



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

Costos fisiológicos y ecológicos de la inducción del néctar extrafloral de

Turnera velutina

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. AUGUSTO ALONSO SALGADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. KARINA BOEGE PARÉ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. MARTIN HEIL, POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

DRA. EK DEL VAL DE GORTARI, CIECO, UNAM

MÉXICO, D.F., Enero del 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

Costos fisiológicos y ecológicos de la inducción del néctar extrafloral de

Turnera velutina

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. AUGUSTO ALONSO SALGADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. KARINA BOEGE PARÉ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. MARTIN HEIL, POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

DRA. EK DEL VAL DE GORTARI, CIECO, UNAM

MÉXICO, D.F., Enero del 2015

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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 18 de agosto de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **ALONSO SALGADO AUGUSTO** con número de cuenta **512013208** con la tesis titulada: "**COSTOS FISIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN LA INDUCCIÓN DEL NÉCTAR EXTRAFLORAL DE *Turnera velutina***", bajo la dirección de la **DRA. KARINA BOEGE PARÉ**:

Presidente: DR. ZENÓN CANO SANTANA
Vocal: DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
Secretario: DR. MARTIN HEIL
Suplente: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI
Suplente: DRA. EK DEL VAL DE GOTARI

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de noviembre de 2014.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos Institucionales.

Mi más amplio agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al proyecto PAPIIT IN2155010 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A mi tutora Dra. Karina Boege Paré por aceptarme en su grupo de trabajo por su comprensión y paciencia. A los miembros de mi comité tutor: Dra. Ek del Val de Gortari, al Dr. Martin Heil

Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres Aurea Salgado y Ramiro Alonso y a mi hermano Omar que han confiado en mí y en el camino que elegí.

A mi tía la Ing. Alejandra Salgado por su apoyo logístico durante el inicio y proceso de esta maestría.

A mi nueva familia en la rinconada de las Deidades, por abrirme los brazos, Francisco Guerra, Laura Paulina Osorio y Luis Osorio. Y a los nuevos inquilinos Christian Villaseñor y Adrian Romero.

A mis compañeros del Archipiélago de Revillagigedo: Tania (Wilson) y Cuauhtémoc, al Dr. Roger Guevara y al Dr. Juan Martínez del INECOL por esa aventura previa antes de empezar el posgrado.

Al Dr. Juan Fornoni, Dr. Zenón Cano y el Dr. Pedro Luis Valverde por sus oportunos comentarios para este proyecto.

A los miembros del INCEOL, Dra. Cecilia y por su apoyo en el morro de la Mancha, Adriana, Diana por acompañarme a la duna como buen camarada de campo de la BUAP y a Gibran Pérez por darme una cátedra de clasificación de hormigas. A los trabajadores de la estación CICOLMA: Enrique, Tacho, Héctor y Fernando.

A mis compañeros del laboratorio por todos los buenos momentos y por todo el apoyo y sobre todo las enseñanzas: Sofía, Vero, Blanca, Nora, Sergio, Diego, Luz, Violeta, Pale, Brenda, Fer, Paula, Lupita, Naye y Ana. En especial a Xochitl Damián por cuidar mis primeras plantas y a Itzel Lemus por las interminables horas de medición de néctar extrafloral.

A Itzel, por todo el camino recorrido junto a mí.

Con dedicatoria especial a mi mentora, un pilar en mi vida, por su carácter y por su amor al trabajo diario, a Mercedes García García, que su legado quede en la lucha y por todos aquellos mexicanos que buscan salir adelante.



ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Introducción.....	1
Objetivos.....	4
Hipótesis.....	4
Método.....	6
Resultados.....	15
Discusión.....	25
Conclusiones y perspectivas.....	31
Literatura citada.....	32
Anexos.....	39

RESUMEN

La defensa inducida consiste en el incremento de la respuesta defensiva de las plantas después de que se produce un daño por herbívoros o patógenos, y puede ocurrir mediante la expresión de defensas directas, aquellas que afectan directamente al herbívoro, o de defensas indirectas, aquellas que se basan en recompensar o atraer a depredadores y parasitoides para disminuir el efecto negativo de los herbívoros. El néctar extrafloral (NEF) es un tipo de defensa indirecta que atrae principalmente hormigas y puede ser inducido por el daño foliar. Sin embargo, no se ha descrito qué tipo de costos implica esta respuesta inducida en términos de la adecuación de una planta. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar los costos fisiológicos y ecológicos que se puedan presentar por la inducción del NEF usando a *Turnera velutina* como modelo de estudio, mediante la inducción del NEF con distintos métodos. Una vez comprobada la inducibilidad del NEF, se llevaron a cabo dos experimentos usando ácido jasmónico como emulador del daño para evaluar 1) los costos fisiológicos (directos), midiendo parámetros como el crecimiento, contenido de clorofila, néctar floral, polen y semillas; y 2) los costos ecológicos mediante un experimento con un diseño factorial de dos tratamientos: la inducción de NEF y el patrullaje de hormigas. Se encontró que el NEF es inducido por daño mecánico, daño por herbívoros generalistas y por la aplicación de ácido jasmónico. Para el primer experimento, se encontró que la inducción de NEF no tuvo un costo fisiológico en términos del contenido de clorofila, la cantidad de polen, el número de semillas o el néctar floral. Sin embargo, el crecimiento en términos de altura se vio afectado negativamente por la inducción de NEF, lo que sugiere un costo fisiológico. En el segundo experimento no se detectaron costos ecológicos de la inducción de NEF sobre la visita de polinizadores en campo. Estos resultados sugieren que el costo fisiológico en términos del crecimiento de *T. velutina* no se traducen en una afectación a las funciones reproductivas ni de la interacción con sus mutualistas polinizadores.

Palabras clave: *Inducción, defensas indirectas, néctar extrafloral, ácido jasmónico, costos ecológicos, costos fisiológicos.*

ABSTRACT

Induced defense is defined as the increase of defensive plant attributes after injury by herbivores or pathogens, which can be expressed as direct defenses, those that directly deter herbivores, or as indirect defenses, those that attract predators and parasitoids that reduce the herbivores density. The extrafloral nectar (NEF) is an indirect defense that primarily attracts ants and has been shown to be induced under different injury treatments. However, the physiological and ecological costs involved in its expression have not been described. For this reason, the main objective of this project was to assess if the induction of EFN has physiological and/or ecological costs. Using *Turnera velutina* as model study, the induction of its EFN was verified using different methods. Subsequently, two experiments were designed to assess 1) the physiological costs, measuring the consequences of NEF induction on parameters such as growth, chlorophyll content, floral nectar, pollen and seeds production; and 2) the ecological costs, through a factorial experiment in a natural population with NEF induction and ant patrolling treatments. Induction of NEF was promoted by mechanical and herbivore damage, and by jasmonic acid sprayed on leaves. Parameters such as chlorophyll content, pollen, seed number and floral nectar were not affected after NEF induction. However, growth was reduced in plants induced with jasmonic acid and this was interpreted as a physiological cost. No ecological costs were found in terms of pollinators visits to flowering plants in the field. This suggests that the physiological costs in terms of growth do not seem to be translated into reproductive effort and the interaction of *T. velutina* with its pollinators.

Key words: *Induction, indirect defense, extrafloral netcar, jasmonic acid, ecological cost, physiological cost*

Forma sugerida de citar: Alonso S. A., 2014. Costos fisiológicos y ecológicos de la inducción del néctar extrafloral de *Turnera velutina*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 39 p.

INTRODUCCIÓN

La defensa en plantas está constituida por cualquier atributo que confiere un beneficio en la adecuación de la planta en presencia de herbívoros o patógenos. Dichas estrategias de defensa han evolucionado como resultado de las interacciones entre las plantas y sus enemigos naturales, promoviendo la diversificación de especies, clados, comunidades, elementos bioquímicos y fitohormonas involucradas en este tipo de interacción (Agrawal *et al.*, 1999; Gatehouse, 2002; Dicke y Hilker 2003; Erb *et al.*, 2012). En las plantas se ha identificado un amplio repertorio de características tanto morfológicas como químicas que se consideran componentes de la defensa. Estas incluyen espinas, tricomas o metabolitos secundarios (*defensas directas*) y también pueden ser señales o recompensas para atraer a depredadores y parasitoides que afectan la acción negativa de los herbívoros (*defensas indirectas*; Price *et al.*, 1980). Ambas estrategias pueden presentarse de manera *constitutiva*, es decir, que se expresan constantemente, o bien, presentarse de forma *inducida* después del ataque de un herbívoro (Karban y Baldwin, 1997). En conjunto, ambos mecanismos forman una compleja red de defensas ante un amplio espectro de patógenos y herbívoros, regulando una red multiespecífica de interacciones asociadas al fenómeno de la herbivoría (Strauss e Irwin, 2004; Howe y Jander, 2008).

La defensa inducida puede afectar de manera significativa la relación con otros niveles tróficos en una comunidad cuando la respuesta involucra la inducción de defensas indirectas (Strauss e Irwin, 2004; Heil, 2010). Esto implica un aumento en la producción de recompensas o señales que atraen a organismos del tercer nivel trófico, como carnívoros o parasitoides (Price *et al.*, 1980; Agrawal, 1998). Una de estas recompensas es el néctar extrafloral (NEF; Koptur, 1992) que, a diferencia del néctar floral (NF), es secretado en la superficie glandular de los nectarios extraflorales (NEFs) que se localizan en las partes vegetativas (Elias, 1983). Los NEFs se expresan en ramas, hojas o tallos de al menos 100 familias de angiospermas, gimnospermas e incluso en helechos (Keeler, 2008). El NEF ha sido una recompensa mediadora en la historia evolutiva de las interacciones planta-hormiga, lo que se refleja en algunos clados completos que llegan a compartir esta característica (Agrawal, 2005; Marazzi *et al.*, 2013). En general la composición química del

NEF es poco variable, pero contiene cadenas de aminoácidos no proteicos y metabolitos secundarios que representan una fuente energética importante para las hormigas (Pancini y Nicolson, 2007). Y como cualquier atributo defensivo, el NEF también está sujeto a la expresión de los mecanismos de reconocimiento y la expresión de genes que activan las respuestas metabólicas (Arimura *et al.*, 2005; Kost y Heil 2008; Erb *et al.*, 2012).

Aunque los trabajos sobre inducción del NEF no son tan numerosos, son suficientes para comenzar a entender su papel adaptativo (Pulice y Packer, 2008). Por ejemplo, en *Gossypium herbaceum* (Malvaceae) se ha observado la inducción del NEF después de un ataque por herbívoros y daño artificial (Wäckers y Wunderlin, 1999; Wäckers *et al.*, 2001). Heil y colaboradores (2000; 2001), por su parte, han descrito un efecto significativo del daño mecánico y la aplicación externa de elicitores como el ácido jasmónico (AJ; ver en Creelman y Mullet, 1997) sobre la inducción del NEF en *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae). De manera similar, se ha encontrado que el daño artificial en *Prunus avium* (Rosaceae) genera respuestas en la producción del NEF y de NEFs (Pulice y Packer, 2008). Se observó también que el daño del lepidóptero *Ceratomia catalpae* (Lepidoptera: Sphingidae) sobre *Catalpa bignonioides* (Bignoniaceae) generó un aumento en tres distintos azúcares del NEF y en la visita de hormigas, en contraste con plantas no dañadas (Ness, 2003). Sin embargo, no sólo el daño y la amenaza del mismo mediante compuestos volátiles pueden generar la activación de la inducción, ya que su expresión depende de otros factores de la historia de vida de las plantas como, la ontogenia, y de las condiciones abióticas (Radhika *et al.*, 2010b; Bixenmann *et al.*, 2011; Kwok y Laird, 2012).

Durante la inducción de defensas puede haber múltiples respuestas sistémicas, incluyendo el NEF y otros atributos como compuestos volátiles, refugios, lugares de nidificación y recompensas alimenticias para organismos del tercer nivel trófico (Kessler y Baldwin, 2001; Heil y McKey, 2003; Heil, 2008). Por ejemplo, la inducción del NEF en *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) por la aplicación de AJ está acompañada de un aumento en la producción de compuestos volátiles. Estos compuestos volátiles a su vez pueden inducir la producción del NEF de plantas vecinas que no han recibido daño (Heil, 2004; Kost y Heil, 2008). Relacionado a esto el NEF también es una defensa con base en carbono que pueden requerir por los mismos elementos que otras funciones, como el crecimiento y la

reproducción, lo que podría generar un costo en la inducción del NEF (Radhika *et al.*, 2008). Podemos clasificar los costos en al menos dos tipos (Strauss *et al.*, 2002): los *fisiológicos* o directos, donde los recursos invertidos en la inducción de la defensa son a expensas de los recursos disponibles para otra función, como el desarrollo de partes reproductivas, incluso puede provocar la susceptibilidad a otros patógenos (Heil, 2002; Thaler *et al.*, 2002). Y los *costos ecológicos*, que ocurren cuando la inducción de la defensa tiene consecuencias negativas para la interacción de las plantas con especies mutualistas (Heil, 2002). Por ejemplo, la producción de defensas puede promover un retraso de la floración, lo que reduce la tasa de polinización (Strauss *et al.*, 2004).

De esta manera el valor adaptativo de la resistencia inducida depende de los costos y beneficios que la planta obtiene en la interacción antagonista con herbívoros y los integrantes del tercer nivel trófico (Heil y Baldwin, 2002; Strauss *et al.*, 2002). Sin embargo, se sabe más sobre la inducción de las defensas directas que sobre la inducción de las defensas indirectas, las cuales han sido poco estudiadas (Heil, 2010). Por ejemplo, se ha descrito en *Vicia faba* (Fabaceae) que la producción del NEF es dependiente de la cantidad de nutrientes, lo que sugiere un posible costo fisiológico de su inducción (Mondor *et al.*, 2006).

Por último y bajo estos criterios, en el presente trabajo se evaluaron los costos fisiológicos y ecológicos en la inducción del NEF usando como modelo a *Turnera velutina* (Passifloraceae), un arbusto endémico de México.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue conocer los costos asociados a la inducción del NEF de *T. velutina*. Se consideraron como objetivos particulares (1) determinar si existe una inducción del NEF como respuesta al daño foliar, y (2) evaluar los costos fisiológicos y ecológicos que esta inducción genera en *T. velutina*.

HIPÓTESIS

Las hipótesis de este trabajo son las siguientes:

a) Si *T. velutina* es capaz de inducir la producción del NEF, entonces habrá un aumento en la producción del mismo como respuesta al daño artificial, por herbívoros o ante la exposición al ácido jasmónico.

b) Si existen costos fisiológicos de la inducción del NEF, las plantas con mayor producción de esta recompensa tendrán menor adecuación en ausencia de daño por herbívoros.

c) Si existen costos ecológicos de la inducción del NEF relacionados con la polinización, las plantas que estén sujetas a inducción por un elicitor molecular tendrán menos visitas de polinizadores y, como consecuencia, menor adecuación en ausencia de daño por herbívoros.

Asimismo, se formulan las siguientes predicciones:

1. Los individuos de *T. velutina* que sean sometidos a un daño foliar natural o artificial, o bien, sean expuestos a ácido jasmónico presentarán un aumento en la producción y/o calidad del NEF en comparación de las plantas que no reciban estos tratamientos.

2. La inducción mediante la aplicación de ácido jasmónico tendrá un efecto similar al de un daño mecánico o natural.

3. En ausencia de daño por herbívoros y bajo condiciones de invernadero, los individuos de *T. velutina* inducidos aumentarán su producción de NEF, tendrán un

crecimiento reducido y un esfuerzo reproductivo menor en contraste con plantas no inducidas.

4. Los individuos de *T. velutina* de una población natural a los cuales se les provoque la inducción de la defensa producirán una cantidad menor de néctar floral, y como consecuencia, tendrán una tasa de visita de polinizadores menor en comparación con las que no fueron dañadas artificialmente. Esto tendrá consecuencias negativas en su éxito reproductivo, bajo condiciones naturales modificando la presencia de herbívoros.

MÉTODO

Sitio de estudio

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA) del Instituto de Ecología A. C., Veracruz, México (19° 35' N, 96° 22' W, <100 msnm; Moreno-Casasola *et al.*, 1982). La zona presenta un clima cálido subhúmedo con un régimen de lluvias de verano entre junio y septiembre; la temperatura media anual oscila entre 21°C en enero y 27.3°C en junio y la precipitación media anual es de 1286 mm (Travieso-Bello y Campos, 2006). La zona se encuentra bajo la influencia de los vientos alisios que aportan humedad y determinan la precipitación (Travieso-Bello y Campos, 2006). En el CICOLMA se han reportado más de once comunidades vegetales dentro de la estación de las cuales las mejor representadas son la selva baja caducifolia, la selva mediana subcaducifolia y las dunas costeras (Castillo y Travieso-Bello, 2006). Éstas últimas fue donde se realizó el trabajo de campo. Existen un total de 108 especies de hormigas asociadas con las especies vegetales que habitan en la región, la riqueza y diversidad de interacciones planta-hormiga es sumamente alta en comparación con otros sitios estacionales del país debido a los diversos microhábitats que se forman en este sitio (Martínez *et al.*, 2006).

Sistema de estudio

Turnera velutina Perls (Passifloraceae: Turneoideae) es una planta endémica de México que se distribuye en playas y dunas costeras, bosques tropicales caducifolios y en la selva baja espinosa, en altitudes de 0 a 1300 msnm (Arbo, 2009). Es un arbusto poliploide con flores que se producen todo el año, son homostilas y autocompatibles y cuenta generalmente con dos NEFs elípticos en la base del peciolo (Fig. 1A), aunque a veces existen de uno a dos nectarios extras en la lámina foliar (Gama *et al.*, 1985). Las flores son de forma axilar y miden entre 1.5 y 3 cm, son color amarillo y los pétalos se unen en la parte inferior formando un tubo o hipanto, presenta estambres insertos, ovario súper y los estigmas densamente fimbriados, la cantidad de flores varía de una a más de veinte y la antesis tienen una duración de un solo día (Arbo, 2005). Produce néctar extrafloral sobre todo en estadíos juvenil y reproductivo (Ochoa-López, 2013). Las semillas presentan

estructuras lipídicas llamadas elaiosomas que favorece la remoción y la dispersión principalmente por hormigas (Salazar-Rojas *et al.*, 2012). En la región de dunas costeras de CICOLMA *T. velutina* está asociada con gran diversidad de especies de hormigas que las visitan en comparación con las otras plantas mirmecofilas de la zona (Torres-Hernández *et al.*, 2000). La producción del NEF tiene influencia en la defensa biótica por hormigas, pues se ha descrito que las plantas que están asociadas a hormigas más grandes producen más frutos y reciben menos daño por herbívoros (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Cuautle *et al.*, 2005).

T. velutina ha sido referida en algunos trabajos previos como *T. ulmifolia* (Torres-Hernández *et al.*, 2000; Díaz-Castelazo y Rico-Gray 2004; Cuautle *et al.*, 2005). Esto se debe a que *T. velutina* siempre estuvo bajo el complejo de *T. ulmifolia* junto a otras diez variedades (Barret y Shore, 1987). Sin embargo, apoyado en trabajos morfológicos, cariológicos y taxonómicos estas variedades hoy en día se consideran especies diferentes (Alvarado-Cárdenas, 2006). Actualmente *T. velutina* se reconoce como una especie distinta de *T. ulmifolia* (Arbo, 2005).

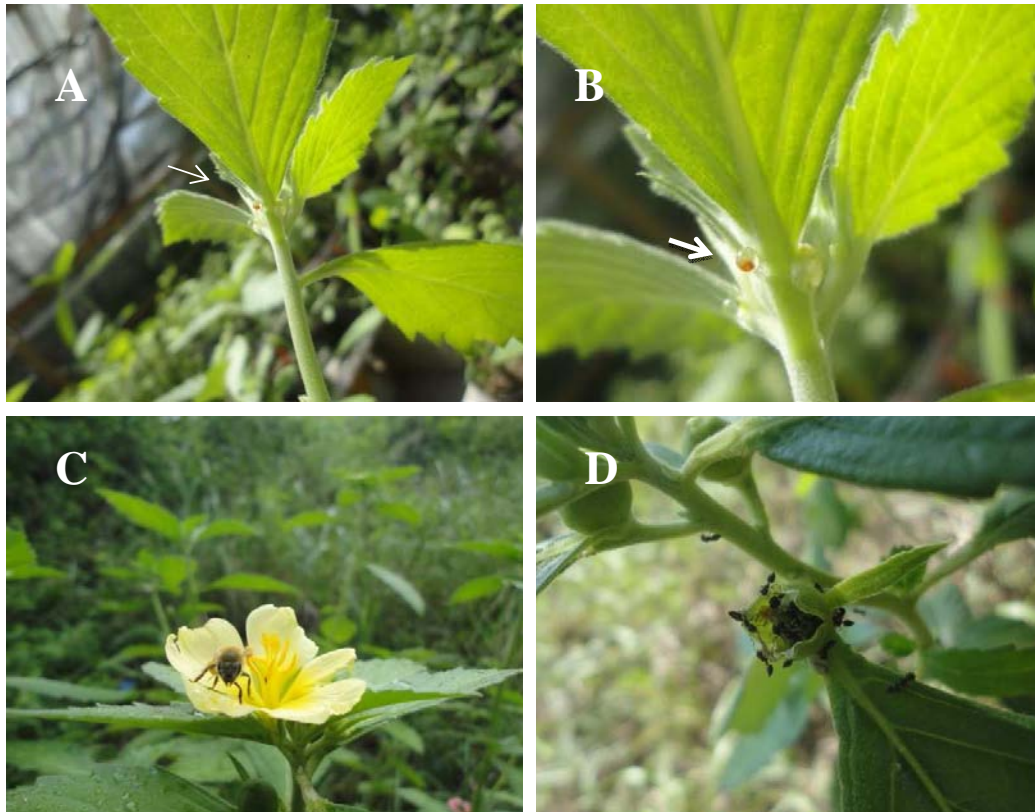


Figura 1. Estructuras de *T. velutina*. A) Localización de los nectarios extraflorales en la base del peciolo. B) NEF secretado por los NEFs. C) Flor abierta visitada por *Apis mellifera* (Hymenoptera). D) Hormigas del género *Crematogaster* recolectando semillas con elaiosomas en la duna costera de La Mancha, Veracruz.

Experimentos I y II: inducción del néctar extrafloral

Para evaluar la inducción del NEF en *T. velutina* se hicieron dos experimentos, uno a principios de diciembre del 2011 y otro en mayo del 2012, en los cuales se cuantificó la producción del NEF 24 h después aplicar distintos tipos de daño. Para ambos experimentos se obtuvieron plantas de *T. velutina* provenientes de semillas de la población establecida en el campo o de plantas mantenidas previamente en un invernadero. A estas semillas se les retiró el elaiosoma manualmente y se colocaron en germinadoras a una profundidad de 0.5 cm en una mezcla de tierra con agrolita en una proporción 1:1. Una vez germinadas se trasladaron a macetas de 2 L (Ochoa-López, 2013). Una vez que las plantas alcanzaron un juvenil, es decir, plantas con más de diez hojas sin estructuras reproductivas, se aplicaron cuatro tratamientos sobre una hoja, para detectar cuál de ellos producía una mayor inducción de NEF: 1) daño artificial con tijeras a un 50% aproximado del área foliar de una hoja (T); 2) daño al 50% de área foliar con alfileres (Al); 3) aplicación de ácido jasmónico a una concentración de 1 mM (AJ); 4) daño del 50 % del área foliar por el herbívoro generalista *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hs), y 5) plantas control a las que no se les aplicó ningún tratamiento (C) ($n = 22$ plantas por tratamiento). En todas las plantas los tratamientos fueron aplicados a una sola hoja apical (*hoja diana*). Una vez transcurridas 24 h de la aplicación de cada tratamiento, se registró el volumen de NEF durante el pico de producción (entre 11:00 y 13:00 h; Villamil, 2012). El volumen del NEF fue calculado con microcapilares (Blaubrand^{MR}) y con un vernier digital (Munitoty^{MR}). La longitud (mm) se transformó en volumen (μL) a partir de un volumen conocido para cada microcapilar. Dicha muestra se traspasó a un refractómetro (Leica^{MR}, 0 - 50 ° Brix) y observó la concentración de azúcares en grados Brix. La cantidad de azúcar se calculó obteniendo la cantidad en g del líquido ($[0.1 \times \alpha]/100 = \beta$), siendo α los microlitros de néctar. Posteriormente, se calculó la cantidad en g de azúcar ($[\text{Brix} \times \beta]/100$). En la hoja diana y en la hoja subsecuente se cuantificó el volumen del néctar y la producción de azúcar en los NEFs.

Para el segundo experimento se obtuvieron semillas provenientes de líneas familiares del invernadero (medios hermanos) y se redujo el número de tratamientos a tres ($n = 30$ plantas por tratamiento): 1) un grupo de daño al 50 % del área foliar de una hoja

con tijeras (T); 2) aplicación de ácido jasmónico a la hoja diana (AJ; 1 mM); 3) aplicación de 50% de daño causado por el herbívoro especialista *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) (ver Barret, 1978) (H), y 4) un grupo control que no recibió ningún daño (C). Posteriormente se cuantificó la cantidad y concentración de azúcar en el NEF de la misma manera descrita anteriormente. Estos experimentos también sirvieron para elegir el método más eficiente para inducir la producción del NEF en los experimentos subsecuentes.

Experimento III: inducción a través del tiempo

Para estimar la duración de la inducción del NEF se comparó la producción de NEF en plantas tratadas con AJ (1 mM) y en plantas control (n = 15), a 1, 3, 5 y 7 días posteriores a la inducción en todas las hojas que presentaran NEF, tomando como variable de respuesta la cantidad de mg de azúcar.

Experimento IV: costos fisiológicos

Para evaluar los costos fisiológicos de la inducción del NEF se realizó un experimento durante tres semanas en el que dos tratamientos fueron aplicados a plantas provenientes de semillas de campo germinadas en invernadero con el protocolo antes descrito: 1) un grupo experimental al cual se le aplicó ácido jasmónico en una sola ocasión (AJ), 2) un grupo experimental con tres aplicación cada semana de AJ en la misma hoja diana, junto con una remoción manual diaria del NEF, utilizando un capilar de 5 μ l (AJ+), y 3) un grupo control en el cual las plantas fueron rociadas con agua destilada (C). Los nectarios de todas las plantas fueron limpiados con agua un día antes de que iniciara el experimento. Los tratamientos fueron aplicados cuando las plantas que presentaron un botón floral mayor a un centímetro con coloración amarilla, al que se denominó *botón prefloral* (ver Tabla 1). Esto para asegurar que las plantas tuvieran flores al primer o segundo día de la inducción con ácido jasmónico. Previamente para probar si *T. velutina* es capaz de inducir nuevamente NEF se realizó un ensayo similar al experimento III, donde se le volvió aplicar AJ en el día 8 después de la primera aplicación tópica y se midió en el día 9 la inducción del NEF en mg de azúcar (ver anexos; Fig. A3).

Tabla 1. Actividades realizadas al inicio del experimento IV, el día cero siempre se consideró como día de aplicación de cada tratamiento y medición inicial de parámetros de crecimiento. Las pruebas se hicieron bajo condiciones de invernadero.

Inicio	Día de aplicación	Día de medición
Limpieza de nectarios	Medición de crecimiento.	Medición del NEF y NF
	Medición de clorofila.	Medición de clorofila
	Aplicación de Tratamientos:	Recolección de Estambres
	AJ, AJ+ y Control.	Polinización artificial

Previo a la aplicación de los tratamientos sobre la hoja diana se realizaron mediciones de altura, diámetro basal y se hizo un conteo de hojas de cada planta. La hoja diana se denominó como hoja 1 y se continuó la numeración de manera ascendente en las hojas nuevas. Se realizó una medición del Índice del Contenido de Clorofila (ICC) como un estimador indirecto de la tasa fotosintética (van der Berg, 2004), utilizando un fluorímetro portátil (CCM-200, Opti-Sciences^{MR}) en la hoja diana, las dos subsecuentes y las dos anteriores. A cada hoja se le hicieron cinco mediciones para calcular el valor promedio del ICC por hoja (en la zona apical, media y basal van der Berg, 2004; Damián, 2013). Este índice fue transformado siguiendo la ecuación obtenida por Damián (2013) para obtener la cantidad total de clorofila medida en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Al día siguiente de la aplicación de los tratamientos se midió nuevamente el ICC en las mismas hojas. Utilizando un microcapilar de 5 μl se cuantificó el volumen del néctar floral de todas las flores sin dañar el estilo ni las partes reproductivas femeninas. Se hizo una colecta de todos los estambres de cada flor y el polen fue guardado en un tubo Eppendorf con 1 ml de alcohol al 70% para su posterior cuantificación en el laboratorio. Finalmente, se polinizaron artificialmente las partes femeninas de cada flor con dos estambres de plantas ajenas al experimento.

Para estimar el total de azúcar producido en todos los NEFs de las plantas bajo los distintos tratamientos, se realizó una medición en los nectarios de todas las hojas de la planta. Con este fin se aplicaron 6 μl de agua destilada sobre cada nectario, utilizando una micropipeta. Posteriormente, se reabsorbió la mezcla con un microcapilar de 10 μl . Se cuantificó el volumen reabsorbido y se estimó la concentración en grados Brix. Este

procedimiento se repitió hasta que toda la azúcar fuera removida del nectario, según la lectura del refractómetro (0° Brix). Los valores de volumen y concentración fueron calculados para obtener un valor neto de mg de azúcar (Heil *et al.*, 2000; Stephenson, 1982). La medición del NEF se realizó en tres mediciones semanales, de manera simultánea con las mediciones de clorofila y crecimiento.

Para el conteo de polen se tomó una décima parte del total del polen almacenado en 1000 µl de etanol. Con este fin los tubos con el polen fueron agitados 1 min con un agitador tipo vórtex y se tomó una muestra de 100 µl (10%), la cual se colocó en un portaobjetos convencional para el conteo de granos de polen en el microscopio estereoscópico. Dicho conteo se multiplicó por 10 y se obtuvo un estimado del total de polen en la flor 1 y la flor 2. Debido a que *T. velutina* posee un número no mayor a 90 semillas por fruto (Torres-Hernández *et al.*, 2000) el conteo de semillas se pudo llevar a cabo de forma directa, únicamente considerando el primer fruto producido después del inicio del experimento (hoja 1).

Experimento V: costos ecológicos

Para evaluar los costos indirectos o ecológicos de la inducción del NEF sobre la visita de polinizadores y el patrullaje de hormigas, se realizó un experimento con un diseño factorial de 2×2 en una población de *T. velutina* establecida en la duna costera perteneciente a la estación de CICOLMA durante el mes de agosto del 2012. El experimento tuvo dos tratamientos con dos niveles cada uno: inducción de NEF (con y sin aplicación de AJ) y patrullaje de hormigas (presencia o ausencia). Este diseño produjo cuatro grupos de plantas: 1) plantas inducidas con AJ con presencia de hormigas (+AJ, +H), 2) plantas inducidas en ausencia de hormigas (+AJ, -H); 3) plantas no inducidas y sin hormigas (-AJ, -H), y 4) plantas no inducidas con patrullaje de hormigas (-AJ, +H); $n = 30$ por tratamiento. Para poder estimar las visitas de polinizadores simultáneamente en cada combinación de ambos tratamientos se seleccionaron al azar grupos de cuatro plantas a una distancia no mayor a 5 m. En cada grupo se aplicó aleatoriamente cada combinación de ambos tratamientos (uno en cada plantas). Para aislar a las hormigas en los tratamientos -H se utilizó una pasta pegajosa (Tanglefoot) en una cinta adhesiva en la base del tallo de la planta. Se realizó una

remoción manual de herbívoros en todos los tratamientos para evitar la inducción de defensas no controlada (Heil, 2002).

Las plantas fueron monitoreadas diariamente. para retirar herbívoros durante la mañana (7:00-10:00 h) y durante la tarde (16:00-19:00 h). Un ensayo previo realizado con plantas de *T. velutina* ajenas al experimento principal demostró que la remoción manual de los herbívoros por una semana redujo el daño foliar a menos del 5 % en contraste de plantas que no tuvieron remoción que fue mayor al 12 % (ANOVA: $F_{(1, 38)} = 67.72, p > 0.01$; ver anexos). Las malezas que permitieran el acceso a las hormigas a las plantas experimentales también fueron removidas continuamente. En el séptimo día se realizó la aplicación de AJ en los grupos de inducción en tres hojas que presentaran el botón prerreproductivo. Al día siguiente se observó la visita de polinizadores en los grupos de cuatro plantas durante 30 minutos en las flores abiertas a partir de las 7:00 y hasta las 9:00 h (Ramos-Castro, 2013). También se cuantificó el número de flores por planta para controlar las visitas por el despliegue floral de cada planta (Villamil, 2012).

Análisis estadísticos

La capacidad inductiva del NEF fue medida mediante la prueba Kruskal-Wallis en el Experimento I, ya que los datos no se ajustaron a los supuestos de normalidad. En el Experimento II los datos tuvieron un ajuste normal después de ser transformados con raíz cuadrada, por lo que se pudo realizar un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre tratamientos en el volumen y concentración de azúcar en el NEF de la hoja diana y la hoja subsecuente. Para estimar la duración de la inducción del NEF (Experimento III) se utilizó un modelo lineal general (MLG) tomando como covariable los días transcurridos después de la primera aplicación y se consideró el total del NEF de toda la planta. Para estimar los costos fisiológicos sobre parámetros del crecimiento (Experimento IV) se realizaron análisis de varianzas sobre la diferencia entre la altura final y la altura inicial en plantas bajo cada tratamiento. El efecto de los tratamientos sobre el NEF en las tres mediciones se calculó mediante un MLG de medidas repetidas, donde se tomó en cuenta la producción total de NEF por planta. El contenido neto de clorofila fue probado mediante un análisis de varianza con dos factores tomando en cuenta los tratamientos y las cuatro mediciones que se hicieron para ver ICC Los datos del NF fueron

transformados con la función logarítmica: $\log(x + 1)$ para el volumen y la raíz cuadrada en el contenido de azúcar para cumplir los supuestos de normalidad y se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas para las flores de la hoja 1, 2 y 3. Finalmente, los componentes de adecuación masculina (polen) se analizaron tomando en cuenta las flores de las hojas 1 y 2 después de la aplicación de AJ en todos los tratamientos y la adecuación femenina (semillas) para el fruto de la hoja 1 mediante análisis de la varianza. Las estimaciones de los costos ecológicos de la inducción del NEF (Experimento V) se basaron en el índice de visita por el número de flores de cada individuo (número de visitas/número de flores) y se utilizó un análisis de varianza de dos vías, considerando la inducción y la presencia de hormigas como variables explicativas (Aquí unos te pusieron explícitas otros explicativas, tu corrige cual es) del número de visitas de polinizadores (variable de respuesta). Para todas las pruebas se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM Corp. Released, 2011).

RESULTADOS

Experimento I y II: inducción del néctar extrafloral

Se encontró un incremento en el volumen del NEF con respecto al grupo control de 471% en el grupo dañado con alfiler (Al), 884% para el daño con tijeras (T), 590% para el daño con *S. frugiperda* (Hs) y 668% para la aplicación de AJ (Kruskal-Wallis: $H_{(4, N=110)} = 31.37$; $p < 0.01$; Fig. 2).

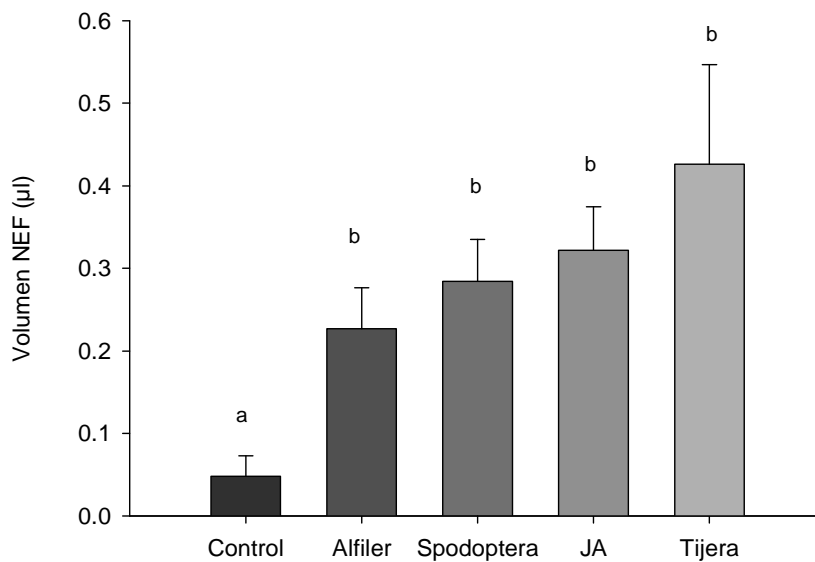


Figura 2. Volumen ($\mu\text{l} \pm \text{e.e.}$) del néctar extrafloral (NEF) producido 24 h después de la aplicación de los cinco tratamientos en la hoja diana y la subsecuente de *Turnera velutina*. (C) plantas control a las que no se les aplicó ningún tratamiento; (Al) daño del 50 % del área foliar con alfileres; (Hs) daño del 50 % del área foliar por el herbívoro generalista *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae); (AJ) aplicación de ácido jasmónico a una concentración de 1 mM y (T) daño del 50 % del área foliar con tijeras Experimento llevado a cabo en Diciembre del 2011 ($n = 22$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0.05$ (prueba de Kruskal-Wallis).

La producción de azúcar aumentó del 510% en AI, 971% en T, 626% (Hs) y 748% con la aplicación de AJ en comparación del grupo control (Kruskal-Wallis: $H_{(4, N=110)} = 28.19$; $p < 0.01$; Fig. 3).

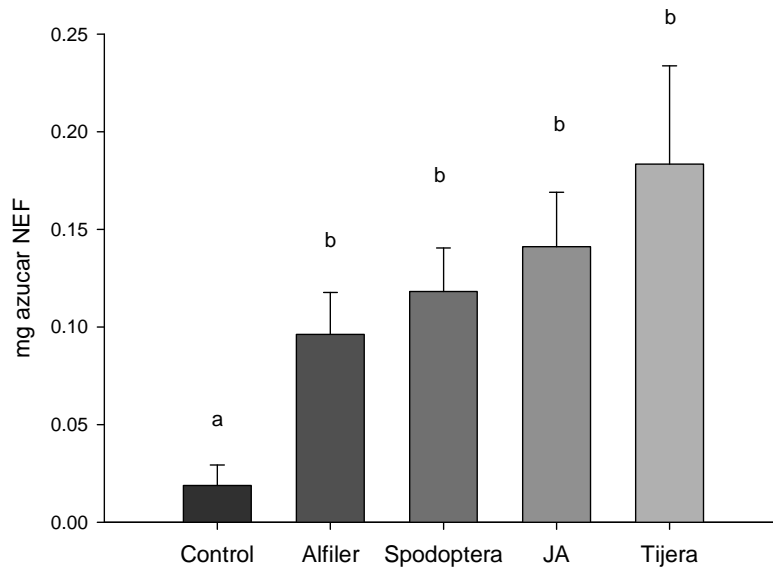


Figura 3. Contenido de azúcar (mg \pm e.e) del néctar extrafloral (NEF) producido 24 h después de la aplicación de los cinco tratamientos en la hoja diana y la subsecuente de *Turnera velutina*. (C) plantas control a las que no se les aplicó ningún tratamiento; (AI) daño del 50 % del área foliar con alfileres; (Hs) daño del 50 % del área foliar por el herbívoro generalista *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae); (AJ) aplicación de ácido jasmónico a una concentración de 1 mM y (T) daño del 50 % del área foliar con tijeras Experimento llevado a cabo en Diciembre del 2011 ($n = 22$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0.05$ (prueba de Kruskal-Wallis).

En el Experimento II se observó un efecto inductivo sobre el volumen del NEF ($F_{(3, 116)} = 3.62$; $p = 0.01$; Fig. 4). Los tratamientos que difirieron significativamente sobre el grupo control fueron el daño con tijeras y con *E. hegesia* pero no la inducción con ácido jasmónico.

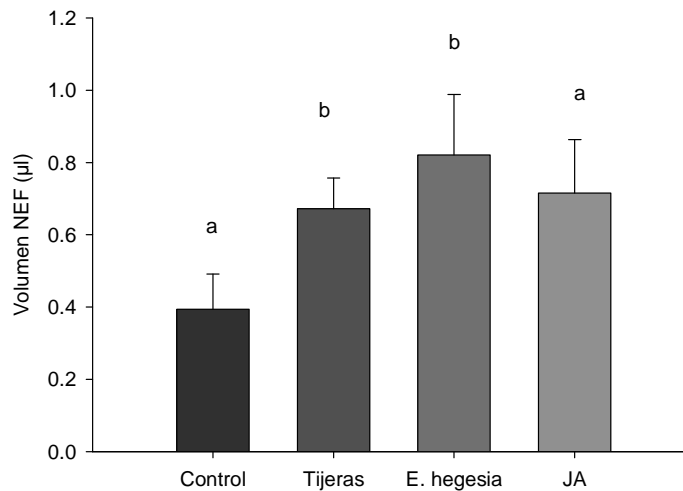


Figura 4. Volumen ($\mu\text{l} \pm \text{e.e}$) del néctar extrafloral (NEF) producido 24 h después de la aplicación de cuatro tratamientos en la hoja diana y la subsecuente de *Turnera velutina*. (C) plantas control a las que no se les aplicó ningún tratamiento; (T) daño del 50 % del área foliar con tijeras; (Hs) daño del 50 % del área foliar por el herbívoro especialista *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) y (AJ) aplicación de ácido jasmónico a una concentración de 1 mM y Experimento llevado a cabo en Mayo del 2012 ($n = 30$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

La producción de azúcar se incrementó un 170% para T, 224% para H y 164 % para AJ con respecto al grupo control ($F_{(3, 116)} = 3.38$; $p = 0.02$; Fig. 5).

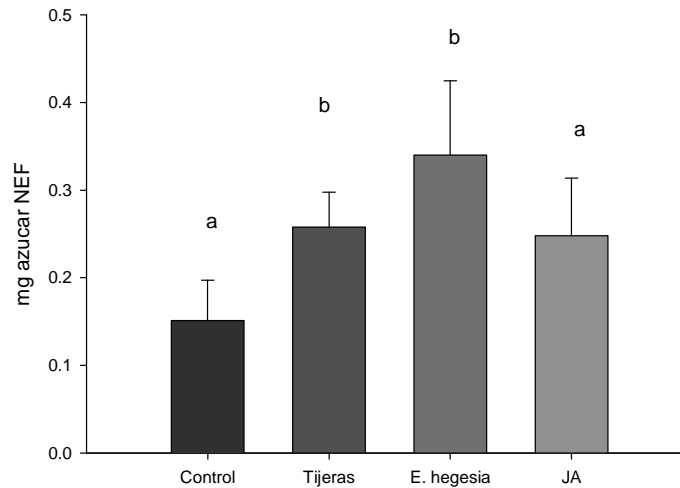


Figura 5. Contenido de azúcar ($\text{mg} \pm \text{e.e}$) del néctar extrafloral (NEF) producido 24 h después de la aplicación de cuatro tratamientos en la hoja diana y la subsecuente de *Turnera velutina*. (C) plantas control a las que no se les aplicó ningún tratamiento; (T) daño del 50 % del área foliar con tijeras; (Hs) daño del 50 % del área foliar por el herbívoro especialista *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae) y (AJ) aplicación de ácido jasmónico a una concentración de 1 mM y Experimento llevado a cabo en Mayo del 2012 ($n = 30$). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0.05$ (prueba de Tukey).

Experimento III: Inducción del NEF a través del tiempo

Se encontraron diferencias significativas en el contenido azúcar (mg) del NEF producido por las plantas dependiendo de su tratamiento. Las plantas control presentaron menor cantidad de azúcar en el NEF que las plantas expuestas a AJ ($F = 8.57$; $p < 0.01$; $n = 15$; Fig. 6). Se encontró un efecto del tiempo sobre el contenido de azúcar en el NEF ($F = 14.32$, $p > 0.01$, Fig. 6), al tercer día después de la aplicación de AJ la cantidad de azúcar (mg) en el NEF disminuye, perdiéndose el efecto inductivo al quinto y séptimo día. También se encontró un efecto significativo de la interacción tiempo \times tratamiento ($F = 4.81$; $p = 0.03$; Fig. 6).

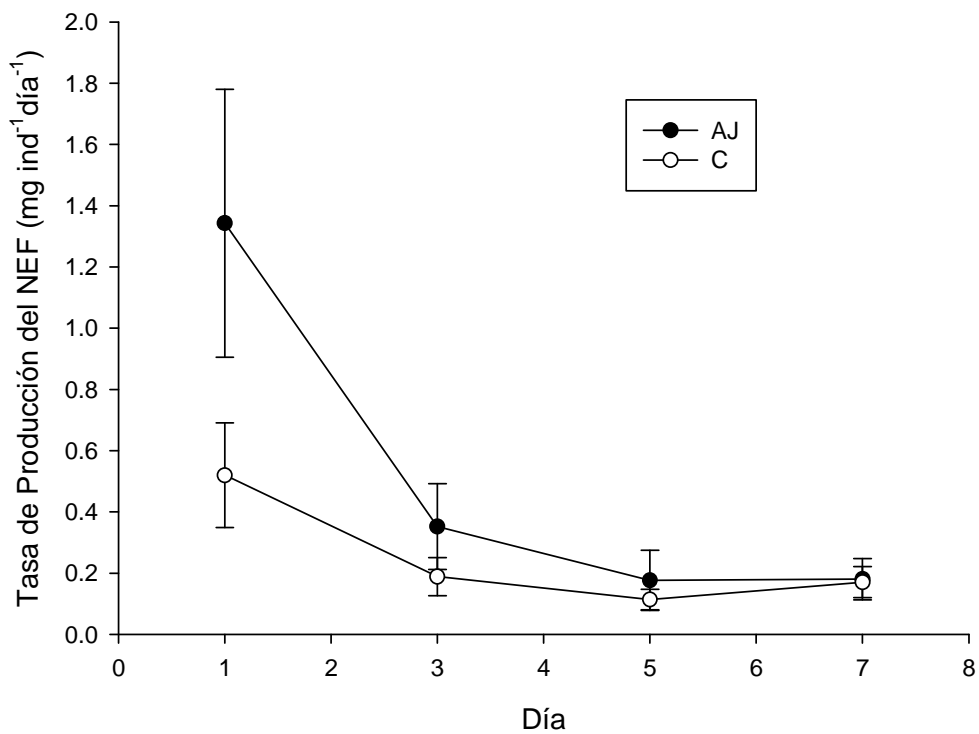


Figura 6. Contenido de azúcar (mg \pm e.e) en el néctar extrafloral de *T. velutina* en diferentes días de la semana posterior a la aplicación de ácido jasmónico (AJ) en comparación con las que tienen plantas control (C) ($n = 15$).

Costos fisiológicos

Néctar extrafloral

No se encontró un efecto significativo del tratamiento pero si del tiempo ($F = 15.03$, $p < 0.01$; Fig. 7) y de la interacción tiempo \times tratamiento ($F = 4.301$; $p = 0.02$; Fig. 7). En general hubo inducción por AJ sobre la cantidad de mg de azúcar en los tratamientos AJ y AJ+. En promedio, la magnitud de inducción fue de 140 a 162% a las 24 h de la aplicación de AJ (semana 1), mientras que se encontró pérdida del 42% cuando el NEF fue removido diariamente en el tratamiento AJ+ en la semana 2 con respecto al grupo control. En la última medición se encontró una pérdida del 24.8 al 27.7 % con respecto al control.

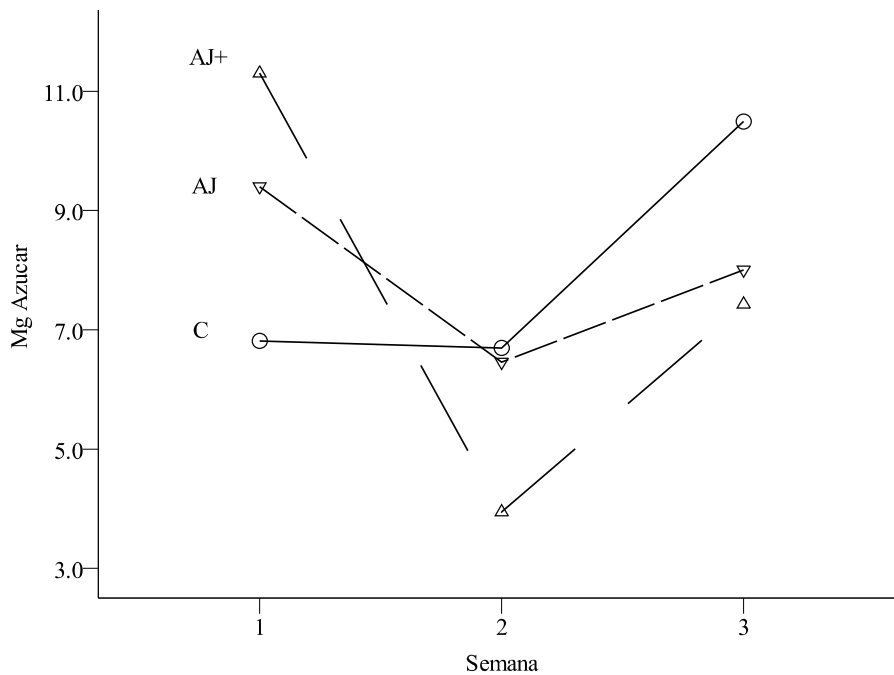


Figura 7. Contenido de azúcar en el néctar extrafloral de *Turnera velutina* durante 3 semanas consecutivas por efecto de dos tratamientos de aplicación de ácido jasmónico (J y J+) respecto a plantas control (C). La semana 1 corresponde a las 24 h después de la inducción mediante AJ. El tratamiento AJ únicamente contó con una aplicación inicial, en tanto que el tratamiento AJ+ tuvo una remoción diaria de NEF y se le aplicó tres veces AJ previo a la medición una vez por semana ($n = 25$).

Crecimiento

Se encontró un efecto del tratamiento sobre el incremento en altura de *T. velutina* (ANOVA: $F_{(2, 70)} = 8.86$, $p < 0.01$; Fig. 8). El tratamiento AJ+ fue significativamente diferente de los otros dos tratamientos. Ambos tratamientos de inducción con ácido jasmónico tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de *T. velutina*, dado que en ausencia de inducción las plantas crecieron un 56.8% más que las plantas del tratamiento AJ+.

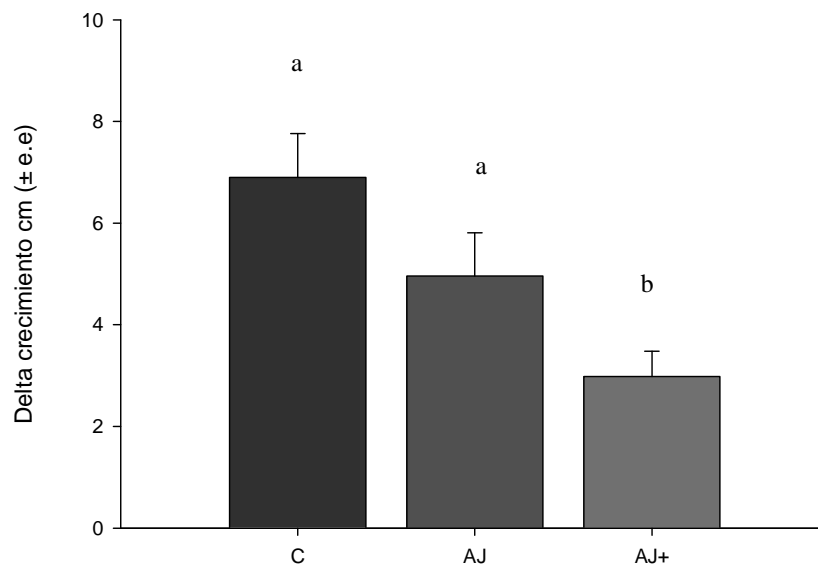


Figura 8. Delta crecimiento en cm (\pm e.e) de los tres tratamientos de *T. velutina*, sin aplicación de AJ (C); con una aplicación inicial de ácido jasmónico (AJ) y tres aplicaciones semanales más una remoción manual de NEF (AJ+; $n = 25$).

Néctar floral

No se encontró un efecto del tratamiento de inducción ($F_{(2, 71)} = 0.78, p = 0.46$; Fig. 9), pero sí de la secuencia de hoja ($F_{(2, 142)} = 22.18, p < 0.01$; Fig. 9) en la producción en volumen de néctar floral.

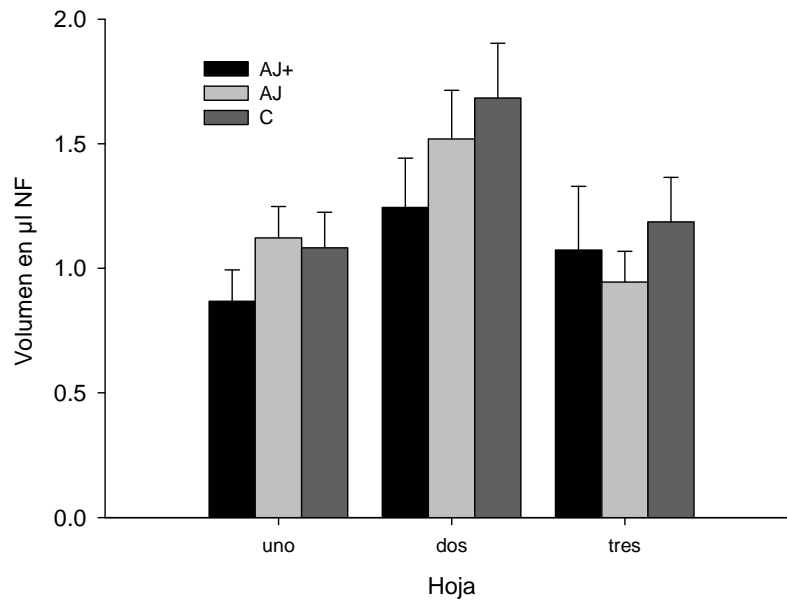


Figura 9. Volumen de néctar floral ($\mu\text{l} \pm \text{e.e}$) producido en función de la secuencia de flores y de los tratamientos de inducción después de la primera aplicación. Ver Métodos ($n =$)

Asimismo, tampoco se encontró un efecto del tratamiento de inducción ($F_{(2, 69)} = 1.07, p = 0.34$ Fig. 10), pero sí de la secuencia de hoja en su contenido de azúcar ($F_{(2, 238)} = 18.55, p < 0.01$; Fig. 10).

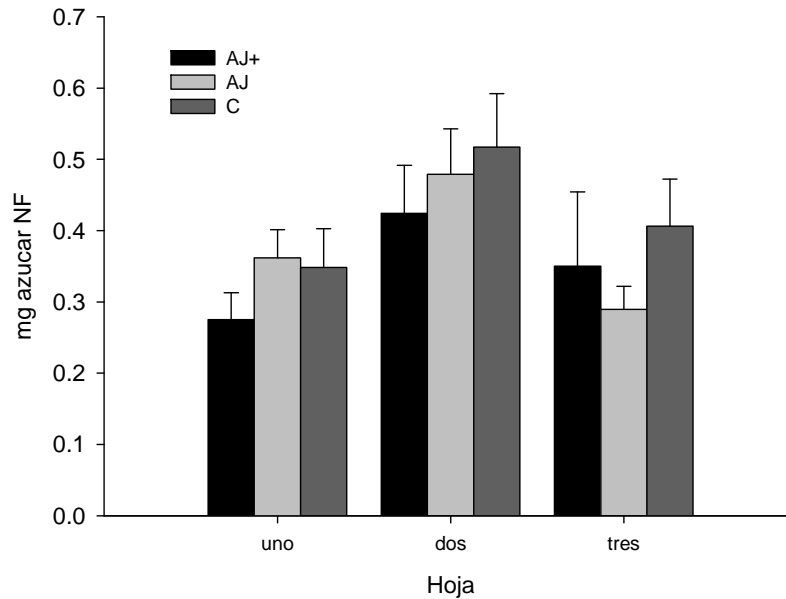


Figura 10. Contenido en azúcar en nectarios florales (\pm e.e; mg) producido en función de la secuencia de flores y de los tratamientos de inducción después de la primera aplicación de AJ.

Contenido de clorofila y componentes de la adecuación

No se encontró un efecto significativo del tratamiento ($F_{(6, 284)} = 0.25, p = 0.96$) ni del tiempo ($F_{(3, 284)} = 0.45, p = 0.71$) sobre el contenido de clorofila.

No se encontraron costos en los componentes de la adecuación masculina medida en polen en la primera flor ($F_{(4, 142)} = 0.88, p = 0.47$) ni en la segunda flor ($F_{(2, 72)} = 0.76, p = 0.47$). Tampoco se encontró un efecto significativo sobre los componentes de la adecuación medidos como cantidad de semillas del primer fruto (hoja 1; $F_{(2, 58)} = 0.16, p = 0.85$).

Costos ecológicos

No hubo un efecto de la aplicación de ácido jasmónico ($F() =$, $p = 0.12$; Fig. 11), ni de la presencia de hormigas ($F_{(1, 116)} = 2.42$, $p = 0.12$; $n = 30$; Fig. 11) sobre la tasa de visita de polinizadores.

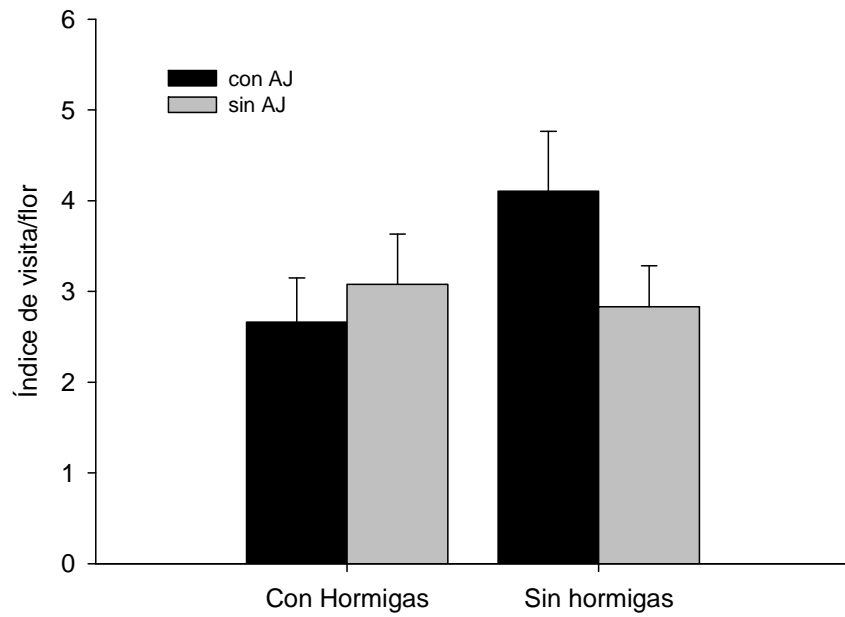


Figura 11. Tasa de visitas a flores de *T. velutina* (No. visitas/periodo/flor \pm e.e) en plantas con presencia o ausencia de hormigas y con y sin aplicación de ácido jasmónico (AJ). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, $n = 30$.

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que describe un costo de la inducción del NEF. La inducción del NEF en *T. velutina* afectó negativamente el crecimiento después de tres semanas de la aplicación repetida de AJ (tratamiento AJ+; Fig. 8). Sin embargo, no se encontraron costos sobre caracteres reproductivos como la producción de polen en las dos primeras flores producidas o las semillas producidas por el primer fruto, así como tampoco sobre el contenido neto de clorofila. La producción del NF solo fue afectada por la secuenciación de las flores y no por los tratamientos de inducción con AJ (Fig. 8). Finalmente, tampoco se detectaron costos ecológicos sobre la visita de polinizadores por los tratamientos de la aplicación de AJ y la presencia o ausencia de mutualistas (Fig. 11).

Inducción del néctar extrafloral

Se encontró que la producción de NEF de *T. velutina* es inducida bajo distintas formas de daño artificial, natural y por la aplicación exógena de AJ. *Turnera velutina* respondió de manera similar a otras especies en las cuales se ha estimado la inducción después de 24 h (Heil et al., 2001; Heil, 2004; Radhika et al., 2008). Este resultado se suma a otros en donde se ha descrito el efecto del daño artificial o natural y aplicaciones exógenas de AJ como emulador de la herbivoría para la inducción del NEF de *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae; Heil et al., 2000) y *Gossypium herbaceum* (Malvaceae; Wäckers y Wunderlin, 1999). Para que una defensa inducida sea exitosa requiere que ésta sea generada por la planta de manera rápida y adecuada, distinguiendo entre el daño mecánico (artificial) y el daño natural (por herbívoros; Howe y Jander, 2008; Engelberth et al., 2004). Sin embargo, *T. velutina* no mostró diferencias significativas un daño artificial y un daño hecho por herbívoros (Fig. 2-4). La inducción por daño mecánico pudo haber ocurrido por la presencia de bacterias en el ambiente pudieran activar los mecanismos de defensa o por la presencia de volátiles de plantas dañadas por los herbívoros (Heil y Kost 2006; Heil y Karban 2010). Sin embargo, aun quedan por dilucidar piezas faltantes de cómo se genera la inducción del NEF en *T. velutina* de manera detallada, ya que éste es un proceso complejo en el cual están interactuando varios factores (Heil, 2008) y en los cuales se debe de ver la

respuesta de otros atributos como la cantidad de aminoácidos en el NEF (Smith et al., 1990) o la respuesta de sus hormigas asociadas (Ness, 2003).

Las diferencias en la producción de NEF entre los experimentos I y II sugieren la influencia de las condiciones ambientales en la producción de NEF de *T. velutina*, tal como se ha demostrado en otros trabajos (Van Zandt 2007; Heil, 2008; Ballhorn et al., 2009; Radhika et al., 2010b). La producción de NEF en primavera aumentó en comparación con la del invierno, en donde las condiciones de humedad y temperatura del sitio fueron menores (Travieso-Bello y Campos, 2006; Villamil, 2012). Por otro lado, las diferencias en la especificidad de *T. velutina* para *E. hegesia* y *S. frugiperda* son difíciles de aclarar en este momento. En el primer experimento, el daño con tijera al 50 % del área foliar de la hoja diana produjo una mayor respuesta inductiva tanto en la cantidad de azúcar como en el volumen de néctar producido (Figs. 1 y 2), lo que sugiere que la magnitud de la respuesta inducida depende de la magnitud del daño. Por ejemplo, Smith y colaboradores (1990) han demostrado que en *Impatiens sultani* (Balsaminaceae) hay un incremento en la cantidad de aminoácidos del NEF después de un daño mecánico foliar del 50 al 75 % (Smith et al., 1990). Finalmente, es prudente puntualizar que tanto las concentraciones de AJ, el daño mecánico, el daño con herbívoros y la zona donde se aplica el daño o el elicitor puede generar respuestas distintas (Heil et al., 2000; 2001; Ness, 2003; Pulice y Packer, 2008).

Generalmente la respuesta inducida está sujeta a un patrón temporal en el cual existe un periodo de latencia seguido de la activación de la respuesta defensiva para, finalmente, terminar en un proceso de relajación en el cual la defensa llega a sus condiciones iniciales (Karban y Baldwin, 1997). En *T. velutina* la inducción del NEF mediante AJ presentó un proceso de activación de la defensa después de las 24 h de la aplicación y para las 72 h (i.e., el día 3) el efecto se redujo al mínimo, dando como resultado que para el día cinco posterior a la aplicación no se encontraran diferencias entre los tratamientos (Fig. 6). Dichos resultados concuerdan con otros trabajos donde se ha reportado la inducción del NEF en las plantas *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae; Heil et al., 2001), *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) y *Gossypium herbaceum* (Malvaceae; Wäckers et al., 2001), así como en modelos teóricos de inducción de NEF (Zangerl, 2003). El aumento y la disminución de la defensa y el umbral del daño son factores críticos para entender los costos de la inducción,

ya que ambos son etapas vulnerables en el tiempo que toma la activación de la defensa (Karban, 2011).

Costos en la inducción del NEF

Para entender las circunstancias que favorecen la inducibilidad de la defensa en plantas se deben considerar los costos y los beneficios de los componentes que contribuyen a la adecuación (Zangerl, 2003). En el caso particular de *T. velutina* la inducción de NEF tuvo un efecto negativo en términos del crecimiento de las plantas, el cual fue más drástico cuando la inducción se realizó tres veces por semana y se removió continuamente el NEF. Heil y Walters (2007) plantean que para que un “costo” sea detectable se debe manifestar en la ausencia de enemigos naturales y debería estar contrapuesto con los beneficios en su entorno natural. Siguiendo este postulado, el crecimiento disminuyó en ausencia de daño por herbívoros después ante la inducción artificial de NEF. El crecimiento consiste en la división celular y una posterior enlongación de los tejidos y ésta demanda luz, agua, minerales, fotosintatos y factores de crecimiento y es probable que los fotosintatos utilizados en la producción de NEF hayan reducido los recursos necesarios para dichas funciones (Herms y Mattson, 1992). Este tipo de costo podría tener implicaciones ecológicas importantes en la historia de vida de las plantas en un contexto de competencia por nutrientes o por la fijación al sustrato (Cates y Orians, 1975).

Heil (2002) describe este fenómeno como un costo de oportunidad (*opportuniy cost*), el cual representa una pérdida de crecimiento a corto plazo por la activación de componentes defensivos, lo que implica darle una ventaja a plantas vecinas en la competencia por luz y nutrientes (Heil, 2002). Llevando esta idea al campo, este costo podría afectar a plantas juveniles que estén iniciando su etapa reproductiva con sus primeras flores y que llegan a competir por la presencia de hormigas y por crecer rápidamente para alcanzar ciertos recursos antes de la temporada de secas (Villamil, 2012; Salazar-Rojas et al., 2012; Ochoa-López, 2013). Sin embargo, no se encontraron costos en ningún componente de la adecuación femenina y masculina de las primeras flores después del inicio del experimento, ni en la cantidad y calidad del NF de *T. velutina*. A pesar de que

se han reportado costos en de la resistencia inducida, medida en otros atributos, por daños mecánicos, con herbívoros y con la elicitación mediante jasmonatos sobre la adecuación de las plantas en otras especies (Agrawal et al., 1999; Baldwin 1998; Accamando y Cronin 2012), *T. velutina* es capaz de tolerar una reducción en el crecimiento manteniendo sus niveles de adecuación. Sin embargo, los costos a nivel reproductivo aun pueden manifestarse en el polen, NF o semillas de flores o frutos producidos aun más tarde y no sólo hasta la tercera flor o el primer fruto después de la aplicación de AJ, lo cual constituye una restricción de este trabajo.

El AJ es clave para entender la pérdida del crecimiento y la inducción del NEF como defensa. Existe evidencia de cómo esta fitohormona inhibe o acelera funciones reproductivas, de crecimiento y defensivas (Wasternack 2007; Heil 2008; Thaler et al., 2012). El AJ es una fitohormona lipídica que regula la defensa contra patógenos y herbívoros, respuestas de daño y varios procesos en el desarrollo de las plantas (Wasternack, 2007) y junto con el ácido giberélico juegan un rol importante en la diversos aspectos del crecimiento y el desarrollo vegetal (Kazan y Manners, 2011). Se ha descrito que la aplicación de AJ reduce la expansión foliar en *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae; Moore et al., 2003) y la elongación de fibras en el algodón (Tan et al., 2012). También se ha descrito que estas cascadas de señalización priorizan la defensa sobre el crecimiento en el arroz (*Oryza sativa*; Poaceae) y en *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), mediante la inhibición de la familia proteica DELLA (familia de proteínas inhibidoras del ácido giberélico; Yang et al., 2012). También, plantas de *A. thaliana* que estuvieron bajo daño artificial redujeron su crecimiento por en un 50% e incrementaron su concentración interna de AJ mediante la supresión de la mitosis (Zhang y Turner, 2008). Incluso recientemente se ha descrito al factor de transcripción BRZ1 como posible regulador entre la defensa y el crecimiento de la planta (Lozano-Durán et al., 2013).

Trabajos anteriores sugieren que la producción del néctar floral (NF) no es afectada directamente por la inducción de la resistencia en plantas simulando un daño sobre las hojas cuentan con cierta independencia. Por ejemplo, se demostró que la producción de NF bajo tratamientos de inducción mediante AJ y daño con herbívoro y mecánico en las hojas no afectan la producción de NF de *Brassica napus* (Brassicaceae), sin embargo, la aplicación

de AJ directa sobre las estructuras florales sí tuvo efectos sobre su NF (Radhika et al., 2010a). Aunque no se detectó un costo de la inducción de NEF en la producción de NF, es interesante que éste mostró estar relacionado la secuencia de producción de flores (Figs. 8 y 9). La expresión de la defensa a nivel individual dependen de su ontogenia (Ballhorn et al., 2009), lo cual pudo restringir la respuesta defensiva en *T. velutina*, ya que la producción de NF no se diferenció entre los tratamientos (C, AJ y AJ+; Figs. 8 y 9).

Las diferencias en la secreción del NEF y la secreción del NF por la inducción con AJ aportan ideas para conocer la cantidad de funciones defensivas y reproductivas que las plantas pueden estar realizando en un evento ecológico (Heil, 2011). Está bien documentado que los nutrientes que están dedicados a la reproducción pueden afectar otras funciones como el crecimiento o la competencia y que, además, las plantas pueden prescindir de ciertas funciones compensando nutrientes para el evento reproductivo (Obeso, 2002). En este contexto, podríamos sugerir que *T. velutina* prioriza la reproducción y defensa indirecta (NEF) a costa del crecimiento en un contexto de un ataque inesperado de algún herbívoro y éste se ve más afectado cuando hay presencia de hormigas (AJ+). Estudios previos han reportado costos de la interacción entre la planta *Cordia nodosak* con la hormiga *Allomerus octoarticulatus*, ya que la presencia de hormigas incrementa el tamaño de las plantas en presencia de herbívoros, pero en su ausencia la planta disminuye su crecimiento (Frederickson et al., 2012). En este contexto, y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la pérdida de área fotosintética parece jugar un papel clave en los posibles costos de la inducción, en función de la efectividad de las defensas indirectas. Es por esto que para evaluar el beneficio neto de la producción de NEF sería conveniente evaluar el costo de la herbivoría en función del crecimiento y ponderarlo con el costo de atraer a las hormigas defensoras mediante la producción de NEF.

Costos ecológicos

Un costo ecológico de una defensa indirecta inducida tendría un efecto negativo sobre la planta al alterar sus interacciones con especies mutualistas, por ejemplo, con sus polinizadores (Heil y Baldwin 2002; Heil 2002). Esto se debe a que defensores, herbívoros

y polinizadores interactúan de manera compleja incrementando o disminuyendo la adecuación de la planta (Strauss e Irwin, 2004). Sin embargo, en *T. velutina* no se detectó efecto de la inducción de NEF en presencia o en ausencia de las hormigas defensivas sobre la visita de polinizadores. Este resultado coincide con al menos otro trabajo en el que tampoco se encontraron diferencias en la visita de abejas y otros polinizadores a plantas de *Brassica nigra* tratadas con AJ, a pesar de que el comportamiento de herbívoros, el porcentaje de parasitoides y la cantidad de NF fueron afectados por este tratamiento (Bruinsma et al., 2008).

En condiciones de campo, *T. velutina* es visitada en más de un 90 % de frecuencia por *Apis mellifera* (Sosenski et al., *datos no publicados*). El comportamiento de este polinizador consiste en la recolecta de polen como primera actividad, para luego consumir NF (obs. pers.). En contraste con lo esperado, el experimento anterior demostró que la inducción de NEF no tuvo un efecto significativo en la producción de NF o polen en las flores, lo cual podría explicar que no haya habido efectos indirectos sobre los polinizadores.

Finalmente, a pesar de que se ha sugerido que las plantas que invierten en respuestas inducidas deberían reducir la inversión en estructuras vegetativas y florales, incluyendo la producción de néctar y polen (Lucas-Barbosa et al., 2011), la inducción del NEF en *T. velutina* sólo generó costos en el crecimiento sin afectar la parte reproductiva ni la visita de polinizadores. Esto sustenta el hecho de que la resistencia inducida tiende a ser menos costosa que la resistencia constitutiva, debido a que solo se tienen que mantener en buen estado las rutas de detención del daño, de ahí que los costos en crecimiento encontrados en *T. velutina* se asemejen más a un costo ecológico de ocasión (Purrington, 2000; Heil, 2002). Sin embargo, estas pruebas se tienen que hacer considerando a las hormigas asociadas y sus conductas particulares de forrajeo sobre *T. velutina* (Cuautle et al., 2005; Salazar-Rojas et al., 2012).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se puede concluir que existe un costo sobre el crecimiento de *T. velutina* por la inducción del NEF y fue más alto cuando hubo simulación de presencia de hormigas, mientras que los atributos relacionados a la adecuación como: néctar floral, polen, semillas y la visita de polinizadores no presentaron costos. De esta forma *T. velutina* a pesar de estar en un evento de daño y la inducción de su NEF, prioriza el esfuerzo reproductivo por encima del crecimiento.

Las perspectivas y preguntas abiertas que quedan a partir de los resultados obtenidos en este trabajo son las mediciones de algunos parámetros a largo plazo en los atributos de adecuación como polen, semillas y la misma producción del NF y del NEF. Por otro lado, se observó un patrón de la producción de NF en la secuencia floral, al menos en plantas reproductivas jóvenes donde la ramificación aún no se ha dado, como en las plantas que se presentan en condiciones naturales. La interrogante de los costos ecológicos también se puede ampliar a eventos relacionados con la dispersión de semillas después de un evento inductivo y hacer pruebas más controladas sobre el AJ, los compuestos volátiles, y la visita de polinizadores. Finalmente, sería recomendable analizar la identidad de los visitantes florales y el tipo de recompensa floral que están consumiendo ya que podría ser una variable interesante sobre si existe un costo a largo plazo.

Este trabajo es una aportación importante a los conocimientos de las respuestas inducidas de las plantas ya que nos muestra que las plantas pueden contar con ciertas estrategias después de que existe un daño por herbívoros.

LITERATURA CITADA

- Accamando, A. A. K., y Cronin, J. T. (2012). Costs and Benefits of Jasmonic Acid Induced Responses in Soybean. *Environmental Entomology*, 41(3), 551–561.
- Agrawal, A. (2005). Future directions in the study of induced plant responses to herbivory. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 97–105.
- Agrawal, A. A. (1998). Induced Responses to Herbivory and Increased Plant Performance. *Science*, 279(February), 1201–1202.
- Agrawal, A. a., Strauss, S. Y., y Stout, M. J. (1999). Cost of Induced Responses and Tolerance to Herbivory in Male and Female Fitness Components of Wild Radish. *Evolution*, 53(4), 1093–1104.
- Arbo, M. M. (2005). Estudios sistemáticos en *Turnera* (TURNERACEAE). III. Series Anomalae y *Turnera*. *Bonplandia*, 14, 115–318.
- Arimura, G., Kost, C., y Boland, W. (2005). Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734(2), 91–111.
- Baldwin, I. T. (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(July), 8113–8118.
- Ballhorn, D. J., Kautz, S., Heil, M., y Hegeman, A. D. (2009). Analyzing plant defenses in nature. *Plant Signaling y Behavior*, 4(8), 743–745.
- Barret, S. C. H., y Shore, J. S. (1987). Variation and Evolution of Breeding Systems in The *Turnera ulmifolia* L. Complex (Turneraceae). *Evolution*, 41(2), 340–354.
- Bixenmann, R. J., Coley, P. D., y Kursar, T. a. (2011). Is extrafloral nectar production induced by herbivores or ants in a tropical facultative ant-plant mutualism? *Oecologia*, 165(2), 417–25.
- Bruinsma, M., IJdema, H., van Loon, J. J. a., y Dicke, M. (2008). Differential effects of jasmonic acid treatment of *Brassica nigra* on the attraction of pollinators, parasitoids, and butterflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(1), 109–116.
- Cates, R. G., y Orians, G. H. (1975). Successional status and the palatability of plants to generalized herbivores. *Ecology*, 56(2), 410–418.
- Creelman, R. a., y Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 355–381.
doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.355

Cuautle, M., Rico-gray, V., y Diaz-castelazo, C. (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.

Díaz-Castelazo, C., y Rico-Gray, V. (2004). Extrafloral nectary-mediated ant-plant interactions in the coastal vegetation of Veracruz, Mexico: Richness, occurrence, seasonality, and ant foraging patterns. *Ecoscience*, 11(4), 472–481.

Dicke, M., y Hilker, M. (2003). Basic and applied ecology induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic and Applied Ecology*, 4(1), 3–14.

Erb, M., Meldau, S., y Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, 17(5), 250–9.

Frederickson, M. E., Ravenscraft, A., Miller, G. a, Arcila Hernández, L. M., Booth, G., y Pierce, N. E. (2012). The direct and ecological costs of an ant-plant symbiosis. *The American Naturalist*, 179(6), 768–78.

Gatehouse, J. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156(140), 145–169.

Heil, M. (2002). Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 345–50.

Heil, M. (2004). Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology*, 92, 527–536.

Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *The New Phytologist*, 178(1), 41–61.

Heil, M. (2010). Plastic defence expression in plants. *Evolutionary Ecology*, 24(3), 555–569.

Heil, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, 16(4), 191–200.

Heil, M., y Baldwin, I. T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, 7(2), 61–7.

Heil, M., Fiala, B., Baumann, B., y Linsenmair, K. E. (2000). Temporal, spatial and biotic variations in extrafloral nectar secretion by *Macaranga tanarius*. *Functional Ecology*, 14(6), 749–757.

Heil, M., y Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in Ecology y Evolution*, 25(3), 137–44.

- Heil, M., Koch, T., Hilpert, a, Fiala, B., Boland, W., y Linsenmair, K. (2001). Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1083–8.
- Heil, M., y Kost, C. (2006). Priming of indirect defences. *Ecology Letters*, 9(7), 813–7.
- Heil, M., y McKey, D. (2003). Protective ant-plant Interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 425–553.
- Hermes, D., y Mattson, W. (1992). The Dilemma of Plants: To grow Or Defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3), 283–335.
- Howe, G. a, y Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 41–66.
- Karban, R. (2011). The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology*, 25(2), 339–347.
- Kazan, K., y Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4087–100.
- Kessler, A., y Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511), 2141–4.
- Kost, C., y Heil, M. (2008). The defensive role of volatile emission and extrafloral nectar secretion for lima bean in nature. *Journal of Chemical Ecology*, 34(1), 1–13.
- Kwok, K. E., y Laird, R. a. (2012). Plant age and the inducibility of extrafloral nectaries in *Vicia faba*. *Plant Ecology*, 213(11), 1823–1832.
- Lozano-Durán, R., Macho, A. P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I. E., y Zipfel, C. (2013). The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife*, 2, e00983.
- Lucas-Barbosa, D., van Loon, J. J. a, y Dicke, M. (2011). The effects of herbivore-induced plant volatiles on interactions between plants and flower-visiting insects. *Phytochemistry*, 72(13), 1647–54.
- Marazzi, B., Bronstein, J. L., y Koptur, S. (2013). The diversity, ecology and evolution of extrafloral nectaries: current perspectives and future challenges. *Annals of Botany*, 111(6), 1243–50.
- Mondor, E. B., Tremblay, M. N., y Messing, R. H. (2006). Extrafloral nectary phenotypic plasticity is dependent in *Vicia faba*. *Biology Letters*, 2(August), 583–585.

- Moore, J. P., Paul, N. D., Whittaker, J. B., y Taylor, J. E. (2003). Exogenous jasmonic acid mimics herbivore-induced systemic increase in cell wall bound peroxidase activity and reduction in leaf expansion. *Functional Ecology*, 17(4), 549–554.
- Ness, J. H. (2003). *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia*, 134(2), 210–8.
- Obeso, J. R. (2002). The cost of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155(139), 321–348.
- Ochoa-López, S. (2013). Caracterización trayectorias ontogenéticas defensa tolerancia *Turnera velutina* variación genética. Tesis UNAM.
- Pulice, C. E., y Packer, a. a. (2008). Simulated herbivory induces extrafloral nectary production in *Prunus avium*. *Functional Ecology*, 22(5), 801–807.
- Purrington, C. B. (2000). Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 305–8.
- Radhika, V., Kost, C., Bartram, S., Heil, M., y Boland, W. (2008). Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences : extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta*, 228, 449–457.
- Radhika, V., Kost, C., Boland, W., y Heil, M. (2010). The role of jasmonates in floral nectar secretion. *PloS One*, 5(2), e9265.
- Radhika, V., Kost, C., Mithöfer, A., y Boland, W. (2010). Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17228–33.
- Salazar-Rojas, B., Rico-Gray, V., Canto, A., y Cuautle, M. (2012). Seed fate in the myrmecochorous Neotropical plant *Turnera ulmifolia* L., from plant to germination. *Acta Oecologica*, 40, 1–10.
- Smith, L. L., Lanza, J., y Smith, G. C. (1990). Amino acid concentrations in extrafloral nectar of *Impatiens sultani* increase after simulated herbivory. *Ecology*, 71(1), 107–115.
- Stephenson, A. G. (1982). The role of the extrafloral nectaries of *Catalpa speciosa* in limiting herbivory and increasing fruit production. *Ecology*, 63(3), 663–669.
- Strauss, S. Y., e Irwin, R. E. (2004). Ecological and Evolutionary Consequences of Multispecies Plant-Animal Interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1), 435–466.
- Strauss, S. Y., Rudgers, J. a., Lau, J. a., e Irwin, R. E. (2002). Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends in Ecology y Evolution*, 17(6), 278–285.

- Tan, J., Tu, L., Deng, F., Wu, R., y Zhang, X. (2012). Exogenous jasmonic acid inhibits cotton fiber elongation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(4), 599–605.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., y Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260–70.
- Torres-Hernández, L., Rico-Gray, V., Castillo-Guevera, C. y Vergara, J. R. (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*, 81, 13–21.
- Van Zandt, P. a. (2007). Plant defense, growth, and habitat: a comparative assessment of constitutive and induced resistance. *Ecology*, 88(8), 1984–93. Retrieved from
- Villamil, N. (2012). Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa contra herbívoros en *Turnera ulmifolia*. *Tesis UNAM*.
- Wäckers, F. L., y Wunderlin, R. (1999). Induction of cotton extrafloral nectar production in response to herbivory does not require a herbivore-specific elicitor. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91, 149–154.
- Wäckers, F. L., Zuber, D., Wunderlin, R., y Keller, F. (2001). The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Annals of Botany*, 87, 365–370.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681–97.
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., Tong, X.-H., Zeng, L.-J., Li, Q., He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), E1192–200.
- Zangerl, A. R. (2003). Basic and applied ecology evolution of induced plant responses to herbivores. *Basic and Applied Ecology*, 4, 91–103.
- Zhang, Y., y Turner, J. G. (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PloS One*, 3(11), e3699.

ANEXOS

1. Experimento de remoción de herbívoros

Análisis de varianza sobre los porcentajes de daño entre un grupo de 20 plantas con remoción manual de herbívoros de 8:00 a 11:00 h y de 17:00 a 20:00 h y un grupo control sin remoción de herbívoros durante una semana. Al finalizar la semana se hizo un conteo de todas las hojas presentes en cada una de las plantas y se dividió el número total entre 20. El número resultante (x) era el intervalo de hojas maduras que se debían considerar antes de elegir una hoja para medir daño foliar, si la hoja x presentaba daño por herbívoros se medía el largo y ancho y con un acetato cuadrado de 0.5 cm^2 se determinaba el área dañada. La hoja sin daño se registraba como 0% de daño foliar y finalmente usando la ecuación usada por Villamil (2012) se hacía la estimación del área restante (ANOVA: $F_{(1, 38)} = 67.72$, $p = 0.01$).

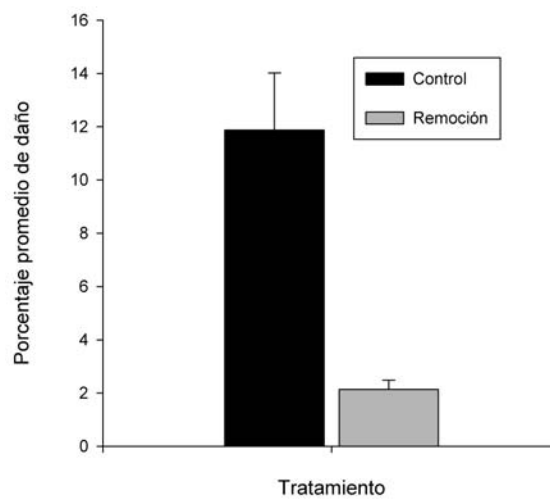


Figura A1. Porcentaje de daño foliar (\pm e.e) en plantas de *T. velutina* para un grupo experimental que tuvo remoción manual de herbívoros durante una semana contra un grupo control que no presentó remoción manual en condiciones de campo.

2. Obtención de medidas de azúcar

$$(1) \text{ Volumen } (\mu\text{l}) = \frac{\text{mm de néctar en el capilar}}{\text{mm del largo total del capilar}} * \text{volumen calibrado del capilar } (\mu\text{l})$$

$$(2) \text{ g de líquido} = 0.0001 * \mu\text{l}$$

Con los datos de concentración de néctar floral (° Brix) y g de líquido se estimó el azúcar total (g) producido por cada flor con la siguiente fórmula.

$$(3) \text{ Azúcar en g} = \frac{\text{° Brix} * \text{g de líquido}}{100}$$

3. Segunda aplicación de ácido jasmónico.

Con el fin de saber si el ácido jasmónico era capaz de inducir nuevamente el NEF, se hizo un segundo experimento donde se prolongo las mediciones del néctar sumándose a una segunda aplicación de AJ (Fig. A2). La finalidad de este ensayo fue buscar si las plantas de *T. velutina* que fueran inducidas una primeras vez, podrían volver a inducir NEF después de una semana.

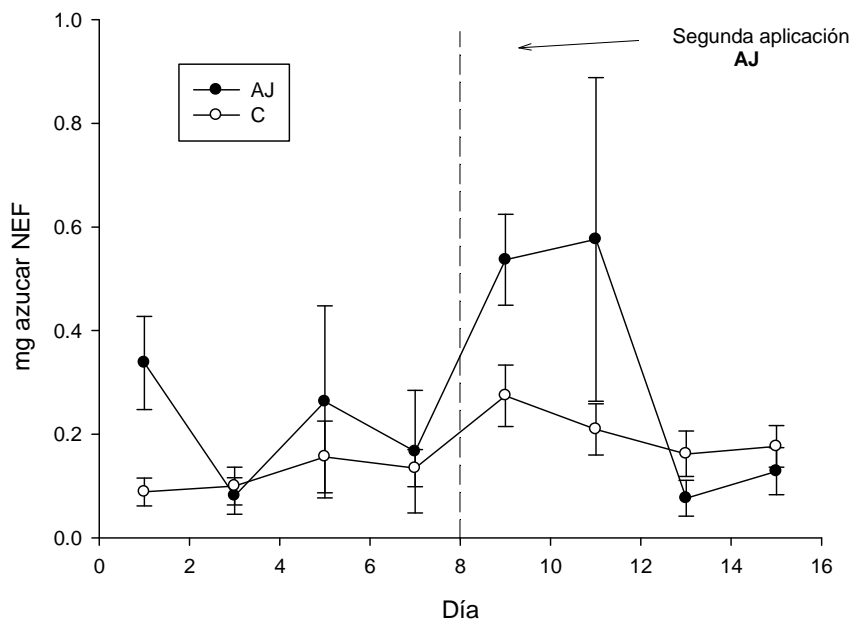


Figura A2. Contenido de azúcar ($g \pm e.e.$) en los tratamientos control (círculos blancos) y con la aplicación de ácido jasmónico (círculos negros) en dos semanas. Debido a la segunda aplicación del tratamiento (AJ) en el día ocho (líneas punteadas), se obtuvo una nueva inducción.