solo un día. La hoja asociada a la flor permanece vigorosa durante el desarrollo del fruto, que dura entre 2 a 3 semanas aproximadamente (Torres-Hernández *et al.*, 2000). La población de estudio es monomórfica y autocompatible, con estilo largo y diferentes alturas de estambres. Esta planta florece y fructifica todo el año, aunque durante la época de lluvias la producción de flores y frutos aumenta, y tiene un gran decaimiento en la temporada seca (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Salazar-Rojas *et al.*, 2012). Las flores de *T. velutina* son visitada principalmente por la abeja europea (*Apis mellifera*), aunque también se han registrado a otras especies de abejas (*Agapostemon* sp., *Augochlora* sp., *Ceratina* sp., *Augochloropsis* sp., *Thygater* sp., *Lasioglossum* sp.) y de mariposas de la familia Pieridae como *Aphrissa statira*, *Phoebis phillea* y *Anteos maerula* así como de una especie no identificada de la familia Hesperidae (Ramos-Castro, en prep.).

Los frutos son cápsulas de 5 a 12 mm de ancho, con tres valvas dehiscentes (Fig. 4c). Éstos tienen $56 \pm d. e. 2.0$ semillas ($n = 40$; Cuautle, 2004), y un individuo puede llegar a producir cerca de 5,000 semillas por año (Salazar-Rojas *et al.*, 2012). Las semillas son ovoide-oblongas, pardas a negras, de 2.2 a 3.5 mm de largo y de 1.0 a 2.0 de ancho y tienen elaiosomas (i. e. estructuras ricas en lípidos que son considerados como una adaptación específica para promover la remoción y dispersión por hormigas; Alvarado-Cárdenas, 2006; Fig. 4d). La cantidad de semillas removidas por los dispersores es importante, ya que sólo el 8% caen al suelo, pudiendo encontrarse una densidad de 1.2 semillas por cm^2 ; sin embargo, esta cantidad varía dependiendo de la especie de hormiga dispersora ya que, por ejemplo, *Forelius analis* contribuye con el 64% de los eventos de remoción, mientras que las otras especies contribuyen sólo con el 36% restante. Las semillas que son colectadas por *F. analis* germinan entre 2 y 4 veces más que aquellas sembradas manualmente, aún cuando se les retira el elaiosoma (Salazar-Rojas *et al.*, 2012).

Se han reportado como principales dispersores a las siguientes especies de hormigas: *Solenopsis geminata*, *Brachymyrmex* sp., *Azteca* sp., *Paratrechina longicornis*, *Dorymyrmex bicolor*, *Crematogaster brevispinosa*, *C. planatus*, *Pseudomyrmex gracilis*, *Camponotus atriceps*, *Crematogaster* sp., *Solenopsis* sp., *Monomorium cyaneum*, *Forelius analis*, y dos especies del género *Pheidole* (Cuautle *et al.*, 2005). Se han reportado a las larvas de *Crociosema plebejana* (Lepidoptera) como depredadores de frutos previo a la dispersión, éstas larvas se encuentran activas durante todo el año (Salazar-Rojas *et al.*, 2012), y también tienen actividad en botones florales (obs. pers.).

Métodos de trabajo en campo e invernadero

Geminación de plantas

Entre junio y septiembre del 2010 se colectaron frutos maduros de plantas de *Turnera velutina* ubicadas en el matorral de dunas del CICOLMA. Los frutos colectados se separaron por la identidad de la planta de la cual fueron colectados, con el fin de mantener identificadas familias de medias hermanas maternas. Se retiró el elaiosoma de las semillas de manera manual y se germinaron utilizando como sustrato tierra proveniente de los terrenos del CICOLMA mezclada con vermiculita en una proporción 50:50. La siembra fue en germinadores de 5 × 5.5 cm en los que se colocaron de una a cinco semillas por contenedor. Se usaron las tapas de los germinadores a modo de charola para mantener a las semillas con riego por inmersión. La cantidad de agua se mantuvo constante a 2 o 3 cm hasta que comenzaran a germinar las semillas, lo que ocurrió aproximadamente entre la segunda y tercera semana.

Cada plántula fue trasplantada a un espacio individual en otra germinadora para evitar efectos de competencia, y fue regada diariamente. Cuando las plantas alcanzaron la etapa de cuatro hojas se trasplantó a una maceta de 2 litros de capacidad. A partir de este momento, se regó de manera más espaciada, cada 2 o 3 días, sin dejar que el sustrato se secara por completo. Con el fin de obtener un número necesario de plantas para los experimentos, se sembraron más de diez mil semillas y se obtuvieron aproximadamente 1,700 plantas pertenecientes a 20 familias maternas.

Trayectorias ontogenéticas de la defensa constitutiva

Para describir las trayectorias ontogenéticas de defensa constitutiva se generaron grupos de 40 plantas pertenecientes a diferentes familias maternas considerando los estadios de cotiledón, dos hojas, seis hojas, diez hojas, con flor (“flor”) y con fruto (“fruto”).

Para caracterizar la defensa física, de cada planta se colectó la penúltima hoja apical completamente expandida. Es decir, para los estadios de cotiledón y dos hojas, se colectó una de las dos hojas existentes, para los estadios seis y diez hojas se colectó la quinta y novena hoja, respectivamente; y para los estadios de flor y fruto se utilizó la hoja con la primera flor y el primer fruto, respectivamente. Se midió el área de cada hoja utilizando un medidor de área foliar (CI-202 CID, Inc., Cama, WA, EE. UU.) y se obtuvo su peso con una balanza analítica (VIC303, Acculab Sartorius Group, MA, EUA). Con estos datos se calculó la masa foliar específica (*MFE*), considerando la fórmula $MFE = \text{peso (mg)}/\text{área (mm}^2\text{)}$. La *MFE* cuantifica la inversión de la masa del tejido por unidad de área foliar que intercepta luz, es decir que hojas con un alto *MFE* tienen hojas con la lámina más gruesa o con el tejido más denso (Wright, *et al.*, 2004), por lo que esta medida se utilizó como un indicador de la dureza de la hoja. Posteriormente, la hoja se guardó en una bolsa de papel estraza para ser secada a temperatura ambiente y poder pesarla nuevamente y así poder determinar el contenido de agua. El porcentaje de agua se estimó como $\%Agua = [(PF - PS)/PF] * 100$, donde *PF* es peso fresco y *PS* es peso seco. Finalmente, se estimó la densidad de tricomas de la misma hoja, utilizando un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Stemi SV6 (10×). Se realizaron conteos del número de tricomas en cuatro campos (0.5 mm) en el envés, dos de cada lado de la vena media, y cuatro campos en el haz (Fig. 6).

Los datos de dureza y porcentaje de agua tuvieron una distribución normal, mientras que los de tricomas fueron transformados con la función logarítmica: $\log(x + 1)$ para cumplir con los supuestos de normalidad de los análisis paramétricos. Las diferencias ontogenéticas en cada tipo de defensa física fueron analizadas mediante análisis de varianza univariados (ANDEVAs) incluyendo en el modelo la familia materna como un efecto aleatorio y el estadio como un efecto fijo. En el caso de los tricomas también se incluyó la

cara de la hoja como un efecto fijo. Además, se realizaron pruebas de contrastes *a priori* para estimar las diferencias entre estadios y entre las caras de la hoja.

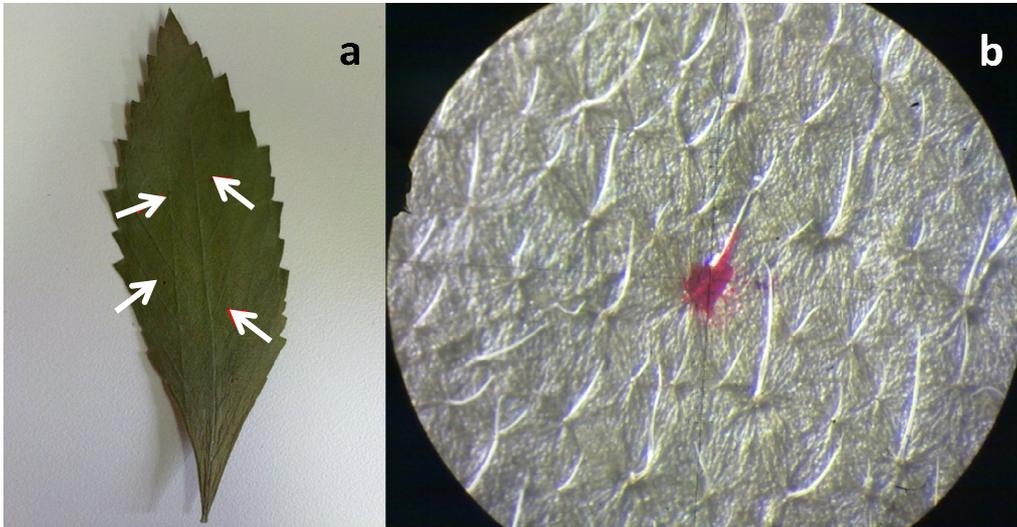


Figura 6. a) Hoja de *T. velutina* con los campos de observación seleccionados. b) Campo de observación para el conteo de tricomas.

La defensa química se evaluó mediante estimaciones de la presencia de ácido cianogénico; sin embargo, ésta sólo se midió en los estadios de plántula, ya que Villamil (2012) reportó que plantas en los estadios juveniles y reproductivos de esta población son acianogénicas. Se utilizaron 84 plantas adicionales a las mencionadas anteriormente, ya que la prueba utilizada es destructiva. Para la verificación de la presencia de HCN, se tomó una hoja de cada planta y se colocó en un tubo Eppendorf, se maceró con 7 μ L de cloroformo, inmediatamente después se colocó un papel indicador, realizado con una solución acuosa de 0.5% de ácido pícrico y 5% de Na₂CO₃, y se dejó reposar 24 h en oscuridad y a temperatura ambiente (25-27°C). Transcurrido este tiempo, se registró la reacción del papel filtro ante la presencia de HCN (Schappert y Shore, 1999), cambiando de color amarillo brillante a anaranjado o rojo oscuro.

En el caso de la defensa biótica, se midió la producción de NEF y néctar extrafloral de las cuatro hojas apicales totalmente expandidas para cada planta, salvo en el caso de los estadios de cotiledón y dos hojas ya que no producen nectarios extraflorales. Para cada hoja se contó el número de NEF, se cuantificó la producción de néctar con un capilar de 1 μ L y, en los casos donde fue posible, se midió la concentración de azúcares del néctar con un refractómetro. Al multiplicar estos datos se obtuvo el peso del contenido de azúcar. Se

calculó el promedio de NEF y del peso del contenido de azúcar por planta. Se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se hicieron ANDEVAs para estimar las diferencias entre estadios, considerando a la familia como un efecto aleatorio. Además, se hicieron contrastes pareados *a priori* para estimar las diferencias entre estadios. Todos los análisis de varianza se realizaron en R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008).

Trayectorias ontogenéticas de la defensa inducida

Para evaluar la defensa inducida durante el desarrollo de *T. velutina*, así como el componente genético de dichas trayectorias ontogenéticas, se generaron tres grupos de 200 plantas, un grupo para cada uno de los siguientes estadios: plántulas (dos hojas), juveniles (diez hojas) y reproductivas (producción de primer fruto). Estas 200 plantas pertenecían a 10 familias maternas (20 plantas por familia por estadio).

Las plantas de cada familia se dividieron en dos grupos: uno fue el grupo control y el otro recibió un tratamiento de daño foliar artificial, que consistió en remover la mitad de la lámina de cada hoja con unas tijeras, evitando cortar la vena media, y después se picoteó del resto de la lámina con una aguja de disección (Heil *et al.*, 2001) para incrementar la superficie dañada a la reportada previamente (Villamil, 2012). La metodología para cuantificar defensas físicas y bióticas fue la misma que en el apartado anterior, con la única diferencia de que se seleccionaron las primeras dos hojas completamente expandidas producidas después del evento de daño foliar.

Para los análisis estadísticos en todos los casos se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de bondad de ajuste de Shapiro-Wilk. Solamente se requirió transformar los datos para la densidad de tricomas utilizando la función logarítmica $\log(x + 1)$. Para evaluar la diferencia en la densidad de tricomas entre estadios, tratamientos, cara de la hoja y familia (como efecto aleatorio); así como de las interacciones entre estos efectos, se realizaron ANDEVAs y pruebas de contrastes *a priori* para estimar las diferencias entre estadios particulares. Para el resto de las variables (dureza, porcentaje de agua, promedio de NEF y del peso del contenido de azúcar por planta) se evaluó la diferencia entre estadios, tratamientos y familia (como efecto aleatorio),

así como de las interacciones de estos efectos mediante ANDEVAs y contrastes pareados *a priori* para las diferencias entre estadios y tratamientos. Para visualizar la variación genética de las trayectorias ontogenéticas de la defensa se calcularon los promedios por familia de cada atributo de defensa. Todos los análisis de varianza se realizaron en R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008).

Trayectorias ontogenéticas de la tolerancia

Para caracterizar cambios de los mecanismos que permiten a las plantas tolerar el daño, se estimó el crecimiento compensatorio, los contenidos de clorofila y la asignación de biomasa distintas partes de la planta durante en las mismas plantas que para defensa inducida, pertenecientes a diferentes familias maternas considerando los estadios de plántulas, juveniles y reproductivas, así como los grupos tratamiento y control.

Cuando las plantas alcanzaron el estadio inicial establecido, se les midió el diámetro basal (DB) y la altura. Posteriormente, se eligieron al azar cinco hojas de cada planta. Esta selección se realizó dividiendo el número total de hojas entre 5, para seleccionar sistemáticamente cinco hojas distribuidas en todo el follaje. A las hojas seleccionadas se les midió largo (L) y ancho (A), con lo cual se pudo obtener el área foliar (AF) a partir de la relación establecida $AF = 0.7 + (0.64 * L * A)$ en un trabajo previo (Villamil, 2012). El contenido de clorofila en las hojas es un indicador fisiológico de la planta, y se ha reportado que puede incrementar después del daño por herbivoría (Thomson *et al.*, 2003). Este atributo se midió a través del índice de contenido de clorofila (ICC) con un medidor portátil de campo de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (CCM-200, Opti-Sciences, Hudson, NH, EE. UU.). Una vez que la planta produjo nuevas hojas, de 15 a 30 días después, se repitieron las mediciones de DB, altura, AF e ICC en cinco hojas producidas inmediatamente al daño artificial. A los 30 días se separaron los tallos, las hojas y la raíz. Estas muestras fueron secadas y posteriormente pesadas para obtener el peso seco de la biomasa de cada parte de la planta. En el caso de las hojas de las plantas con tratamiento de daño foliar, éstas se pesaron por separado las hojas que fueron cortadas de las completas producidas posteriormente, y se duplicó el peso de las hojas cortadas para estimar el peso total de biomasa foliar. Con estos datos se calculó el promedio de cada variable y la proporción de biomasa aérea/subterránea por planta. Se verificó la normalidad

de los datos mediante la prueba de ajuste de bondad Shapiro-Wilk, y se evaluó la diferencia entre estadios, tratamientos, el tiempo y la familia (aleatorio) mediante ANDEVAs y contrastes pareados *a priori* para estimar las diferencias entre estadios y entre tratamientos. Todos los análisis se realizaron en R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008).

Costos de las estrategias defensivas

Para evaluar los costos de las trayectorias ontogenéticas de las distintas defensas en términos de la biomasa producida en ausencia de daño, se utilizaron los valores de biomasa seca total de las plantas del experimento de defensa constitutiva. Se hicieron regresiones lineales considerando las diferentes variables de defensa (densidad de tricomas, MFE, porcentaje de agua, número de NEF, producción de azúcar) como variables independientes y la biomasa seca total de las plantas control como variable dependiente en JMP 7.0. Una relación negativa entre dichos atributos y la biomasa fue interpretada como un costo de los mismos en la capacidad de la planta para acumular biomasa ante un incremento en la inversión en la defensa.

RESULTADOS

Trayectorias ontogenéticas de la defensa constitutiva

Defensa física

Se encontró que la densidad de tricomas aumentó durante el desarrollo de *T. velutina* (Fig. 7; estadio: $F_{5, 502} = 1229.23$, $P < 0.001$); sin embargo, el patrón de aumento difirió entre las caras de la hoja (interacción estadio \times cara: $F_{5, 502} = 11.80$, $P < 0.0001$), siendo mayor en el envés. En el haz de la hoja, la diferencia entre plántula y juvenil fue más considerable, cuadruplicándose la densidad de tricomas, y posteriormente se mantuvo este valor en el estadio reproductivo. En el envés, se observó un incremento similar de plántula a juvenil, pero cuando la planta es reproductiva, la densidad de tricomas aumentó en un 33% con respecto a las plantas juveniles.

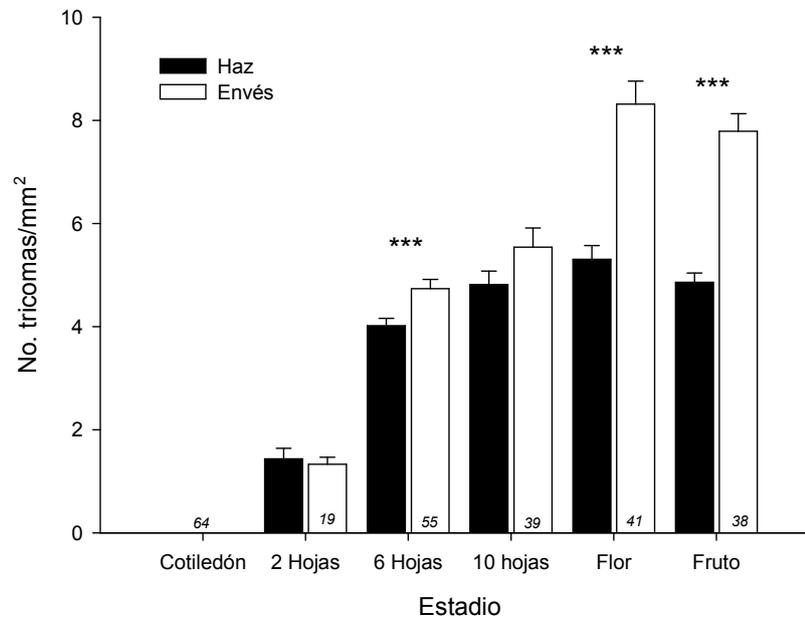


Figura 7. Densidad de tricomas (\pm e. e.) por estadio ontogenético en *T. velutina*. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre caras de la hoja ($P < 0.001$). Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por estadio ontogenético.

En el caso de la masa foliar específica, utilizada como un estimador de la dureza de las hojas, se encontró un cambio significativo durante el desarrollo de las plantas (Fig. 8a; estadio: $F_{5, 223} = 33.38$ $P < 0.0001$). La dureza de los cotiledones fue mayor en 10% al encontrado para las plantas del estadio de 2 hojas (Fig. 8a; contraste *a priori*: $F_{1, 58} = 6.75$ $P = 0.01$). Para el resto de los estadios juveniles y reproductivos, si bien se observó una

tendencia a aumentar el peso de las hojas, éste únicamente difirió significativamente al comparar la primera etapa de juveniles con la última de reproductivas.

Finalmente, el porcentaje de agua contenido en las hojas también tuvo cambios significativos durante el desarrollo de las plantas (estadio: $F_{5, 204} = 43.12$ $P < 0.0001$). Estos cambios tuvieron un comportamiento no lineal, con los niveles más bajos en el estadio cotiledón, niveles intermedios en el estadio de 2 hojas y los dos estadios reproductivos, y los niveles más altos en los estadios juveniles (Fig. 7).

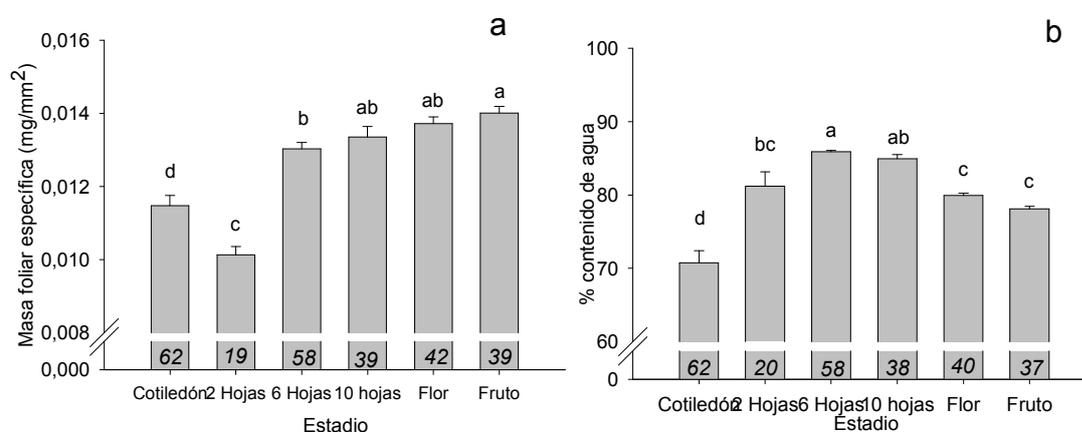


Figura 8. Valores promedio (\pm e. e.) de a) masa foliar específica y b) porcentaje de agua en seis estadios de desarrollo de *Turnera velutina*. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogénicos. Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por grupo.

Defensa química

Villamil (2012) reporta que las plantas juveniles y adultas de *Turnera velutina* no reaccionan a la prueba de picrato para detectar HCN; sin embargo, en este trabajo se encontró una reacción positiva a ésta prueba para todas las plantas utilizadas de los estadios cotiledón y plántula. Al considerar lo reportado por Villamil (2012), podemos sugerir la presencia de ácido cianogénico como atributo defensivo únicamente cuando la planta se encuentra en el estadio de plántula.

Defensa biótica

El número de nectarios y el contenido de azúcar en el néctar extrafloral se incrementó significativamente durante el desarrollo de las plantas (NEF estadio: $F_{5, 249} = 634.22$ $P < 0.0001$; Azúcar estadio: $F_{5, 251} = 23.41$ $P < 0.0001$). Estas diferencias fueron considerables, sobre todo porque en el estadio de plántula carece de NEF en las hojas, y por tanto, no hay producción de néctar extrafloral. A partir de la tercera hoja el número de NEF es en

promedio de 2 por hoja, manteniéndose este valor en el estadio juvenil. En el estadio reproductivo, se observó un aumento en el número de NEF siendo ligeramente mayor (2.66) cuando la planta produce sus primeras flores (Fig. 9).

El patrón en la inversión de recompensas para las hormigas mutualistas, expresada en términos del contenido de azúcar en el néctar extrafloral fue diferente al de la producción NEF. Dada la ausencia de NEF en las plántulas, tampoco hay producción de néctar. En las plantas juveniles, la cantidad de azúcar aumentó más de cinco veces entre las plantas de 6 hojas y las de 10 hojas. El contraste entre plantas juveniles y reproductivas fue de una magnitud de 10 veces del contenido de azúcar.

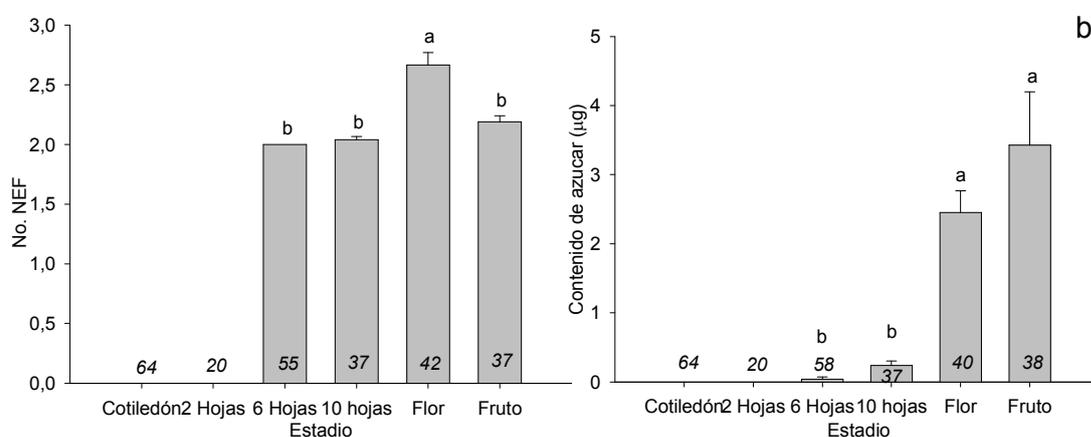


Figura 9. Valores promedio (\pm e. e.) de a) número de nectarios extraflorales y b) producción de azúcar por hoja en seis estadios de desarrollo de *Turnera velutina*. Las letras distintas reflejan diferencias significativas entre estadios ontogenéticos. Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por grupo.

Trayectorias ontogenéticas de la defensa inducida

En concordancia con el experimento anterior, se encontró que todos los atributos de defensa presentaron el mismo patrón ontogenético (tablas efecto estadio), por lo que en este apartado sólo se mencionará el efecto de la inducción sobre la defensa de plantas.

Defensa física

El daño artificial generó un aumento en la densidad de tricomas (tratamiento: $F_{1, 916} = 18.4$, $P < 0.0001$, Tabla 1), aunque para cada estadio el incremento fue diferente (Fig. 10). Mientras que la inducción de tricomas fue de un 15% en el envés de las hojas de las plántulas (contraste *a priori*: $F_{1, 906} = 5.99$, $P = 0.01$), en las plantas juveniles fue de 8% (contraste *a priori*: $F_{1, 906} = 4.63$, $P = 0.03$). Las plantas reproductivas tuvieron la mayor inducción de tricomas, con 36% en el haz de sus hojas (contraste *a priori*: $F_{1, 906} = 9.65$, $P = 0.001$).

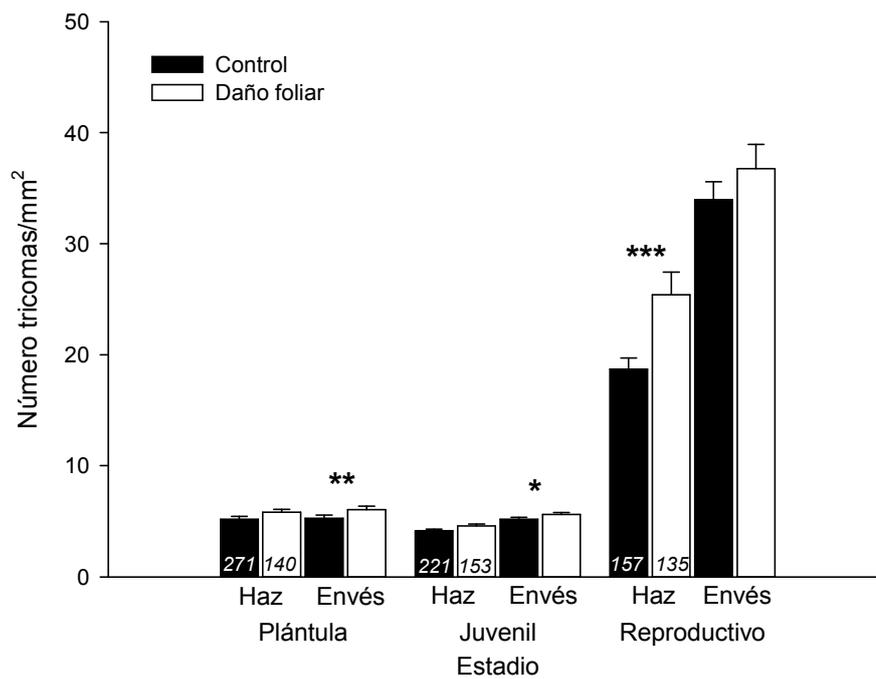


Figura 10. Densidad de tricomas (\pm e. e.) por estadio ontogenético de *Turnera velutina*. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por grupo.

Tabla 1. Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogenético, el tratamiento, la cara de la hoja y la familia materna sobre la densidad de tricomas. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	F/χ^2	g. l.	P
Estadio ontogenético	1751.43	2, 916	<0.0001
Tratamiento	18.40	1, 916	<0.0001
Cara de hoja	100.46	1, 916	<0.0001
Familia materna	8.72	3	0.003
Estadio × Tratamiento	0.53	2, 916	0.58
Estadio × Cara	33.66	2, 916	<0.0001
Estadio × Familia	34.45	6	<0.0001
Tratamiento × Familia	2.08	3	0.55
Tratamiento × Cara	1.35	1, 916	0.24
Cara × Familia	0	3	1
Estadio × Tratamiento × Cara	1.29	2, 916	0.27
Estadio × Tratamiento × Familia	0.47	10	1
Estadio × Cara × Familia	0.69	10	1
Cara × Tratamiento × Familia	0.0001	6	1
Estadio × Tratamiento × Cara × Familia	0.75	15	1

El daño artificial indujo un aumento en la dureza de la hoja (tratamiento: $F_{1,450} = 5.23$, $P < 0.05$, Tabla 2). Sin embargo esta diferencia fue significativa únicamente las plantas juveniles (estadio × tratamiento: $F_{2,450} = 4.19$, $P = 0.01$), donde aquellas que recibieron daño, la dureza fue 5% mayor que en las plantas control.

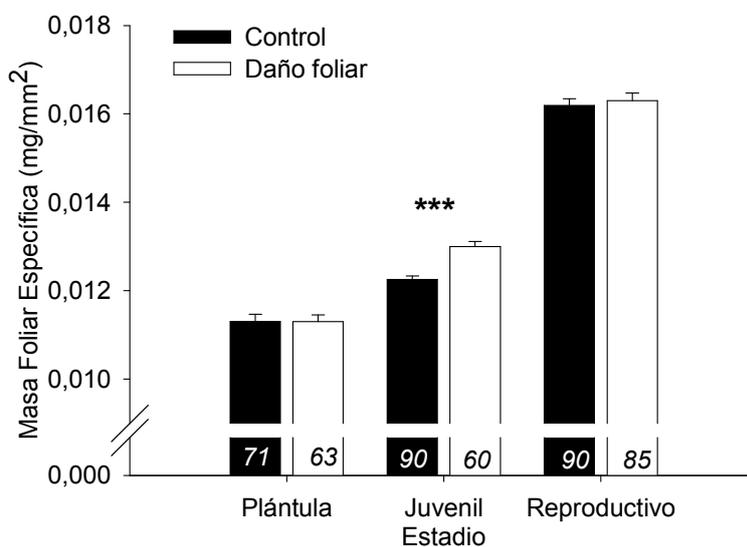


Figura 11. Masa foliar específica (\pm e. e.) por estadio ontogenético de *Turnera velutina*. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$). Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por grupo.

Tabla 2. Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogenético, el tratamiento y la familia materna sobre la masa foliar específica (MFE) y el contenido de agua. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	Dureza			Contenido de agua		
	F/χ^2	g. l.	P	F/χ^2	g. l.	P
Estadio	722.39	2, 450	<0.0001	166.72	2, 413	<0.0001
Tratamiento	5.23	1, 450	0.0226	5.17	1, 413	0.0235
Familia	16.32	3	0.0001	24.39	3	<0.0001
Estadio \times Tratamiento	4.19	2, 450	0.0156	1.09	2, 413	0.33
Estadio \times Familia	29.2	6	<0.0001	67.17	6	<0.0001
Tratamiento \times Familia	0.97	3	0.80	0	3	1
Estadio \times Tratamiento \times Familia	1.71	10	0.99	2.27	10	0.99

Finalmente, se encontró inducción del contenido de agua (tratamiento: $F_{1, 413} = 5.17$ $P < 0.05$; Tabla 2). Además, se observó una diferencia ontogenética en la inducción del contenido de agua, ya que sólo en el estadio juvenil las plantas con daño tuvieron un mayor contenido de agua que las plantas control (contraste *a priori*: $F_{1, 398} = 6.11$, $P = 0.01$), sin embargo este aumento fue tan sólo de un 1% (Fig. 12).

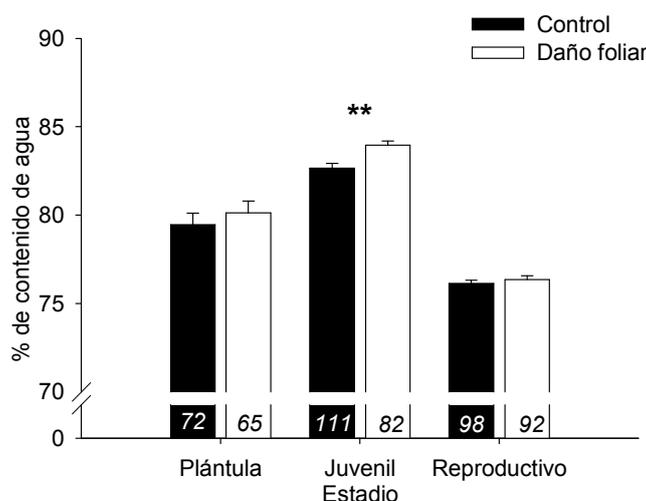


Figura 12. Porcentaje del contenido de agua (\pm e. e.) por estadio ontogenético. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.01$). Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por grupo.

Defensa Biótica

No se encontró un efecto de inducción sobre el número de NEF (tratamiento: $F_{2, 494} = 1.67$, $P = 0.18$, Tabla 3). Sin embargo al explorar solamente en las plantas reproductivas se encontró una disminución marginal del número de NEF (Fig. 13a; contraste *a priori*: $F_{1, 344} = 3.72$, $P = 0.05$).

Tabla 3. Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogenético, el tratamiento y la familia materna sobre el número de NEF y la producción de azúcar. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	NEF			Producción de azúcar		
	F/χ^2	g. l.	P	F/χ^2	g. l.	P
Estadio	6133.7	2, 494	<0.0001	38.99	2, 499	<0.0001
Tratamiento	1.93	1, 494	0.16	0.85	1, 499	0.35
Familia	0.68	3	0.40	4.70	3	0.03
Estadio \times Tratamiento	1.67	2, 494	0.18	0.17	2, 499	0.84
Estadio \times Familia	22.05	6	0.001	42.5	6	<0.0001
Tratamiento \times Familia	0	3	1	0	3	1
Estadio \times Tratamiento \times Familia	0	10	1	0.016	10	1

La producción de néctar tampoco presenta efecto de la inducción (tratamiento: $F_{1,499} = 0.85$, $P = 0.35$; Tabla 3), ya que en aquellas plantas que tuvieron daño artificial, el peso de azúcar no aumentó de manera significativa (Fig. 13b). Al considerar en conjunto el número de NEF y la cantidad de azúcar producida, es posible sugerir que no son atributos que responden al daño artificial de manera significativa en ningún estadio ontogenético.

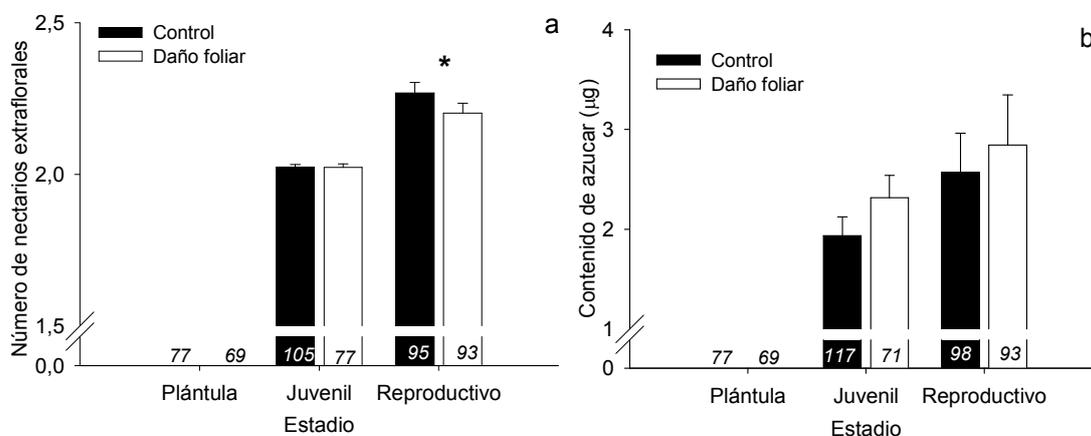


Figura 13. Valores promedio (\pm e. e.) de a) número de nectarios extraflorales y b) producción de azúcar por hoja por estadio ontogenético de *Turnera velutina*. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). Los números en la base de las gráficas representan el número de muestra por grupo.

Variación genética de trayectorias ontogenéticas de la defensa

Las trayectorias ontogenéticas de todos los atributos de defensa presentaron diferencias entre familias (Fig. 14; ver anexo 1, tablas 1 a 3, interacción estado \times familia) y cada atributo presentó niveles de variación diferentes. De los atributos de defensa física, la densidad de tricomas y la masa foliar específica presentaron diferencias menores entre familias (Fig. 13 a y b), mientras que el porcentaje de agua en las hojas el patrón ontogenético es muy variable entre familias (Fig. 13c). El número de nectarios extraflorales no varió mucho entre familias. Finalmente, la producción de néctar fue más variable entre familias, sobre todo en el estadio reproductivo (Fig. 13e). No se detectó variación genética en la inducibilidad de las defensas durante la ontogenia (tablas 1 a 3, interacción: familia \times tratamiento \times estadio)

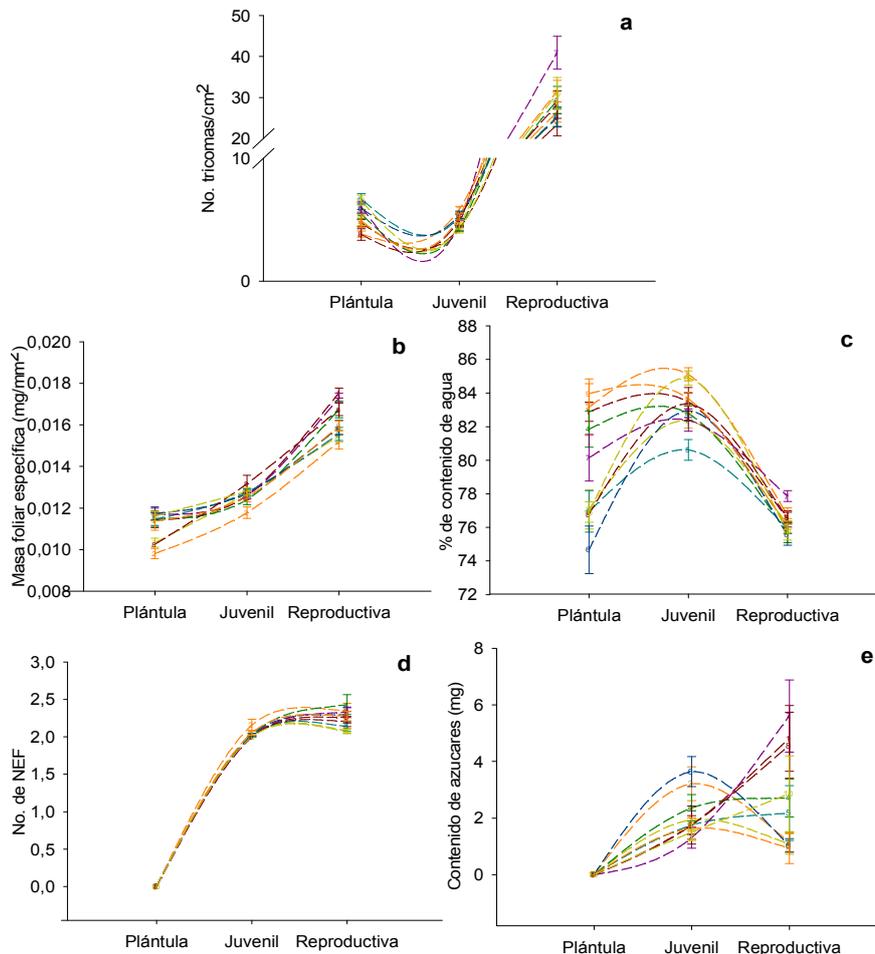


Figura 14. Valores promedio (\pm e. e.) por estadio por familia de plantas de *Turnera velutina* de atributos de defensa a) densidad de tricomas, b) masa foliar específica, c) porcentaje de agua, d) número de nectarios extraflorales y e) producción de néctar.

Trayectorias ontogénicas de mecanismos de la tolerancia

Crecimiento compensatorio

Ante el daño foliar, las plantas respondieron con modificaciones en su crecimiento vegetativo expresado en diámetro (tratamiento: $F_{1, 542} = 20.02$, $P < 0.0001$, tabla 4). El diámetro basal aumentó conforme se desarrolla la planta (estadio: $F_{2, 542} = 131.32$, $P < 0.0001$, tabla 4). Las plantas juveniles y reproductivas que recibieron daño tuvieron un diámetro basal menor que en las plantas control, mientras que en las plántulas esta diferencia no fue significativa (Fig. 15a); es decir, este estadio logró compensar el daño recibido.

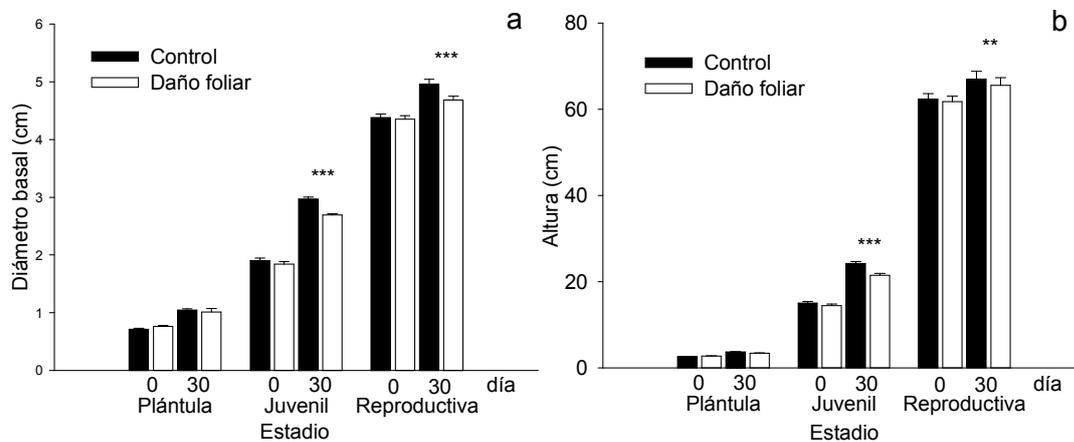


Figura 15. Valores promedio (\pm e. e.) de a) diámetro basal y b) altura en cada medición y cada estadio ontogénico en plantas control y plantas sometidas a daño artificial de *Turnera velutina*, en los días 0 y 30 del experimento. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Tabla 4. Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogénico, el tratamiento y la familia materna sobre el crecimiento en diámetro y altura. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	Diámetro basal			Altura		
	F/χ^2	g. l.	P	F/χ^2	g. l.	P
Estadio	131.32	2, 542	<.0001	2.15	2, 542	0.11
Tratamiento	20.02	1, 542	<.0001	1.65	1, 542	0.19
Familia	$2.56e^{-7}$	3	0.99	0.106	3	0.74
Estadio \times Tratamiento	2.38	2, 542	0.09	0.83	2, 542	0.43
Estadio \times Familia	32.52	6	<.0001	10.9	6	0.09
Tratamiento \times Familia	0	3	1	0	3	1
Estadio \times Tratamiento \times Familia	5.43	10	0.86	3.62	10	0.96

Se observó un aumento en la altura de la planta inherente al desarrollo ontogenético (estadio: $F_{2, 546} = 88.58$, $P < 0.0001$, tabla 4). Este atributo también fue afectado por el daño foliar (tratamiento: $F_{1, 546} = 13.89$, $P = 0.0002$) para algunos estadios. Las plántulas con daño artificial tuvieron alturas similares a las plántulas control. En contraste, aquellas plantas juveniles y reproductivas que recibieron daño artificial tuvieron una altura en promedio de 11% y 3% menor a las plantas control, respectivamente (Fig. 15b).

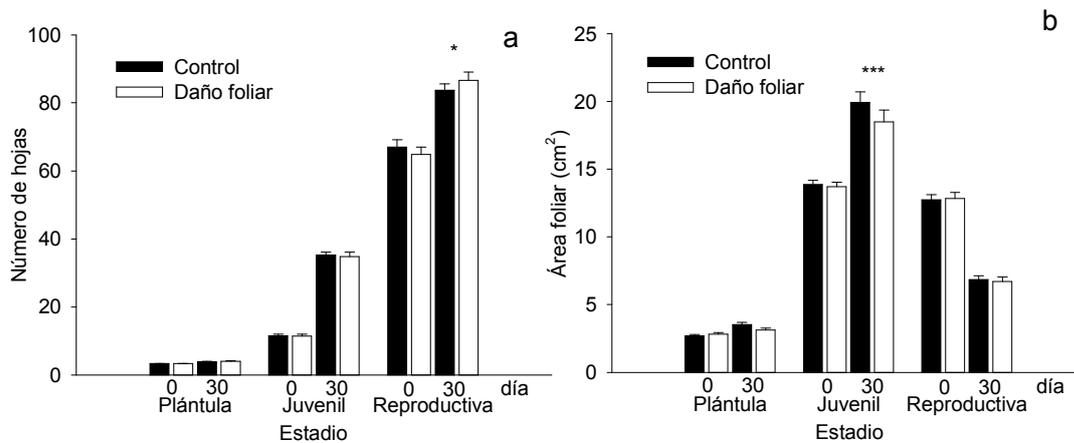


Figura 16. Valores promedio (\pm e. e.) de a) número de hojas y b) área foliar en cada medición y cada estadio ontogenético en plantas control y plantas sometidas a daño artificial de *Turnera velutina*, en los días 0 y 30 del experimento. El asterisco representan las diferencias significativas entre tratamientos (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

Las plantas aumentaron la producción de hojas durante su desarrollo (estadio: $F_{2, 542} = 172.48$, $P < 0.0001$, tabla 5), y el daño artificial no generó diferencia en la producción de hojas (tratamiento: $F_{1, 542} = 2.59$, $P = 0.1$) para ningún estadio ontogenético. Sin embargo, hubo un patrón no lineal del área foliar durante la ontogenia (Fig. 16b; estadio: $F_{2, 540} = 193.21$, $P < 0.0001$), con valores bajos para plántulas (3.1 cm²), valores tres veces mayores en las plantas juveniles (17.6 cm²), y valores 50% menores para las reproductivas (8.7 cm²). El daño artificial no tuvo un efecto significativo (tratamiento: $F_{1, 540} = 2.12$, $P = 0.14$) en plántulas y en plantas reproductivas, sin embargo, en las plantas juveniles no se observó este crecimiento compensatorio ya que el área foliar fue menor en plantas con daño (Fig. 16b).

Tabla 5. Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogenético, el tratamiento y la familia materna sobre el crecimiento en el número de hojas y el área foliar. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	Número de hojas			Área foliar		
	F/χ^2	g. l.	P	F/χ^2	g. l.	P
Estadio	172.48	2, 542	<.0001	193.21	2, 540	<.0001
Tratamiento	2.59	1, 542	0.10	2.12	1, 540	0.14
Familia	1.004	3	0.31	3.06	3	0.07
Estadio \times Tratamiento	1.93	2, 542	0.14	0.50	2, 540	0.60
Estadio \times Familia	17.06	6	0.009	34.21	6	<.0001
Tratamiento \times Familia	0.0002	3	1	0	3	1
Estadio \times Tratamiento \times Familia	1.84	10	0.99	0.12	10	1

Se observó que el ICC se triplicó durante el desarrollo de la planta (Fig. 17; estadio: $F_{2, 539} = 6.03$, $P = 0.002$, tabla 6), aunque no hubo un efecto del daño foliar para ningún estadio (tratamiento: $F_{1, 539} = 0.06$, $P = 0.80$).

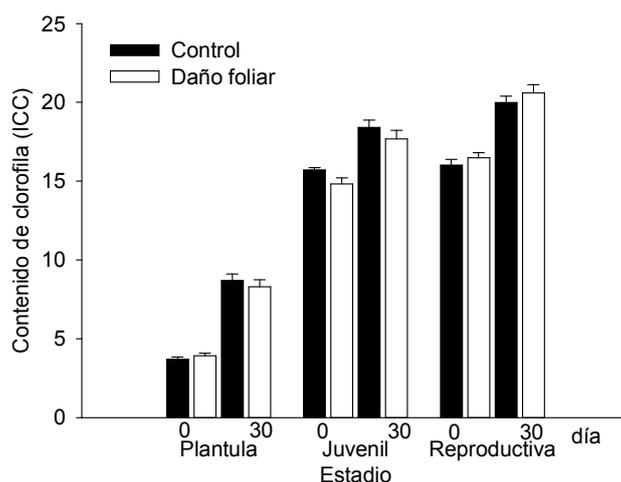


Figura 17. Índice de contenido de clorofila (\pm e. e.) en cada medición y cada estadio ontogenético en plantas control y plantas sometidas a daño artificial de *Turnera velutina*, en los días 0 y 30 del experimento.

Tabla 6 Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogenético, el tratamiento y la familia materna sobre el índice de concentración de clorofila. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	F/χ^2	g. l.	P
Estadio	6.03	2, 539	0.002
Tratamiento	0.06	1, 539	0.80
Familia	6.65	3	0.009
Estadio \times Tratamiento	0.55	2, 539	0.57
Estadio \times Familia	28.80	6	<.0001
Tratamiento \times Familia	0.73	3	0.86
Estadio \times Tratamiento \times Familia	0.57	10	1

Biomasa y asignación de recursos

Otro mecanismo que puede dar lugar a la tolerancia es la reasignación de recursos entre diferentes partes de la planta. La biomasa producida aumentó durante la ontogenia de la planta (Fig. 18; estadio: $F_{2, 409} = 1629.31$, $P < 0.0001$, tabla 7). Además, el daño foliar generó diferencias en los valores de biomasa entre estadios (interacción estadio \times tratamiento: $F_{2, 409} = 5.05$, $P = 0.006$, tabla 7). En las plántulas, los valores de biomasa total entre plantas con daño y sin daño no difirió significativamente (contraste *a priori*: $F_{1, 9} = 0.0008$, $P = 0.97$), indicando que las plántulas con daño compensaron la producción de biomasa. En las plantas juveniles y reproductivas la biomasa total producida fue menor en 16% al comparar con las plantas sin daño. Sin embargo, si consideramos sólo la biomasa foliar, las plantas juveniles y reproductivas con daño produjeron 23 y 47% más biomasa que las plantas sin daño, respectivamente, lo que puede interpretarse como una respuesta sobrecompensatoria. Estos resultados sugieren una reasignación de recursos de raíces a la producción de hojas.

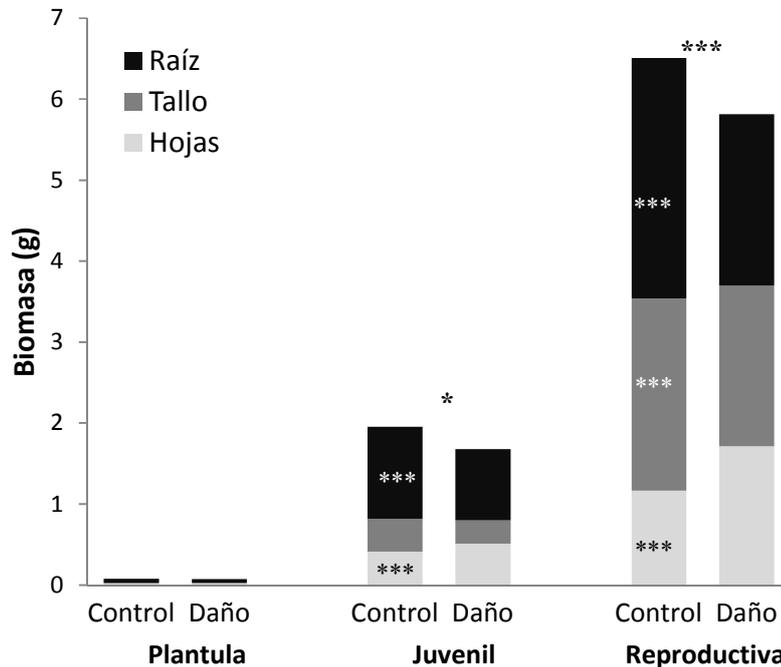


Figura 18. Biomasa total por estructura y por estadio ontogenético en plantas de *Turnera velutina* en el grupo control y el de daño artificial. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

Tabla 7. Análisis multifactorial del modelo mixto para determinar el efecto del estadio ontogenético, el tratamiento y la familia materna sobre la biomasa total y la proporción de la biomasa subterránea/aérea. Los valores de χ^2 están asociados al efecto aleatorio (familia materna).

Efecto	Biomasa			Subterránea/Aérea		
	F/χ^2	g. l.	P	F/χ^2	g. l.	P
Estadio	1629.31	2, 409	<.0001	28.61	2, 409	<.0001
Tratamiento	12.26	1, 409	0.0005	9.28	1, 409	0.0025
Familia	19.47	3	<.0001	17.98	3	<.0001
Estadio \times Tratamiento	5.05	2, 409	0.006	0.19	2, 409	0.82
Estadio \times Familia	26.70	6	0.0001	25.10	6	0.0003
Tratamiento \times Familia	0	3	1	0.72	3	0.86
Estadio \times Tratamiento \times Familia	2.52	10	0.99	2.88	10	0.98

Al considerar la proporción entre la biomasa aérea/subterránea como un indicador de dicha asignación de recursos, encontramos que la tendencia ontogenética es que las plántulas asignan más biomasa a la raíz y conforme la planta crece, la asignación a la parte aérea aumenta (estadio: $F_{2, 409} = 28.61$, $P < 0.0001$, tabla 7). El daño foliar tuvo un efecto significativo sobre la proporción de biomasa aérea/subterránea (tratamiento: $F_{1, 409} = 9.28$, $P = 0.002$, tabla 7). Las plantas que recibieron daño tuvieron valores mayores de esta relación, indicando que asignaron más recursos a la parte aérea, en comparación con las plantas sin daño; sin embargo, esta diferencia sólo fue significativa para las plantas juveniles y reproductivas (Fig. 19).

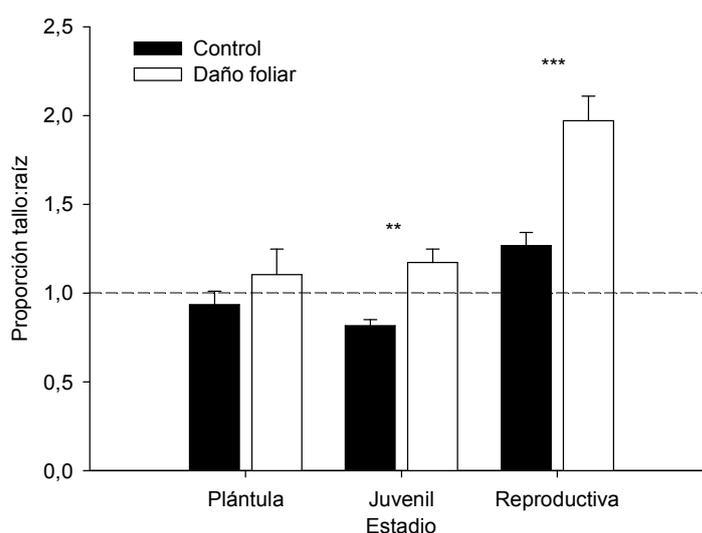


Figura 19. Proporción de biomasa subterránea/aérea (\pm e.) en plantas de *Turnera velutina* de tres estadios de desarrollo. Valores menores a uno indican mayor asignación a la parte subterránea; valores mayores a uno, una mayor asignación a la parte aérea, y valores similares a uno indican una igual proporción en la asignación de recursos. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre tratamientos (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Costos de las estrategia de defensa durante el desarrollo ontogenético

Encontramos que dos atributos defensivos tuvieron un costo reflejado en la biomasa, aunque solamente en estadios ontogenético particulares. En el estadio juvenil de seis hojas, la densidad de tricomas se relacionó negativamente con la biomasa, es decir, aquellas plantas que produjeron más tricomas tuvieron una menor biomasa en ausencia de daño (Fig. 20a). Por otro lado en las plantas reproductivas con frutos el costo se encontró en la producción de azúcar del néctar extrafloral (Fig. 20b).

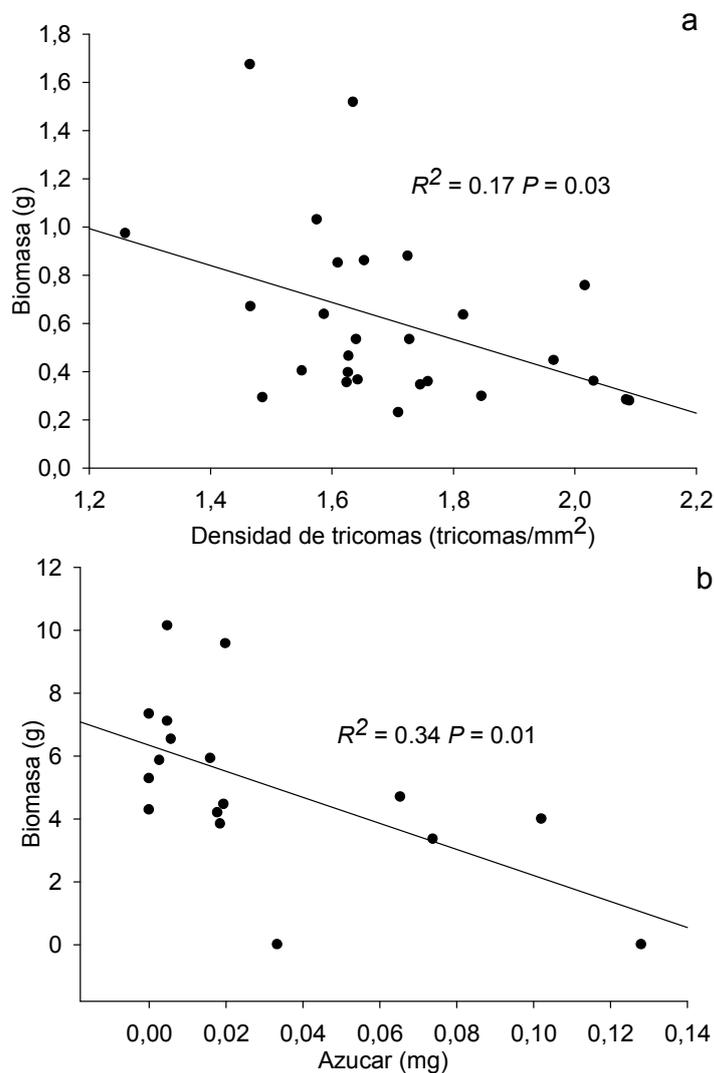


Figura 20. Relación entre la biomasa y a) la densidad de tricomas en plantas juveniles, y b) la producción de azúcar en plantas reproductivas de *T. velutina*. La línea representa la regresión y se muestra los valores de ajuste y significancia.

DISCUSIÓN

Éste es uno de los primeros estudios en reportar la existencia de trayectorias ontogenéticas simultáneas de múltiples atributos de resistencia y tolerancia en las plantas. Además se observaron patrones particulares para cada atributo estudiado. Se encontró que la mayoría los atributos de resistencia aumentaron durante el desarrollo (Fig. 21), coincidiendo con lo propuesto por la teoría de asignación de recursos (Herms y Mattson, 1992), donde conforme aumenta la cantidad de recursos disponibles con el desarrollo, la planta asigna una mayor cantidad de recursos para la defensa. En contraste, el contenido de agua en la hoja concuerda con la teoría de la defensa óptima (Bryant *et al.*, 1992), donde se favorecen niveles altos de defensa en estadios más atacados, que en *Turnera velutina* es el juvenil (Villamil, 2012). Ni el crecimiento compensatorio (Fig. 22) ni la defensa química (Fig. 21) se comportaron de acuerdo estas teorías, ya que ambos fueron más altos en las plántulas que en el resto de los estadios ontogenéticos.

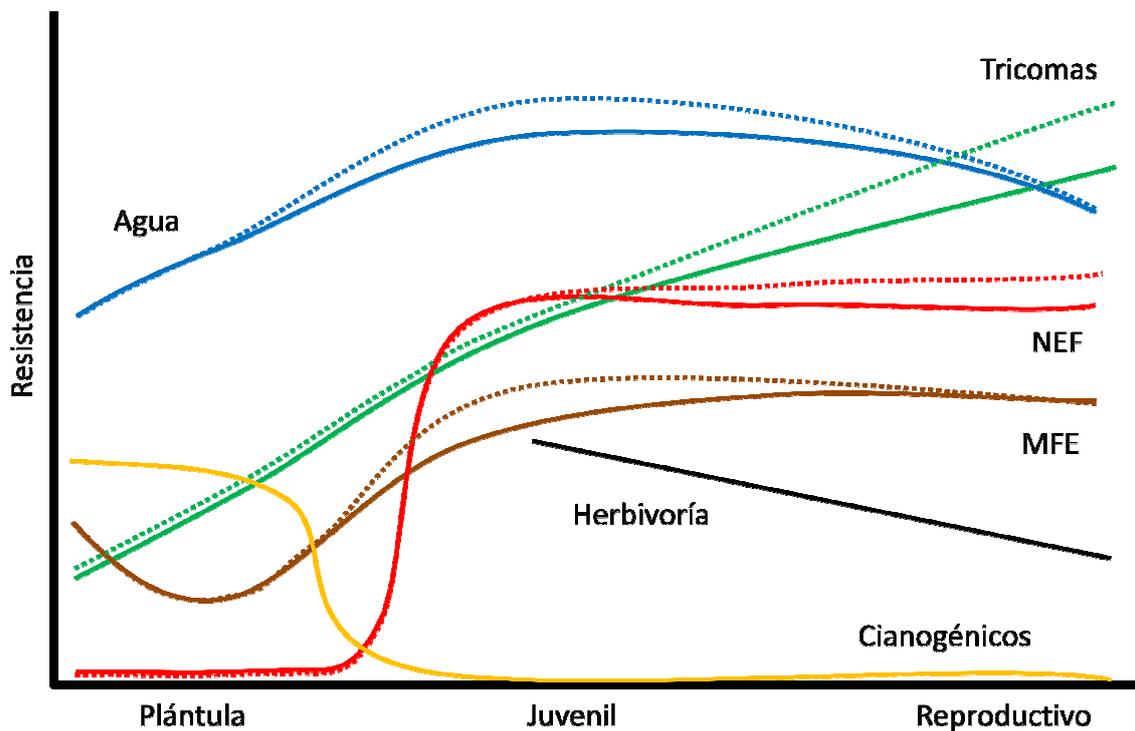


Figura 21. Síntesis de los patrones de las trayectorias ontogenéticas de los atributos de defensa estudiados en *Turnera velutina*: contenido de agua (azul), densidad de tricomas (verde), masa foliar específica (café), producción de HCN (amarillo) y producción de néctar extrafloral (rojo). Las líneas continuas muestran las trayectorias de las defensas constitutivas, mientras la línea punteada muestra las defensas inducidas. La línea negra representa el nivel de herbivoría encontrada en campo por Villamil (2012).

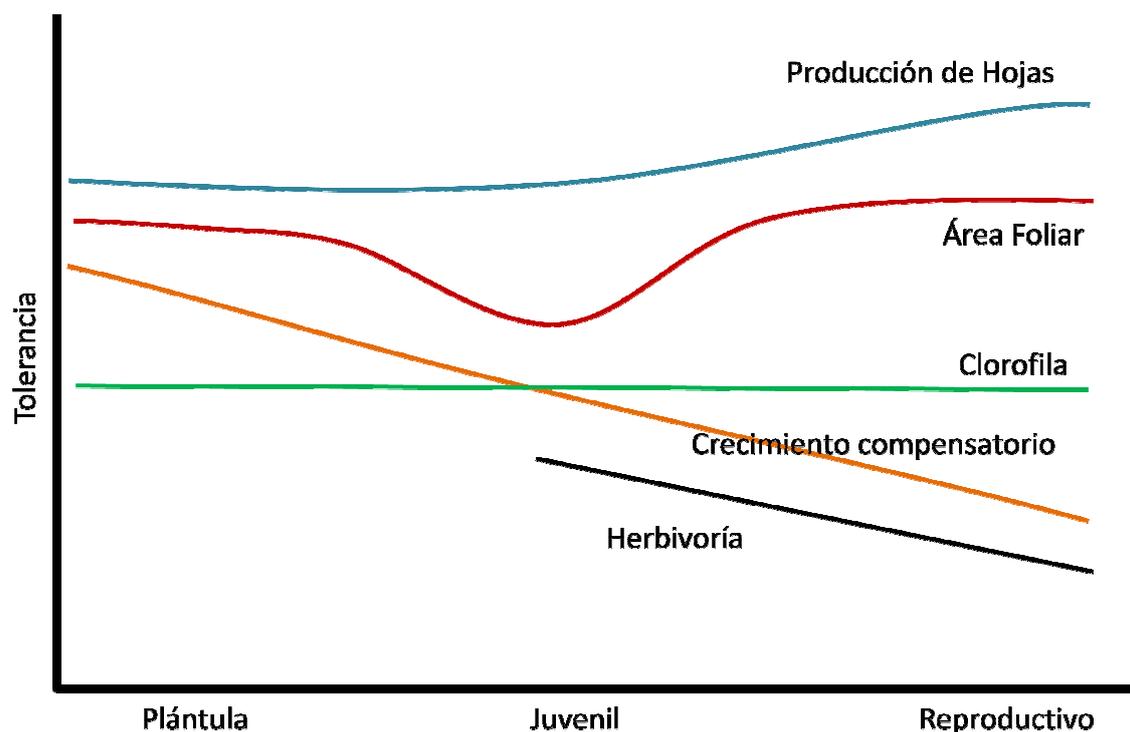


Figura 22. Síntesis de los patrones de las trayectorias ontogenéticas de los componentes de tolerancia en *Turnera velutina*: crecimiento compensatorio en altura, diámetro basal y biomasa total (naranja), producción de hojas (azul), área foliar (rojo) y contenido de clorofila (verde). La línea negra representa el nivel de daño por herbivoría encontrada en campo por Villamil (2012).

Retomando la propuesta de Boege y colaboradores (2007) podemos sugerir la presencia de switches ontogenéticos entre la resistencia y tolerancia en *T. velutina*. Lo que hace novedoso este trabajo es que distintos atributos de resistencia tienen trayectorias opuestas (Figs. 21 y 22). Las plántulas utilizaron como estrategias de defensa la producción de HCN y la tolerancia, las plantas juveniles tienen mayor producción de atributos de resistencia física, y las plantas reproductivas asignan tanto a resistencia física como biótica.

Trayectorias ontogenéticas de la defensa constitutiva

Defensa física

La densidad de tricomas como una medida de defensa contra los herbívoros ha sido previamente reportada (Woodman y Fernandes, 1991; Ågren y Schemske, 1993; Molles y Westoby, 2000; Valverde *et al.*, 2001; Kennedy, 2003; Molina-Montenegro *et al.*, 2006; Villamil, 2012), aunque también se ha visto relacionada con el balance de agua (Werker, 2000) y con la radiación solar excesiva (Levizou *et al.*, 2004). En *T. velutina*, se encontró

un patrón de aumento en la densidad de tricomas durante la ontogenia (Fig. 6). Este patrón podría ser explicado porque las plantas reproductivas tienen una mayor cantidad de recursos para asignar a esta función defensiva, en comparación con estadios anteriores cuya prioridad es el crecimiento. La variación genética de la densidad de tricomas entre poblaciones y entre familias ha sido reportada anteriormente (Valderde *et al.*, 2001; Handley *et al.*, 2005), sin embargo, este es el primer reporte de la variación genética de la trayectoria ontogenética de este tipo de defensa. Asimismo, existen otros estudios que reportan la heredabilidad de la densidad de tricomas (Park *et al.*, 1994) e incluso el mapeo de los genes que controlan este atributo (Wright *et al.*, 1999), lo cual sugiere que las trayectorias ontogenéticas en la producción de tricomas podrían ser blanco de la selección natural.

Se ha encontrado que hojas con altos valores de MFE son evitadas por los herbívoros en experimentos de preferencia, tanto en campo como en laboratorio (Poorter *et al.*, 2009), por lo que es adecuado utilizar este atributo como una medida de dureza. Se encontró una disminución de la dureza foliar en el estadio de plántula, con un posterior aumento en los estadios juvenil y reproductivo. Las plantas reproductivas tuvieron mayor MFE y menor contenido de agua por lo que sus hojas son de menor calidad nutricional y poco apetecibles a los herbívoros. Esto coincide con un menor daño foliar en plantas reproductivas en comparación con los demás estadios en una población natural (Villamil, 2012).

La masa foliar específica junto con el porcentaje de agua son parte de un conjunto de atributos interconectados que caracterizan la funcionalidad de la hoja y de la planta. Se ha encontrado que especies con baja MFE tienden a tener altas concentraciones de proteínas y minerales, un alto contenido de agua, un bajo contenido de lignina y de otros metabolitos secundarios, un alto metabolismo, (alta tasa fotosintética y respiratoria) y un tiempo de vida corto (Lambers y Poorter, 1992; Ryser, 1996; Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2004; Poorter *et al.*, 2009). Teniendo esto en cuenta, es importante explorar el funcionamiento de la hoja como un módulo que desempeña funciones de mantenimiento pero también de defensa, y como estos atributos al estar relacionados entre sí tienen influencia en sus trayectorias ontogenéticas.

En algunos estudios se ha relacionado el contenido de agua con la calidad nutricional de la planta (Bowers y Stamp 1992; Gaudet *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha observado para varios taxa una disminución del estado nutricional de las hojas conforme la planta crece, ya sea por influencia de la edad o por las correlaciones con otros cambios ontogenéticos en atributos fisiológicos y anatómicos de la hoja (Bowers y Stamp 1992; Gaudet *et al.*, 2001; Apple *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2005; Goodger *et al.*, 2006; Merilo *et al.*, 2009; Quintero y Bowers, 2012). En *T. velutina* se encontró una variación ontogenética correspondiente con un aumento del contenido de agua del estadio de cotiledón al juvenil y una posterior disminución hacia las plantas reproductivas.

Defensa química

La producción de ácido cianogénico como defensa contra herbívoros sólo se detectó en el estadio de plántula. Dado que las hojas de las plántulas no cuentan con defensas físicas y bióticas (Fig. 6-8), la producción de HCN en estadios tempranos le otorga a la planta una mayor protección contra los herbívoros. Esto coincide con lo reportado previamente por Schapert y Shore (1995) en un estudio realizado en Jamaica con 39 poblaciones de *Turnera ulmifolia*, una especie hermana de *T. velutina*, distribuidas a lo largo de la isla. Ellos encontraron que algunas de éstas las plántulas presentaban niveles mayores de cianogénesis en comparación con aquellas plantas en estadio reproductivo.

El patrón ontogénico de producción de HCN es contrario a la tendencia general encontrada para los metabolitos secundarios constitutivos (Barton y Koricheva, 2010), que propone un aumento en la producción de metabolitos secundarios conforme el desarrollo de la planta. Sin embargo, coincide con la trayectoria descrita para otras especies, por ejemplo la encontrada en *Raphanus sativus* (Boege *et al.*, 2007). Es necesario estudiar con detalle la ontogenia de la producción de HCN en *T. velutina* para permitirnos comprender su ausencia en estadios juvenil y reproductivo, y la variación geográfica en las trayectorias ontogenéticas de esta defensa (Schapert y Shore, 1995; Villamil, 2012).

Defensa biótica

La presencia de nectarios extraflorales como un atributo de defensa indirecta contra los herbívoros se ha reconocido ampliamente en más de 100 familias de helechos,

gimnospermas y angiospermas (Heil, 2011). Asimismo, se ha encontrado que un incremento en la secreción de néctar se relaciona con un aumento del número de hormigas que forrajean la planta, con una mayor sobrevivencia de las hormigas, y con una mayor actividad de las hormigas (Limburg y Rosenheim, 2001; Kost y Heil, 2005; Lach *et al.*, 2009).

El desarrollo de nectarios extraflorales en *T. velutina* comenzó a partir de la tercera hoja; ni los cotiledones ni las primeras hojas tienen estas estructuras. Una vez que las plantas alcanzaron el estadio juvenil se observó la producción de néctar extrafloral, aunque en cantidades muy bajas. En un estudio anatómico e histológico de *T. velutina*, se reporta que las plantas juveniles tienen nectarios extraflorales con una cutícula gruesa y una epidermis secretora uniestratificada, lo que genera una producción de néctar limitada. En contraste, las plantas reproductivas cuentan con una epidermis biestratificada con una cutícula adelgazada en la parte media, donde se encuentra el poro por el cual el néctar sale a la superficie (Villamil *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que los cambios ontogenéticos de la defensa biótica pueden estar asociados a limitaciones anatómicas y no simplemente a una limitación de recursos o de la cantidad de recompensa que una planta tiene que producir para ser visitada por sus mutualistas.

En *T. velutina* encontramos que la producción de néctar aumenta durante el desarrollo y este aumento está relacionado con la presencia de hormigas patrullando la planta, mejorando su sobrevivencia (Cuautle *et al.*, 2005). En otras plantas mimercofíticas, como *Cecropia peltata*, *Croton bonplandianum*, *Paulownia tomentosa* y *Solanum stramonifolium* también se ha encontrado que los nectarios y la producción de néctar aumentan durante la ontogenia de las plantas (Veena *et al.*, 1989 ; del Val y Dirzo, 2003; Falcao *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2008), lo que sugiere que las plantas requieren alcanzar cierta etapa de madurez antes de ser colonizadas o visitadas por hormigas, aludiendo a una limitación de recursos o de la cantidad de recompensas que una planta tiene que producir para ser visitada por sus mutualistas.

El aumento en la producción de defensas bióticas también puede estar relacionado con la protección de flores y semillas en las planta reproductivas por parte de los mutualistas (Falcao *et al.*, 2003). *Turnera velutina* interactúa con 25 especies de hormigas,

de las cuales 14 especies de hormigas no sólo forrajean los NEF, sino también son dispersoras de las semillas (Cuautle *et al.*, 2005). Es posible que una mayor producción de néctar en las plantas reproductivas sea necesaria para asegurar la presencia de los dispersores durante la producción de los frutos.

Trayectorias ontogenéticas de la defensa inducida

Se encontró que ante la presencia de herbivoría, los tres estadios analizados tuvieron una estrategia en común, el aumentar la densidad de tricomas, y probablemente para disminuir la calidad de las hojas como alimento para los herbívoros. Si bien la inducción de tricomas ha sido reportada previamente (Myers y Bazely, 1991; Agrawal 2000; Traw 2002; Traw y Dawson, 2002). Este es el primer reporte de cambios ontogenéticos en la inducibilidad de esta defensa.

Para los otros atributos de defensa física, el daño por herbivoría promovió un aumento en la masa foliar específica, pero únicamente en las plantas juveniles. Dado que un valor alto de MFE está relacionado con una menor palatabilidad del tejido foliar (Wright *et al.*, 2004; Poorter *et al.*, 2009), las plantas juveniles al carecer de otras defensas constitutivas podrían utilizar esta estrategia para minimizar el daño por herbívoros. Sin embargo, contrario a lo esperado, en este estadio el daño artificial provocó un aumento en el contenido de agua (Bowers y Stamp 1992; Gaudet *et al.*, 2001; Quintero y Bowers, 2012).

Independientemente de los ritmos endógenos de la planta, la secreción de los NEF puede ser inducida mediante daños mecánicos o por herbivoría (Heil *et al.*, 2000; Heil *et al.*, 2001; Heil, 2011); sin embargo, en *T. velutina* no se detectó un aumento en la producción de néctar asociado al daño artificial. Se debe remarcar que la medición se realizó en hojas producidas subsecuentemente al daño. Si ocurre la inducción en la producción de néctar es de respuesta más inmediata y en la hoja que sufrió el daño, esta puede ser una razón por la cual no se detectó la inducción de esta defensa indirecta. Alternativamente, la inducción podría requerir de algún componente de la saliva del herbívoro para estimular la producción de esta defensa biótica (Heil, 2011).

Trayectorias ontogenéticas en los mecanismos de tolerancia.

No todos los estadios ontogenéticos respondieron al daño foliar mediante crecimiento compensatorio. Sólo las plántulas dañadas crecieron lo mismo que las plantas sin daño para todos los atributos medidos, por lo que se puede considerar como las más tolerantes al daño. En contraste, las plantas juveniles y reproductivas no lograron compensar completamente, ya que las plantas dañadas tuvieron valores menores de diámetro y altura que las plantas control. Sin embargo, en términos de producción de hojas las plantas reproductivas fueron las únicas que el único que aumentaron la producción de hojas como respuesta al daño artificial. Este estadio cuenta con una mayor cantidad de recursos que pueden asignarse a diferentes funciones como la producción de flores, frutos y semillas. Dado que *T. velutina* produce las flores axilares que siempre están asociadas a hojas, una mayor producción de hojas podría estar asociada con la producción de más flores, y así mantener un nivel de adecuación similar al de plantas sin daño.

Las respuestas compensatorias en términos de área foliar también presentaron cambios asociados al desarrollo de las plantas. Aunque las hojas de las plantas juveniles fueron en promedio más grandes que las de plántulas y plantas reproductivas, disminuyeron su tamaño después del daño artificial.

Finalmente, las plantas juveniles y reproductivas que recibieron daño tuvieron una disminución en la biomasa producida. Sin embargo, observamos una reasignación de recursos hacia la producción de tallos y hojas, sobre todo en el estadio reproductivo. Lo cual era de esperarse, dado que existe un incremento en la proporción tallo/raíz a la par de una disminución del crecimiento durante el desarrollo de las plantas (Boege y Marquis, 2005). Además, las prioridades fisiológicas de las plantas cambian, y podemos suponer que en el caso de las plantas reproductivas, parte de los recursos se pueden utilizar para la producción de defensas, o para la reproducción.

La capacidad de tolerar el daño por herbivoría depende de la especie y del estadio ontogenético. Se ha reportado que en algunas especies las plántulas y juveniles son más tolerantes (Brandt y Lamb, 1994; Weltzin *et al.*, 1998; Stinchombe, 2002; Warner y Cushman, 2002; del Val y Crawley, 2005) y que emplean tanto el crecimiento compensatorio como medida para minimizar el efecto negativo de la herbivoría en la

adecuación (Stinchombe, 2002). En *T. velutina* las plántulas compensaron el tejido perdido y alcanzaron una biomasa final prácticamente igual a las plantas que no recibieron daño (Fig. 18). Contrario a los patrones de tolerancia propuestos por Boege y Marquis (2005) donde la etapa de cotiledón tiene una tolerancia alta. Los resultados de este trabajo indican que ésta disminuye durante la etapa juvenil y posteriormente aumenta conforme la planta se convierte en reproductiva. Es decir, se encontró que la tolerancia disminuye durante la ontogenia de *Turnera velutina*, siendo las plántulas las más tolerantes al daño y las reproductivas las menos tolerantes.

Se ha observado que la producción de un atributo de defensa puede generar la disminución en otro atributo (Koricheva *et al.*, 2004), e incluso se ha considerado que dentro de los atributos de defensa, la expresión de resistencia y tolerancia de manera simultánea puede ser redundante y mutuamente excluyente (Fineblum y Rausher, 1995). Sin embargo, también se ha propuesto que la selección natural puede favorecer la expresión de niveles intermedios de resistencia y tolerancia (Fornoni *et al.*, 2004) y combinaciones de varios atributos de resistencia (Agrawal, 2000). En este trabajo se demuestra que las plantas de *Turnera velutina* expresan combinaciones de atributos de defensa, pero que la identidad de dichas estrategias cambia durante la ontogenia. Mientras las plántulas expresan una estrategia mixta con la expresión simultánea de tolerancia (crecimiento compensatorio) y resistencia (HCN), plantas reproductivas expresan diversos atributos de resistencia (NEF y tricomas) y bajos niveles de tolerancia. El estadio menos defendido y más vulnerable parece ser el juvenil, ya que presentó niveles bajos de tolerancia y de resistencia, excepto por la dureza de sus hojas.

Costos de las estrategia de defensa durante el desarrollo ontogenético

La producción de defensas puede generar una disminución en la asignación de recursos para otras funciones, como el almacenamiento, lo que puede posteriormente puede generar un menor crecimiento de la planta, una menor producción de progenie, o una menor capacidad competitiva contra plantas vecinas (Herms y Mattson 1992, van Dam y Baldwin 1998, Agrawal *et al.* 1999, Zavala *et al.* 2004). Exploramos el costo de producción de defensas en función de la producción de biomasa, pero sólo los encontramos dichos costos para ciertos

atributos y en estadios ontogenéticos particulares. Estos resultados pueden reflejar la importancia de la limitación de recursos para la expresión de los costos de la defensa. El costo de producción de néctar en las plantas reproductivas sólo estuvo presente en plantas con fruto, lo que puede estar relacionado con una mayor demanda de recursos necesarios para la reproducción, ya que la planta requiere atraer los dispersores, o bien con el hecho de que las plantas en este estadio producen una recompensa adicional para las hormigas: los elaiosomas de sus semillas. Si bien el costo de los tricomas ya había sido reportado previamente (Ågren y Schemske, 1993, 1994; Elle *et al.*, 1999; Hare *et al.*, 2003; Hare y Elle, 2004), este es el primer estudio que reporta variación en dichos costos durante el desarrollo de las plantas. Para que este costo se exprese, es importante que exista cierta restricción en la disponibilidad de recursos en las plantas, ya que en sistemas agrícolas, que no tienen limitación de recursos, se ha encontrado una relación positiva entre esta defensa y el crecimiento de las plantas (Leimu y Koricheva, 2006). En este contexto, el estadio juvenil podría corresponder con la mayor limitación de nutrientes, ya que las plántulas cuentan con recursos provistos por la madre y las plantas reproductivas ya poseen suficientes recursos almacenados para poder invertir en más defensas.

Cabe resaltar que todos los atributos de defensa y tolerancia tuvieron variación genética entre familias, y si bien la mayoría tuvo patrones similares en la dirección de sus trayectorias ontogenéticas, para algunos atributos estos patrones difirieron (Fig. 13). El haber detectado la variación genética entre familias es un primer indicio para considerar que las trayectorias ontogenéticas podrían ser blanco de la selección natural; sin embargo, sería necesario demostrar que éstas poseen heredabilidad.

Turnera velutina y sus interactuantes son un sistema muy complejo, y es necesario conocer algunos de los vínculos entre éstos para comprender la dinámica del sistema de defensas, y de la ecología evolutiva de las interacciones en general. En particular aún desconocemos los componentes del néctar floral y extrafloral, lo que nos permitiría comprender mejor la relación que existe con las hormigas mutualistas y demás insectos que aprovechan este recurso. Asimismo, es importante conocer si esta composición cambia durante el desarrollo de la planta, lo que podría verse reflejado en un recambio de la comunidad de mutualistas durante la ontogenia (Palmer *et al.*, 2010). También falta

caracterizar la ontogenia de la cianogenesis en la planta, ya que sólo hemos detectado que las plántulas invierten recursos en esta costosa medida defensiva, mientras que parece desaparecer en las plantas reproductivas. Otra característica aún no analizada de esta planta es la capacidad de generar compuestos orgánicos volátiles ante el daño por herbivoría, y si éstos cambian ante diferentes tipos de daños o entre estadios de desarrollo de la planta.

Entre las incógnitas que quedan pendientes después de realizar este trabajo podemos destacar que no se sabe cuál es el efecto (directo o indirecto) que tiene la herbivoría en cada etapa de desarrollo de la planta sobre otras interacciones como la polinización o dispersión, ya que la presencia de volátiles generados por herbivoría pueden ahuyentar a polinizadores o modificar los componentes de las recompensas para la dispersión.

CONCLUSIONES

Este trabajo resume varios procesos clave para el estudio de las interacciones de las plantas. En primer lugar, respalda la propuesta que los atributos defensivos y de tolerancia cambian durante la ontogenia, así como la capacidad de inducir tributos de defensa. En segundo lugar, sugiere la presencia de “switches” ontogenéticos entre atributos, tipos de defensa o estrategias de resistencia. Finalmente, se reporta por primera vez la variación genética de las trayectorias ontogenéticas simultáneas de atributos defensivos y de tolerancia.

Las trayectorias de cada atributo defensivo tuvieron un patrón particular que fueron complementarias u opuestas entre sí. Estas trayectorias pueden ser la consecuencia de la combinación de procesos internos y externos, como la intensidad y frecuencia de los ataques por herbívoros, resultando en un incremento de la producción de defensas constitutivas conforme la planta crece. De igual manera, se encontró que el daño artificial no desencadenó la inducción de defensas por igual durante la ontogenia. Los atributos de defensa física sólo fueron inducidos en el estadio juvenil, mientras que las plantas reproductivas aumentaron la defensa biótica. Esto puede ser consecuencia de una mayor cantidad de recursos disponibles para asignarlos a la defensa. La tolerancia tuvo un patrón ontogenético opuesto, donde el estadio de plántula fue el más tolerante. En conjunto, estos resultados apoyan la idea de los *switches* ontogenéticos entre las diferentes estrategias para contrarrestar la herbivoría en respuesta a las prioridades fisiológicas de la planta en cada estadio.

Este trabajo es el primero en analizar de manera simultánea el cambio en la ontogenia de varios atributos de defensa física, química y biótica, así como componentes de la tolerancia, lo que permite tener una perspectiva más amplia del efecto de las interacciones que tienen las plantas de *Turnera ulmifolia* con sus diversos interactuantes. Además, el hecho de encontrar variación genética en las trayectorias ontogenéticas de la defensa y tolerancia se puede considerar como un indicio de que dichas trayectorias podrían estar sujetas a selección natural y, por lo tanto, ser un fenotipo complejo adaptativo.

REFERENCIAS

- Agrawal, A. A. 2000. Benefits and costs of induced plant defense for *Lepidium virginicum* (Brassicaceae). *Ecology* 81:1804–1813.
- Agrawal, A. A., S. Y. Strauss, y M. J. Stout. 1999. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. *Evolution* 53: 1093–1104.
- Ågren, J. y D. W. Schemsk, 1993. The cost of defence against herbivores: an experimental study of trichome production in *Brassica rapa*. *American Naturalist* 141:338–350.
- Ågren, J., y D. W. Schemske. 1994. Evolution of trichome number in a naturalized population of *Brassica rapa*. *American Naturalist* 143: 1–13.
- Alvarado-Cardenas, L. O. 2006. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 43 Turneraceae. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- 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-Wr. *Tree Physiology* 22:129–136.
- Arbo, M. M., 2005. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III Series Anomale y Turnera. *Bonplandia* 14(3-4):115-318
- Barrett, R. D. y A. 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* 30:37–51.
- Barton, K. E. 2007. Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs. *American Journal of Botany* 94:56–66.
- Barton, K. E. y J. Koricheva. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist* 175(4):481–493.
- Bergelson, J., y C. B. Purrington. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *American Naturalist* 148:536–558.
- Boege, K. 2005a. Herbivore attack in *Casearia nitida* influenced by plant ontogenetic variation in foliage quality and plant architecture. *Oecologia* 143:117–125.

- Boege, K. 2005b. Influence of plant ontogeny on compensation to leaf damage. *American Journal of Botany* 92(10): 1632–1640.
- 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.
- Boege, K., y R. J. Marquis. 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology and Evolution*. 20(8): 441–448.
- Bowers, M. D., y N. E. Stamp. 1992. Chemical variation within and between individuals of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Journal of Chemical Ecology* 18:985–995.
- Brandt, R. y R. Lamb. 1994. Importance of tolerance and growth rate in the resistance of oilseed rapes and mustards to flea beetle, *Phyllotreta cruciferae* (Goez) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Journal of Plant Science* 74:169–176.
- Bryant, J. P., P. B. Reichardt, T. P. Clausen, F. D. Provenza, y P. J. Kuropat. 1992. Woody plant-mammal interactions. En: G. A. Rosenthal y M. R. Berenbaum, Eds. *Herbivores: their interactions with plant secondary metabolites*. Academic Press, San Diego, CA. Págs. 344–371
- 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.
- Castillo, S. y P. Moreno-Casasola. 1998. Análisis de la flora de dunas costeras del litoral Atlántico de México. *Acta Botánica Mexicana* 45:55–80.
- Castillo-Campos, G. y M. E. Medina-Abreo. 2002. Árboles y arbustos de la reserva natural de La Mancha, Veracruz: Manual para la identificación de las especies. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz. 143 pp.
- Castillo-Campos, G., y A. C. Travieso-Bello. 2006. La flora. En: Moreno-Casasola, P. (Ed.) 2006. *Entornos veracruzanos: la costa de La Mancha*. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Ver. México. Págs. 171–204.
- Cuautle, M. 2004. Defensa y dispersión en *Turnera ulmifolia* (Turneraceae): Una aproximación multi-específica. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Ver. México. 100 pp.
- Cuautle, M. V. Rico-Gray y C. Díaz-Castelazo. 2005. Effects of ant behaviour and presence of extrafloral nectaries on seed dispersal of the Neotropical myrmecochore *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 86:67–77.

- 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(3):417–423.
- del Val, E y J. Crawley. 2005. Are grazing increaser species better tolerators than decreaseers? An experimental assessment of defoliation tolerance in eight British grassland species. *Journal of Ecology* 93(5):1005–1016.
- del Val, E. y R. Dirzo. 2003. Does ontogeny cause changes in the defensive strategies of the mymercophyte *Cecropia peltata*? *Plant Ecology* 169:35–41.
- Elias, T. S., W. R. Rozich y L. Newcombe. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. *American Journal of Botany* 62(6):570–576.
- Elle, E., N. M. van Dam, y J. D. Hare. 1999. Cost of glandular trichomes, a “resistance” character in *Datura wrightii* Regel (Solanaceae). *Evolution* 53: 22–35.
- Falcao, P. F., G. F. D. Melo-de-Pinna, I. R. Leal y J. S. Almeida-Cortez. 2003. Morphology and anatomy of extrafloral nectaries in *Solanum stramonifolium* (Solanaceae). *Canadian Journal of Botany* 81(8):859–864.
- Farnsworth, E. 2004. Hormones and shifting ecology throughout plant developmental Ecology 85(1):5–15.
- Fineblum, W. L., y M. D. Rausher. 1995. Evidence for a trade-off between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. *Nature* 377: 517–520.
- Fornoni, J., J. Núñez-Farfán, P. L. Valverde y M. D. Rausher. 2004. Evolution of mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution* 58(8): 1685–1695.
- Gama, L., H. Narave y N. Moreno. 1985. Turneraceae. En: V. Sosa (Ed.) *Flora de Veracruz* 74: 1–15.
- Gaudet, D. A., A. Laroche y B. Puchalski. 2001. Effect of plant age on water content in crowns of fall rye and winter wheat cultivars differing in snow mold resistance. *Canadian Journal of Plant Science* 81:541–550
- Gleadow, R. M. y I. E. Woodrow. 2002. Constraints on the effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. *Journal of Chemical Ecology* 28(7):1301–1313
- Goodger, J. Q. D., y I. E. Woodrow. 2002. Cyanogenic polymorphism as an indicator of genetic diversity in the rare species *Eucalyptus yarraensis* (Myrtaceae). *Functional Plant Biology* 29:1445–1452.

- Goodger, J., R. M. Gleadow y I. E. Woodrow. 2006. Growth cost and ontogenetic expression patterns of defence in cyanogenic *Eucalyptus* spp. *Trees* 20:757–765
- Handley, R., B. Ekbom y J. Ågren. 2005. Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecological Entomology* 30: 284–292.
- Hanley, M. E., M. Fenner y P. J. Edwards. 1995. The effect of seedling age on the likelihood of herbivory by the slug *Deroceras reticulatum*. *Functional Ecology* 9:754–759.
- Hare, J. D., E. Elle, y N. M. van Dam. 2003. Costs of glandular trichomes in *Datura wrightii*: a three-year study. *Evolution* 57:793–805.
- Hare, J. D., y E. Elle. 2004. Survival and seed production of sticky and velvety *Datura wrightii* in the field: a five-year study. *Ecology* 85: 615–622.
- Heil, M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16(4): 191–200.
- Heil, M., B. Fiala, B. Baumann y K. E. Linsenmair. 2000. Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology* 14:749–757.
- Heil, M., T. Koch, A. Hilpert, B. Fiala, W. Boland, y K. E. Linsenmair. 2001. Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *PNAS* 98(3):1083–1088.
- Hermes, D. A., y W. J. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology* 67:283–335.
- Holland, J.N., S. A. Chamberlain y K. C. Horn. 2009. Optimal defense theory predicts investment in extrafloral nectar resources in an ant-plant mutualism. *Journal of Ecology* 97(1):89–96.
- Ishida, A. y K. Yakaki, A. Lai Hoe. 2005. Ontogenetic transition of leaf physiology and anatomy from seedlings to mature trees of a rain forest pioneer tree, *Macaranga gigantea*. *Tree Physiology* 25:513–522.
- Jackson, B. D. 1953. *A Glossary of Botanic Terms*. Gerald Duckworth & Co. Ltd. 4a edición. 115 pp.
- Jogia, M.K., A. R. E. Sinclair y R. J. Andersen. 1989. An antifeedant in balsam poplar inhibits browsing by snowshoe hares. *Oecologia* 79:189–192.

- Karban, R. y I. T. Baldwin. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. Chicago University Press. 330 pp
- Karban, R. 1990. Herbivore outbreaks on only trees: testing hypotheses about aging and induced resistance. *Oikos* 59:27–32.
- Karban, R. y J. S. Thaler. 1999. Plant phase change and resistance to herbivory. *Ecology* 80(2):510–517
- Kearsley, M. J. C. y T. G. Whitham. 1989. Developmental changes in resistance to herbivory: Implications for individuals and populations. *Ecology* 70:422–434.
- Kennedy, G. G. 2003. Tomato, pest, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annual Review of Entomology* 48:51–72.
- Kobayashi, S., T. Asai, Y. Fujimoto y S. Kohshima. 2008. Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: Morphology, distribution, chemical constituents and changes during shoot and leaf development. *Annals of Botany* 101(7):1035–1047.
- Koricheva, J., H. Nykänen, y E. Gianoli. 2004. Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defenses: Are plants jacks-of-all-trades, masters of all? *American Naturalist* 163: E64–E75.
- Kost, C. y M. Heil. 2005. Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology* 6: 237–248.
- Lach, L. R., J. Hoobs, y J. D. Majer. 2009. Herbivory-induced extrafloral nectar increases native and invasive ant worker survival. *Population Ecology* 51(2): 237–243
- Lambers, H. y H. Poorter. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research* 23:187–261.
- Lehtila, K. 1999. Impact of herbivore tolerance and resistance on plant life histories. En: Vuorisalo, T. y P. Mutikainen Eds. *Life-history Evolution in Plants*. Kluwer Academic Publishers. Págs. 303–328.
- Leimu, R. y J. Koricheva. 2006. A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to herbivores: combining the evidence from ecological and agricultural studies. *Oikos* 112:1–9.
- Levizou, E., P. Drilias, G. Psaras y Y. Manetas. 2004. Nondestructive assessment of leaf chemistry and physiology through spectral reflectance measurements may be

- misleading when changes in trichome density co-occur. *New Phytologist* 165:463–472.
- Limburg, D. D. y J. A. Rosenheim. 2001. Extrafloral nectar consumption and its influence on survival and development of an omnivorous predator, larval *Chrysoperla plorabunda* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* 30(3): 595–604.
- Lindroth, R. L., J. R. Donaldson, M. T. Stevens, y A. C. Gusse. 2007. Browse quality in quaking aspen (*Populus tremuloides*): effects of genotype, nutrients, defoliation, and coppicing. *Journal of Chemical Ecology* 33:1049–1064.
- Marquis, R. J. 1992. Selective impact of herbivores. En Fritz, R. S. y E. L. Simms, Eds. *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, EE.UU. Págs. 301–325.
- Martínez, M. L., J. G. García-Franco y V. Rico-Gray. 2006. Las adaptaciones y las interacciones de especies. En: Moreno-Casasola, P. (Ed.) 2006. *Entornos veracruzanos: la costa de La Mancha*. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Ver. México. Págs.273–284.
- Mauricio, R., M. D. Rausher, y D. S. Burdick. 1997. Variation in the defense strategies of plants: are resistance and tolerance mutually exclusive? *Ecology* 78: 1301–1311.
- McNaughton, S. J. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos* 40:329–336.
- Merilo, E., I. Tulva, O. Raim, A. Kukit, A. Sellin y O. Kull. 2009. Changes in needle nitrogen partitioning and photosynthesis during 80 years of tree ontogeny in *Picea abies*. *Trees* 23:951–958
- Molina-Montenegro, M., P. Ávila, R. Hurtado, A. Valdivia y E. Gianoli. 2006. Leaf trichome density may explain herbivory patterns of *Actinote* sp. (Lepidoptera: Acraeidae) on *Liabum mandonii* (Asteraceae) in a montane humid forest (Nor Yungas, Bolivia). *Acta Oecologia* 30:147–150.
- Molles, A. T. y M. Westoby, 2000. Do small leaves expanded faster than large leaves, and do shorter expansion times reduce herbivore damage? *Oikos* 90:517–524.
- Moreno-Casasola, P. y Paradowska, K. 2009. Especies útiles de la selva baja caducifolia en las dunas costeras del centro de Veracruz. *Madera y Bosques*. 15(3):21–44.
- Moreno-Casasola, P., E. Van del Maarel, S. Castillo, M. L. Huesca e I. Pisanty. 1982. Ecología de la vegetación de dunas costeras: estructura y composición en El Morro de la Mancha, Ver. *Biotica* 7(4):569–575.

- Moreno-Cassasola, P., y A. C. Travieso-Bello, 2006. Las playas y las dunas. En: Moreno-Casasola, P. (Ed.) 2006. Entornos veracruzanos: la costa de La Mancha. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Ver. México. Págs. 205–220.
- Myers, J. H. y D. Bazely. 1991. Thorns, spines, prickles, and hairs: Are they stimulated by herbivory and do they deter herbivores? En: D. W. Tallamy y M. J. Raupp (Eds.) *Phytochemical Induction by Herbivores*. Wiley, New York, E. U. Págs. 325–344.
- Park, S. J., P. R. Timmins, D. T. Quiring y P. Y. Jui. 1994. Inheritance of leaf area and hooked trichome density of the first trifoliolate leaf in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal of Plant Science. Revue Canadienne de Phytotechnie*. 74(2):235–240.
- Palmer, T. M., D. F. 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.
- Pérez-Harguindeguy, N., S. Diaz, F. Vendramini, J. H. C. Cornelissen, D. E. Gurvich y M. Cabidoet. 2003. Leaf traits and herbivore selection in the field and in cafeteria experiments. *Austral Ecology* 28: 642–650.
- Poorter, H., U. Niinemets, L. Poorter, I. J. Wright y R. Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182:565–588.
- Quintero, C y M. D. Bowers. 2012. Changes in plant chemical defenses and nutritional quality as a function of ontogeny in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Oecologia* 168:471–481.
- Quintero, C. y M. D. Bowers. 2011. Plant induced defenses depend more on plant age than previous history of damage: implications for plant-herbivore interactions. *Journal of Chemical Ecology* 37:992–1001.
- R Development Core Team (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ramos-Castro, S. En prep. Determinación del componente genético de la media y la varianza en las señales y recompensas de las plantas y sus polinizadores. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM, México.
- Roy, B. A., y J. W. Kirchner. 2000. Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution* 54: 51–63.

- Ryser, P. 1996. The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. *Functional Ecology* 10: 717–723.
- Salazar-Rojas, B., V. Rico-Gray, A. Canto y M. Cuautle. 2012. Seed fate in the myrmecochorous Neotropical plant *Turnera ulmifolia* L., from plant to germination. *Acta Oecologica* 40:1–10.
- Salminen, J. P. y M. Karonen. 2011. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*. 25: 325–338.
- 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.
- Schappert, P. J. y J. S. Shore. 1999. Effects of cyanogenesis polymorphism in *Turnera ulmifolia* on *Euptoieta hegesia* and potential *Anolis* predators. *Journal of Chemical Ecology* 25(6):1455–1479.
- Schlichting, C. D. y M. Pigliucci. 1998. Phenotypic evolution. A reaction norm perspective. Sinauer Associates Inc. E. E. U. U. Págs. 60-66
- Scott, P. 2008. Physiology and behaviour of plants. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra. 305 pp.
- Simms, E. L., y J. Triplett. 1994. Costs and benefits of plant responses to disease: resistance and tolerance. *Evolution* 48: 1973–1985.
- Stinchcombe, J. R. 2002. Fitness consequences of cotyledon and mature-leaf damage in the ivyleaf morning glory. *Oecologia* 131:220–226.
- Strauss, S. Y., J. A. Rudgers, J. A. Lau, y R. E. Irwin. 2002. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 17:278–285.
- Strauss, S. Y., y A. R. Zangerl. 2002. Plant-insect interaction in terrestrial ecosystems. En: C. M. Herrera y O. Pellmyr (Eds.). *Plant-Animal Interactions: an Evolutionary Approach*. Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford. Págs. 77–106.
- Swihart, R. K. y J. P. Bryant. 2001. Importance of biogeography and ontogeny of woody plants in winter herbivory by mammals. *Journal of Mammalogy* 82:1–21.
- Thaler, J. S., S. H. McArt y I. Kaplan. 2002. Compensatory mechanisms for ameliorating the fundamental trade-off between predator avoidance and foraging. *PNAS*. 109(30): 12075–12080.

- Thomson, V. P., S. A. Cunningham, M. C. Ball y A. B. Nicotra. 2003. Compensation for herbivory by *Cucumis sativus* through increased photosynthetic capacity and efficiency. *Oecologia* 134:167–175.
- Tiffin, P. 2000. Mechanisms of tolerance to herbivore damage: what do we know? *Evolutionary Ecology*. 14:523–536.
- 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 Zoológica Mexicana* (nueva serie) 81:13–21.
- Travieso-Bello, A. C. y A. Campos. 2006. Los componentes del paisaje. En: Moreno-Casasola, P. (Ed.) 2006. Entornos veracruzanos: la costa de La Mancha. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Ver. México. Págs. 139–150.
- Traw, M. B. 2002. Is induction response negatively correlated with constitutive resistance in black mustard? *Evolution* 56: 2196–2205.
- Traw, M. B. y T. E. Dawson. 2002. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. *Oecologia* 131: 526–532.
- Turlings, T. C. J., J. H. Tumlinson, R. R. Heath, A. T. Proveaux y R. E. Doolittle. 1991. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology* 17(11): 2235–2251
- Valverde, P. L., J. Fornoni y J. Núñez-Farfán. 2001. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 424–432.
- van Bael, S.A., J. D. Brawn, y S. K. Robinson. 2003. Birds defend trees from herbivores in a Neotropical forest canopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:8304–8307.
- van Dam, N. M., y I. T. Baldwin. 1998. Costs of jasmonate induced responses in plants competing for limited resources. *Ecology Letters* 1:30–33.
- van Loon, J. J. A., J. G. de Boer y M. Dicke. 2000. Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 219–227.
- Venna, T., A. R. V. Kumar y K. N. Ganeshiah. 1989. Factors affecting ant (Formicidae: Hymenoptera) visits to the extrafloral nectaries of *Croton bonplandianum* Baill. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)* 98(1):57–64.

- Villamil Buenrostro, N. 2012. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa contra herbívoros en *Turnera ulmifolia*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 93 pp.
- Villamil, N., J. Márquez-Guzmán, y K. Boege. 2013. Understanding ontogenetic trajectories of indirect defence: ecological and anatomical constraints in the production of extrafloral nectaries. *Annals of Botany*. Part of a special issue on seedling herbivory.
- Wagner, G. 1991. Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiology* 96:675–679.
- Warner, P. J. y J. H. Cushman. 2002. Influence of herbivores on a perennial plant: variation with life history stage and herbivore species. *Oecologia* 132: 77–85.
- Weiner, J. 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 6(4):207–215.
- Weltzin, J. F., S. R. Archer y R. K. Heitschmidt. 1998. Defoliation and woody plant (*Prosopis glandulosa*) seedling regeneration: potential vs realized herbivory tolerance. *Plant Ecology* 138:127–135
- Werker, E., 2000. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical Research* 31:1–35.
- Woodman, G. W. y G. W. Fernandes. 1991. Differential mechanical defence: herbivory, evapotranspiration and leaf-hairs. *Oikos* 60:11–19.
- Wright, I. J., P. B. Reich, M. Westoby, D. D. Ackerly, Z. Baruch, F. Bongers, J. Cavender-Bares, F. S. Chapin, J. H. C. Cornelissen, M. Diemer, J. Flexas, E. Garnier, P. K. Groom, J. Gulias, K. Hikosaka, B. B. Lamont, T. Lee, W. Lee, C. Lusk, J. J. Midgley, M. L. Navas, Ü. Niinemets, J. Oleksyn, N. Osada, H. Poorter, P. Poot, L. Prior, V. I. Pyankov, C. Roumet, S. C. Thomas, M. G. Tjoelker, E. J. Veneklaas y R. Villar. 2004. The leaf economics spectrum worldwide. *Nature* 428:821–827.
- Wright, R. J., P. M. Thaxton, K. M. El-Zik y A. H. Paterson. 1999. Molecular mapping of genes affecting pubescence of cotton. *The Journal of Heredity* 90(1):215–219.
- Zavala, J. A., A. G. Patankar, K. Gase, y I. T. Baldwin. 2004. Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 1607–1612.