



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Evolución adaptativa durante la invasión de ambientes nuevos: cambios  
en la defensa anti-herbívoros en *Datura stramonium*

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Adriana Calahorra Oliart**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Pedro Luis Valverde Padilla (Departamento de Biología,  
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa)  
COTUTOR DE TESIS: Dr. Juan Núñez Farfán (Instituto de Ecología, UNAM)  
COMITÉ TUTOR: Dr. Ken Oyama Nakagawa (CIECO, UNAM)  
TUTOR INVITADO: Dr. Juan Arroyo Marín (Departamento de Biología Vegetal y Ecología,  
UNAM)

MÉXICO, D.F. Septiembre 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Evolución adaptativa durante la invasión de ambientes nuevos: cambios  
en la defensa anti-herbívoros en *Datura stramonium*

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Adriana Calahorra Oliart**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Pedro Luis Valverde Padilla (Departamento de Biología,  
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa)  
COTUTOR DE TESIS: Dr. Juan Núñez Farfán (Instituto de Ecología, UNAM)  
COMITÉ TUTOR: Dr. Ken Oyama Nakagawa (CIECO, UNAM)  
TUTOR INVITADO: Dr. Juan Arroyo Marín (Departamento de Biología Vegetal y Ecología,  
UNAM)

**MÉXICO, D.F.      Septiembre 2015**

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

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 23 de marzo de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **CALAHORRA OLIART ADRIANA** con número de cuenta **408038324** con la tesis titulada "**EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DURANTE LA INVASIÓN DE AMBIENTES NUEVOS: CAMBIOS EN LA DEFENSA ANTI-HERBÍVOROS EN *Datura stramonium***", bajo la dirección del DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA, y la Co-tutoría del DR. JUAN SERVADO NÚÑEZ FARFAN

Presidente:	DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FURNS
Vocal:	DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
Secretario:	DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Suplente:	DRA. KARINA BOEGE PARÉ
Suplente	DR. JUAN ARROYO MARÍN

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 22 de septiembre de 2015.



*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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

## AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de mi maestría

Al Programa de Apoyo para los Estudiantes de Posgrado de la UNAM por el apoyo económico para realizar mi estancia de investigación

Al proyecto PAPIIT IN-212214 “Evolución adaptativa de la defensa de las plantas durante la invasión a ambientes nuevos”

A los miembros del Comité Tutoral por su valioso apoyo durante la realización de esta investigación

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Juan Núñez y a Pedro Luis Valverde por la confianza y el valioso apoyo durante la realización de este trabajo

A Ken Oyama, Ek del Val, Karina Boege y Luis Eguiarte por sus valiosos comentarios sobre este escrito

A Juan Arroyo, Rocío Santos Gally, Rafael Molina Venegas, Alejandra de Castro y el resto del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla por su valiosa contribución en mi formación

Al Laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología de la UNAM por las facilidades otorgadas durante la parte experimental de este trabajo

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Laura Lorena Cruz y a Guillermo Castillo, pues esta tesis no hubiera sido posible sin su trabajo y ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias también a la Dra. Rosalinda Tapia por el apoyo técnico.

Al Lic. Diego Bustamante por su apoyo moral en todo momento

A mi familia por todo

DEDICATORIA

A mi familia

## ÍNDICE

Resumen	10
Abstract	12
Introducción	13
Hipótesis	17
Objetivos	18
Antecedentes	19
Método	22
Resultados	29
Discusión	41
Conclusiones	46
Perspectivas a futuro	48
Bibliografía	49

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Ejemplar de <i>Datura stramonium</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Flores y frutos de <i>D. stramonium</i> . a) flores siendo polinizadas por <i>Apis mellifera</i> . b) fruto con corte mostrando semillas. c) fruto infestado con larva de <i>Helicoverpa armigera</i> ..	23
<b>Figura 3.</b> Poblaciones muestreadas en España y su tipo de clima .....	24
<b>Figura 4.</b> Media y desviación estándar para el porcentaje de daño foliar y los componentes de la defensa de las 14 poblaciones españolas estudiadas de <i>Datura stramonium</i> ordenadas de manera ascendente según sus niveles de daño foliar promedio .....	30
<b>Figura 5.</b> Diferencias entre las 14 poblaciones españolas muestreadas y los valores reportados por Castillo <i>et al.</i> (2013) para poblaciones mexicanas respecto a proporción de daño foliar, densidad de tricomas, concentración de atropina y concentración de escopolamina .....	32
<b>Figura 6.</b> Relación entre densidad de tricomas foliares y número de semillas en la población Cabeza La Vaca .....	37
<b>Figura 7.</b> Costos en número de semillas de la concentración de atropina .....	38
<b>Figura 8.</b> Costos en número de frutos de la concentración de atropina .....	39
<b>Tabla 1.</b> Nombres de las poblaciones, provincia, ubicación geográfica y condiciones ambientales de las 14 poblaciones de <i>Datura stramonium</i> muestreadas en España. n = tamaño de muestra .....	25
<b>Tabla 2.</b> Insectos reportados en las 14 poblaciones de <i>Datura stramonium</i> muestreadas en España .....	29
<b>Tabla 3.</b> Gradientes de selección direccional sobre los componentes de la defensa en 14 poblaciones españolas de <i>D. stramonium</i> .....	36

## RESUMEN

La interacción entre plantas y herbívoros da lugar a procesos coevolutivos entre ambos, a los cuales se atribuye el origen de gran parte de la biodiversidad que existe sobre la Tierra. En esta carrera armamentista, los herbívoros actúan como una presión de selección sobre los caracteres de defensa de las plantas, favoreciendo que se seleccionen rasgos que disminuyan el ataque de los enemigos. Estos caracteres, a su vez, imponen una presión selectiva sobre los herbívoros, favoreciendo por selección natural aquellos caracteres que permitan sortear la resistencia de las plantas. *Datura stramonium* es una planta ruderal nativa de México, donde distintos insectos generalistas y especialistas consumen su tejido foliar. *D. stramonium*, a su vez, presenta caracteres de defensa físicos (tricomas foliares) y químicos (alcaloides) para impedir este daño. Actualmente *D. stramonium* ha invadido nuevas regiones en donde están ausentes sus herbívoros especialistas. Se cree que su introducción más antigua fue en España, de manera que las poblaciones allí presentes ofrecen el mayor número de generaciones para estudiar los cambios en la defensa de esta especie desde que se liberó de sus enemigos especialistas, poniendo a prueba los postulados propuestos por Keane y Crawley (2002) en su Hipótesis de Liberación de Enemigos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de los atributos defensivos, la selección sobre éstos y la proporción de daño foliar en poblaciones españolas de *D. stramonium* donde sus herbívoros especialistas están ausentes, y analizar si esto difiere con los datos reportados para poblaciones en su área nativa. Para ello, se analizó el daño foliar, la densidad de tricomas y la concentración de atropina y escopolamina para catorce poblaciones del sur de España, así como los gradientes de selección direccional sobre estos atributos. Los resultados obtenidos se compararon con aquellos reportados para esta especie en su área nativa. Se encontró que las poblaciones españolas tienen niveles significativamente más bajos que las mexicanas en daño foliar, densidad de tricomas y concentración de alcaloides. No se encontró que estos atributos estuvieran sujetos a selección direccional mas que en tres de las catorce poblaciones. Sin embargo, la producción de los atributos defensivos en ausencia de enemigos no implica costos en adecuación para la mayoría de las poblaciones. El caso de *D. stramonium* en España resultó ser un buen modelo para estudiar los cambios adaptativos que experimentan las plantas al liberarse de las presiones ejercidas por sus herbívoros. Los resultados de este estudio son relevantes pues aportan evidencia acerca de la influencia de

las interacciones planta-herbívoro en el proceso evolutivo y aportan al estudio sobre los cambios evolutivos que acompañan la invasión a ambientes nuevos.

## ABSTRACT

Interactions between plants and herbivores give rise to coevolutionary processes between them. It is believed that many of the biodiversity of the Earth is due to this process. In this evolutionary arms race, herbivores act as selective pressures on plants' defensive traits, favouring the selection of those characters that help decrease herbivore attack. These traits, then, act as a selective pressure over herbivores, selecting those whose characters allow them to swerve plant's resistance. *Datura stramonium* is a ruderal plant native from Mexico, where different generalist and specialist insects consume its foliar tissue. *D. stramonium* displays defence traits, both physical (foliar trichomes) and chemical (alkaloids) in order to avoid herbivore damage. Nowadays *D. stramonium* has invaded new regions where its specialist herbivores are absent. It is believed that its oldest introduction was in Spain, so populations in this region have the largest generation number possible to study the changes in this specie's defence since it got freed from its specialist enemies, allowing the Enemy Release Hypothesis (HLE, Keane and Crawley, 2002) to be tested. The purpose of this work was to study the expression of defensive characters, selection acting upon them and foliar damage proportion in Spanish populations of *D. stramonium* where its specialist herbivores are absent, and to analyze if this is different to the reported data from populations in its native range. To do so, foliar damage, foliar trichome density and atropine and scopolamine concentration was analyzed for fourteen populations from southern Spain, as well as directional selection gradients acting upon them. The results were compared to those reported for this specie in its native range. Spanish populations have significantly less levels of foliar damage, less trichome density and less alkaloid concentration. Selection upon these attributes was not detected except in three populations. However, defensive traits production when herbivores are absent does not imply fitness costs in most of them. The situation of *D. stramonium* in Spain turned out to be an ideal model for studying adaptive changes that take place in plants when they are freed from the pressures imposed by their herbivores. The results found in this study are relevant because they bring evidence about the influence of plant-herbivore interactions in the evolutionary process and because they contribute to the study of the evolutionary changes that biological invasions to new environments imply.

## INTRODUCCIÓN

La dinámica de las comunidades vegetales y la evolución de las especies de plantas están influenciadas por la acción de los herbívoros y los patógenos (Simms y Fritz, 1992). Aproximadamente la mitad del más de un millón de especies de insectos que existen son herbívoros. Esta presión selectiva sobre las plantas ha dado origen a caracteres de resistencia que les permiten escapar de sus enemigos naturales (Shaller, 2008).

La evolución de la defensa en plantas se asume como un proceso adaptativo, el cual necesariamente implica evolución por selección natural (Thompson, 1994; Shonle y Bergelson, 2000; Rausher, 2001; Núñez-Farfán *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2014; entre otros). En este proceso existe una interacción evolutiva recíproca entre las plantas y uno o más de sus enemigos naturales: los herbívoros actúan como una presión de selección sobre los caracteres de defensa de las plantas, favoreciendo que se seleccionen caracteres que disminuyan el ataque de los enemigos (Simms y Rausher, 1989; Mauricio y Rausher, 1997; Shonle y Bergelson, 2000). Estos caracteres, a su vez, imponen una presión selectiva sobre los herbívoros, favoreciendo aquellos caracteres que permitan sortear los atributos de defensa de las plantas (Rausher, 2001). Se cree que gran parte de la extraordinaria diversidad química y morfológica entre especies de plantas, y de la biodiversidad de la Tierra en general, es reflejo de este tipo de coevolución (Rausher, 2001; Núñez-Farfán *et al.*, 2007).

Un rasgo o caracter de las plantas se considera un componente de la defensa cuando evita o disminuye el daño por herbivoría, al afectar negativamente la preferencia o desempeño de los insectos herbívoros (Strauss *et al.*, 2002). Los caracteres defensivos en plantas se asocian a dos estrategias: la resistencia, que impide o reduce el daño por herbívoros y así sus costos, y la tolerancia, que reduce el efecto negativo de la herbivoría en la adecuación de las plantas una vez que el daño ha ocurrido (Núñez-Farfán *et al.*, 2007; Shaller, 2008). Los caracteres de defensa pueden ser físicos (espinas, tricomas, ceras, dureza, entre otros) o químicos, como metabolitos secundarios, proteínas y enzimas que interfieren con el sistema nervioso o la digestión de los animales que los consuman (Shaller, 2008).

La producción de los caracteres defensivos es metabólicamente costosa, pues implica destinar recursos a éstos en vez de a otras características adaptativas (Simms y Fritz, 1992; de Jong y van der Meijden, 2000; Rausher, 2001; Shonle y Bergelson, 2000). Se considera que la resistencia es costosa cuando la adecuación de las plantas más resistentes es menor que la adecuación de plantas menos resistentes en un escenario ausente de enemigos (Strauss *et al.*, 2002).

La heterogeneidad en la disponibilidad de recursos en las poblaciones de plantas da lugar a que los costos asociados a la producción de la defensa varíen intrapoblacionalmente y con ello también su valor adaptativo (Fornoni *et al.*, 2004). Únicamente en ambientes libres de herbívoros se pueden medir adecuadamente los costos de la producción de las defensas, pues en estos ambientes los beneficios de la resistencia no estarán expresados (Elle *et al.*, 1999). Se han reportado costos entre el destino del nitrógeno para almacenamiento y para defensas constituidas a partir de éste (Futuyma, 1983; Bazzaz *et al.*, 1987; Simms y Rausher, 1987; Chapin *et al.*, 1990; Volenec *et al.*, 1996; Kakes, 1989; de Jong y van der Meijden, 2000; Purrington, 2000; Strauss *et al.*, 2002). En el caso de los alcaloides, su producción requiere de nitrógeno que podría ser destinado al crecimiento, lo cual puede repercutir en la talla y en la producción de semillas en las plantas (Rausher, 2001).

Debido a esto, se espera que la producción de estos metabolitos secundarios esté fuertemente regulada y correlacionada con las presiones impuestas por los depredadores (Bazzaz *et al.*, 1987; Purrington, 2000; Ehlich y Raven, 1964; Shonle y Bergelson, 2000). Los alcaloides pueden mantenerse evolutivamente a través de la selección impuesta por los diferentes herbívoros presentes en las poblaciones de plantas (Simms y Fritz, 1990; Marquis 1992; Shonle y Bergelson, 2000; Juenger y Bergelson, 1998). Sin embargo, cuando los herbívoros son escasos o están ausentes, se espera que la selección natural reduzca la asignación de recursos a la defensa para destinarlos a otros caracteres que incrementen las habilidades competitivas (Blossey y Notzold, 1995; de Jong y van der Meijden, 2000; Purrington, 2000; Koricheva, 2002; Strauss *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2004).

*Datura stramonium*, conocida comúnmente como “toloache” en México, es una planta anual de la familia de las Solanáceas nativa de Norteamérica. En México tiene herbívoros que

consumen su tejido foliar, causando importantes daños que repercuten negativamente en su adecuación (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Fornoni *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2003). La defensa contra la herbivoría en esta especie se compone de un conjunto de caracteres (Castillo *et al.*, 2013): defensas físicas (tricomas) y químicas (tropano alcaloides), cuya ventaja adaptativa se ha demostrado en estudios previos, así como la selección a favor de la resistencia (medida como 1 – porcentaje foliar dañado) (Shonle y Bergelson, 2000; Valverde *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2013, Castillo *et al.*, 2014; Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015).

*Datura stramonium* ha sido introducida en varias regiones del mundo (van Kleunen *et al.*, 2007), entre ellos España, donde experimenta la ausencia de herbívoros naturales. Esta especie fue introducida a España, posiblemente desde México, entre 1540 y 1577 (Sanz-Elorza *et al.*, 2004), lo cual podría suponer el evento de introducción más antiguo de esta especie fuera de su rango nativo (Geeta y Gharaibeh, 2007). Actualmente es considerada invasora en ambientes naturales y cultivos, habitando zonas ribereñas y humedales en regiones cálidas con moderada influencia humana (Dana-Sánchez *et al.*, 2004; Sanz-Elorza *et al.*, 2004).

Dos hipótesis explican conjuntamente las condiciones a las que se enfrentan las plantas al ser introducidas a una nueva área y los cambios que éstas conllevan: la Hipótesis de Liberación de Enemigos (HLE, Keane y Crawley, 2002) y la Evolución del Incremento en la Habilidad Competitiva (EIHC, Bossley y Notzold, 1995). En conjunto, estas hipótesis sostienen que cuando una especie se introduce a un ambiente nuevo, experimenta una reducción en la regulación poblacional por enemigos naturales. Debido a esto, las plantas experimentarán menor daño por herbívoros en comparación con lo experimentado en sus áreas de distribución de origen (*v.gr.*, Fenner y Lee, 2001; DeWalt *et al.*, 2004). Aunque los caracteres de defensa tienen un valor adaptativo en presencia de herbívoros, en un ambiente libre de éstos resultarían ser costosos (Purrington, 2000; Koricheva, 2002; Strauss *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2004) y se espera que se favorezcan por selección natural aquellos fenotipos competitivamente superiores pero relativamente menos defendidos, por ejemplo, aquellos que asignen más recursos al crecimiento y a la reproducción (*v.gr.*, Blossey y Nötzold, 1995; Jakobs *et al.*, 2004) (pero véase Genton *et al.*, 2005). Esto permite que estas plantas alcancen mayores tallas en comparación con aquellas que habitan las áreas de

distribución nativa, y que sean más hábiles para competir por los recursos en comparación con las especies locales (Moles *et al.*, 2008). Numerosos estudios han reportado que las plantas invasoras son más abundantes, más vigorosas y alcanzan tallas mayores que las de su misma especie en su rango de distribución nativo (Crawley, 1987; Daehler y Strong, 1996; Willis *et al.*, 1999; Fenner & Lee, 2001; De Walt *et al.*, 2004; Jakobs *et al.*, 2004; Vilà *et al.*, 2005; Jakobs *et al.*, 2004; Genton *et al.*, 2005; Moles *et al.*, 2008; entre otros)

El caso de *Datura stramonium* en España, al tratarse probablemente de la introducción más antigua de esta especie, supone el mayor número de generaciones posible para poner a prueba las predicciones de la HLE una vez “liberada de la *carrera armamentista*” con sus herbívoros especialistas y preguntarse: 1) ¿Cuáles son los niveles de daño por herbívoros en España?, 2) ¿Difieren las poblaciones nativas e invasoras de *D. stramonium* en sus caracteres defensivos morfológicos y químicos? ¿Se asocia la variación en éstos con la resistencia general (daño por herbívoros) en España?, y 3) ¿Hay selección natural sobre la variación en resistencia y sus componentes (tricomas y alcaloides) en poblaciones invasoras?

## HIPÓTESIS

I) Ya que en el área de introducción no se encuentran los herbívoros especialistas de *D. stramonium*, se espera que el daño relativo por insectos herbívoros sea menor en el área de introducción (España) que en su hábitat nativo (México).

II) Si existe un compromiso (*trade-off*) entre la asignación de recursos al crecimiento y a la defensa, las poblaciones no nativas (España) de *D. stramonium* presentarán menores valores fenotípicos en defensa física y/o química contra enemigos naturales que las nativas (México).

III) Una menor carga de herbívoros y daño en poblaciones no nativas implicará un menor costo en adecuación. Por lo tanto, se predice que los gradientes de selección natural en caracteres de resistencia diferirán entre poblaciones nativas y no-nativas. Específicamente, se predice que la selección de la resistencia será mayor en las poblaciones nativas debido a las presiones de ese ambiente. En poblaciones no-nativas se predice que no existirá selección a favor de la defensa o que la selección será menor que en el ambiente nativo debido a la ausencia de herbívoros especialistas y, por ende, menores niveles de daño.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Evaluar los niveles de daño foliar, la expresión de los atributos defensivos y su valor adaptativo en poblaciones de *D. stramonium* en un ambiente nuevo y compararlos con lo reportado en su área nativa.

### **Objetivos particulares:**

- I) Evaluar el daño por herbívoros en poblaciones de *D. stramonium* en España.
- II) Evaluar la expresión de los atributos defensivos (tricomas y alcaloides) en poblaciones de *D. stramonium* en España.
- III) Estimar la dirección y magnitud de los gradientes de selección sobre la defensa en poblaciones españolas de *D. stramonium*.
- IV) Comparar los resultados obtenidos en esta investigación con los datos disponibles de estudios previos sobre la evolución de la defensa de *D. stramonium* en México.

## ANTECEDENTES

Dentro del reino vegetal existe una gran diversidad de metabolitos secundarios. Una posible explicación es que se originan por una carrera armamentista en la cual las plantas producen nuevos compuestos secundarios, y en insectos la selección favorece aquellos que desarrollen mecanismos para metabolizarlos. Estos compuestos se encuentran en nueve familias de angiospermas, destacando la familia de Solanaceae que incluye el género *Datura*, donde todas las especies son ricas en ellos (Evans, 1979; Shonle y Bergelson, 2000).

La variación genética que subyace la producción de alcaloides (Shonle y Bergelson, 2000; Fornoni *et al.*, 2004), los distintos patrones en la distribución de los tropano alcaloides en este género (que van de 0.65 a 22.6 mg/g de peso seco entre especies; Parr *et al.*, 1990), así como la tendencia a encontrar alcaloides más tóxicos en plantas evolutivamente más derivadas (Levin y York, 1978; Gottlieb y Meyers, 1990), sugieren que éstos están sometidos a selección natural (Shonle y Bergelson, 2000) y que se mantienen evolutivamente gracias a ella (Ehlich y Raven, 1964; Shonle y Bergelson, 2000; Purrington, 2000).

Los tropano alcaloides son metabolitos secundarios (es decir, compuestos que no tienen función conocida en procesos metabólicos primarios) producidos por las plantas. Son compuestos heterocíclicos formados por nitrógeno y un anillo de pirrolidina con un puente de tres átomos entre el segundo y el quinto carbono. Al ser ingeridos por herbívoros, inhiben la actividad del neurotransmisor acetilcolina (Roddick, 1991) y se ha demostrado que tienen un impacto negativo en muchos insectos (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Shonle y Bergelson, 2000).

Shonle y Bergelson (2000), en un estudio con poblaciones de *D. stramonium* norteamericanas, encontraron variación ambiental en la producción de hiosciamina y escopolamina. También detectaron selección en contra de la escopolamina y selección estabilizadora para la hiosciamina, posiblemente relacionada con el costo de su producción. No encontraron sinergismo (interacción positiva entre ambos alcaloides). Los patrones de selección variaban en presencia y ausencia de insectos, indicando que éstos están actuando como agentes selectivos. Esto contrasta con un estudio donde manipularon genéticamente los niveles de escopolamina en otra especie de la familia de las solanáceas, *Atropa belladonna*,

alcanzando niveles tres veces mayores a los que encontraron en *D. stramonium*, y encontraron una relación negativa de ésta con el daño por herbivoría. Castillo *et al.* (2013) encuentran que aquellas poblaciones con niveles más altos de atropina reciben más daño en poblaciones del centro de México.

El grado de especialización de los herbívoros presentes en las poblaciones de *D. stramonium* da lugar a una variedad de mosaicos geográficos de selección natural, pues se espera que ejerzan presiones selectivas contrastantes sobre los caracteres defensivos de las plantas (Ali y Agrawal, 2012). Estudios con poblaciones en el área nativa (México) (Valverde *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2014) demuestran que existe variación geográfica en el valor adaptativo de los caracteres de defensa. El estudio de Castillo *et al.* (2014) encuentra que los patrones de selección varían cuando las plantas están en presencia de herbívoros especialistas (*Epitrix parvula* (Coleoptera: Chrysomelidae) y *L. trilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae)), donde existe selección en contra de la concentración de escopolamina, mientras que en presencia del saltamontes generalista *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) se selecciona a favor. La atropina, alcaloide menos derivado, es seleccionado en contra, tanto en poblaciones con especialistas como en poblaciones con generalistas.

Los tricomas foliares son proyecciones epidérmicas (Evert, 2006) que constituyen otro componente de la defensa, pues evitan también el daño por herbívoros (Levin, 1973; Johnson 1975; Rodríguez *et al.* 1984; Marquis 1992; Mauricio 1997; Valverde *et al.* 2001; Handley *et al.*, 2005; Holeski, 2007; Kariño-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015). Se trata de caracteres constitutivos (Elle *et al.* 1999) determinados por un solo gen dominante (van Dam *et al.* 1999). Se ha reportado que en poblaciones de *D. stramonium* en México existe una correlación negativa entre densidad de tricomas y proporción de daño foliar (Valverde *et al.*, 2001; Kariño-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015). Esta relación varía entre poblaciones y a través del tiempo, dando lugar a un escenario selectivo dinámico (Castillo *et al.*, 2013). La densidad de tricomas foliares también repercute en la adecuación de los individuos, pero sólo en algunos casos. Castillo *et al.* (2014) encontraron selección a favor de la densidad de tricomas en dos de ocho poblaciones estudiadas, y selección en contra en una población donde estaba *E. parvula*, mientras que Valverde *et al.* (2001) reportan una correlación negativa entre densidad de tricomas y proporción de daño foliar en seis

poblaciones también del centro de México. Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán (2015) encuentran selección direccional a favor de la densidad de tricomas aún en ausencia de herbívoros. Esto podría sugerir que los tricomas cumplen con otra función, como podría ser la retención de humedad (Ehleringer *et al.*, 1976; Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015), y no supondrían un costo en ausencia de depredadores. También reportan heredabilidad alta ( $h^2=0.641$ ) y variación genética para este rasgo (Valverde *et al.*, 2001; Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015), lo cual apoya la idea de que puede evolucionar sin restricciones por selección natural.

El valor adaptativo de la resistencia en ésta y otras especies ha sido demostrado por numerosos estudios. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se encuentra una relación significativa negativa entre daño y adecuación (Mauricio y Rausher, 1997). En *D. stramonium*, Valverde *et al.* (2001) estimaron selección positiva sobre la resistencia en tres de seis poblaciones mexicanas, y en un estudio posterior (Valverde *et al.*, 2003) reportan selección a favor de la resistencia en una de tres poblaciones estudiadas. Fornoni *et al.* (2004) detectaron que en la población con mayores niveles de resistencia en el centro de México, Ticumán, ésta está siendo favorecida por selección natural, lo cual a su vez está relacionado con una mayor cantidad de herbívoros especialistas que generalistas en esa región.

## MÉTODO

### Sistema de estudio

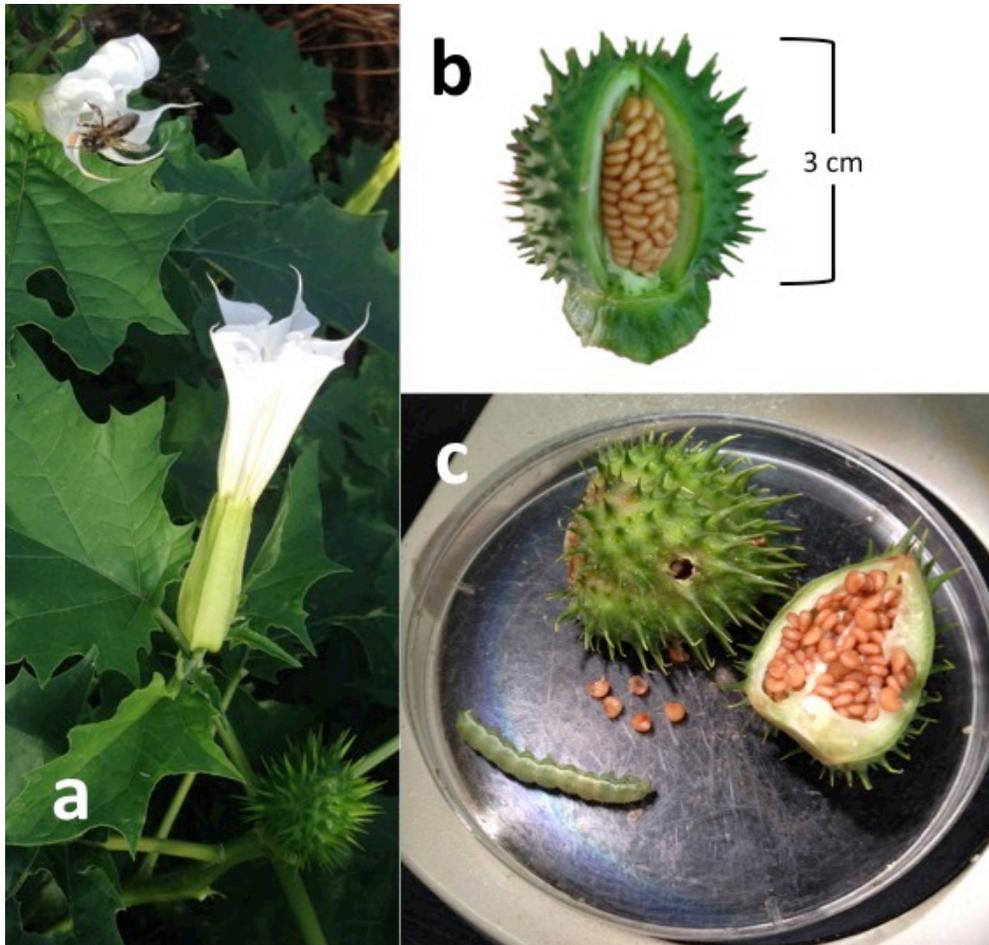
*Datura stramonium* L. (Solanaceae) es una planta anual nativa de México (Jiao *et al.*, 2002), actualmente tiene una amplia distribución en el mundo (van Kleunen *et al.*, 2007). Crece en ambientes ricos en nitrógeno, como cultivos y ambientes perturbados (Shonle y Bergelson, 2000). Alcanza en promedio un metro de altura (Núñez-Farfán, 1991) aunque puede alcanzar los dos metros (Castillo *et al.*, 2013). Presenta ramificación dicotómica falsa. Las hojas presentan bordes dentados y son color verde oscuro.

**Figura 1.** Ejemplar de *Datura stramonium*.



Las flores son tubulares y existen dos fenotipos: violetas o blancas. El fruto es una cápsula espinosa dehiscente, dividido en cuatro valvas donde están contenidas una gran cantidad de semillas (Núñez-Farfán, 1991). Se reproduce principalmente por autofertilización (Motten y Antonovics, 1992), aunque sus flores son visitadas por abejas y mariposas nocturnas (van Kleunen *et al.*, 2007).

**Figura 2.** Flores y frutos de *D. stramonium*. a) flores siendo polinizadas por *Apis mellifera*. b) fruto con corte mostrando semillas. c) fruto infestado con larva de *Helicoverpa armigera*.



En su área de distribución nativa, su tejido foliar es consumido principalmente por dos herbívoros especialistas: *Epitrix parvula* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Núñez Farfán y Dirzo, 1994) y *Lema trilineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Núñez-Farfán, 2005), así como los generalistas *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Valverde *et al.*, 2003) y *Trichobaris sp.* (Coleoptera: Curculionidae) (Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015).

Presenta compuestos químicos (tropano-alcaloides) y estructuras físicas (tricomas) que pueden prevenir el daño por herbivoría (Shonle y Bergelson, 2000; Valverde *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2013, Castillo *et al.*, 2014; Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015). La concentración de alcaloides en el tejido foliar cambia a lo largo de la ontogenia de los individuos, alcanzando los máximos niveles al momento de la floración (Conklin, 1976, Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015) independientemente de los niveles de daño foliar a los que sean sometidas las plantas (Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015).

### Poblaciones muestreadas

Catorce poblaciones de *D. stramonium* en el sur de España fueron muestreadas de Septiembre a Noviembre en el 2010 y en el 2011, periodo que comprende la etapa reproductiva de la esta especie. El área de estudio presenta un clima tipo mediterráneo, pero las poblaciones diferían en hábitat y condiciones ambientales (Tabla 1), cubriendo así un amplio espectro climático desde regiones secas del este (con aproximadamente 200mm de precipitación anual) hasta regiones más húmedas en el oeste (con más de 800mm de precipitación anual). Las poblaciones muestreadas se encontraban en las regiones de Andalucía, Extremadura y Murcia (Figura 3).

**Figura 3.** Poblaciones muestreadas en España y su tipo de clima.



En cada población se colectó una muestra de plantas maduras (media tamaño muestral  $\pm$  error estándar:  $26.2 \pm 1.6$  individuos). En cada individuo se tomó una muestra aleatoria de 8 a 40 hojas (dependiendo del tamaño del individuo) y se colectaron todos los frutos. La distancia linear entre pares de poblaciones fue de 5 a 468 kms.

**Tabla 1.** Nombres de las poblaciones, provincia, ubicación geográfica y condiciones ambientales de las 14 poblaciones de *Datura stramonium* muestreadas en España. *n* = tamaño de muestra.

Poblaciones (Provincia)( <i>n</i> )	Fecha de Colecta	Herbívoros	Coordenadas Geográficas	Hábitat	Altitud (msnm)	Precipitación Anual Media (mm) <sup>1</sup>	Temperatura Anual Media (°C) <sup>1</sup>
1. Hinojos 1 (Huelva)(18)	Septiembre 2010	1	37°18'0.39"N 6°22'41.72"W	ribera	67	503.3	18
2. Hinojos 2 (Huelva)(22)	Septiembre 2010	1	37°19'28.36"N 6°25'32.45"W	ribera	88	515.8	18
3. Bolonia (Cádiz)(30)	Septiembre 2010	1	36°5'9.99"N 5°46'7.57"W	arroyo en costa	3	693.3	18
4. Gerena (Sevilla)(30)	Octubre 2010	1	37°31'28.86"N 6°11'24.76"W	ribera	55	501.6	18
5. Zúbia (Granada)(28)	Noviembre 2010	1	37°7'47.28"N 3°35'57.06"W	orilla de cultivo	692	337.5	15
6. Castañuelos (Huelva)(9)	Noviembre 2010	1	37°56'19.83"N 6°35'2.97"W	orilla de bosque de roble	437	825.8	16
7. El Higueral (Almería)(30)	Septiembre 2011	1	37°23'12.61"N 2°29'56.48"W	ribera estacional	880	255	14
8. Pinilla de San José (Murcia)(30)	Septiembre 2011	1	37°41'3.10"N 1°17'0.62"W	basurero	240	236.6	17
9. Puebla de Don Fadrique (Granada)(25)	Septiembre 2011	1	37°57'39.75"N 2°26'8.75"W	huerto abandonado	1161	422.5	13
10. Lora del Río (Sevilla)(28)	Octubre 2011	1	37°39'33.28"N 5°32'5.93"W	ribera	36	483.3	18
11. El Pedroso (Sevilla)(30)	Octubre 2011	1, 2, 3, 6	37°50'12.81"N 5°45'58.67"W	orilla carretera	383	501.6	17
12. Cardeña (Córdoba)(28)	Octubre 2011	1, 2, 5	38°14'56.63"N 4°12'58.45"W	ribera seca	351	645.8	17
13. Valdeflores (Sevilla)(30)	Octubre 2011	1, 3, 4	37°43'2.23"N 6°18'50.44"W	ribera	287	598.2	17
14. Cabeza La Vaca (Badajoz)(29)	Noviembre 2011	1	38°6'48.00"N 6°24'23.36"W	ribera	548	625	16

<sup>1</sup> Datos tomados de Ninyerola *et al.* (2005)

## **Estimación del daño**

En cada una de las muestras de hojas colectadas se estimó la proporción de daño por herbívoros por planta ( $P_i$ ). Utilizando el software de análisis de imágenes *Image J* (NIH) se midió el área foliar remanente de cada hoja ( $AFR_i$ ) y el área total de la hoja ( $AFT_i$ ). La proporción de daño foliar ( $P_i$ ) se estimó dividiendo el  $AFR_i$  sobre el  $AFT_i$ .

## **Estimación de la densidad de tricomas (resistencia física)**

Se seleccionaron al azar 10 hojas por cada una de las plantas para obtener la densidad de tricomas foliares en la superficie adaxial. En cada hoja se seleccionó un campo de  $2.5\text{mm}^2$  para contar el número de tricomas usando un microscopio estereoscópico (Valverde *et al.*, 2001).

## **Determinación de concentraciones de tropano alcaloides (resistencia química)**

Para cada uno de los individuos de cada población se colectó el tejido foliar (de 8 a 40 hojas completamente expandidas, dependiendo del tamaño del individuo), manteniéndolo en hielo para después ser congelado y posteriormente secado a temperatura ambiente (Agrawal y Fishbein, 2006). Se cuantificó la concentración de alcaloides (atropina y escopolamina) para cada individuo de cada población. Para ello se midió la concentración de ambos alcaloides en 10 hojas maduras por individuo. Los alcaloides fueron extraídos del material vegetal mediante una reacción ácido-base (Bruneton, 2001). Los extractos fueron analizados en un HPLC (HP/Agilent 1100), utilizando una columna Discovery C-18 (Supelco Analytical) de fase reversa. La fase móvil consistió en una solución de acetonitrilo, metanol 30 mM y un amortiguador de fosfatos a pH 6. Los cromatogramas que se obtuvieron de cada muestra fueron comparados con los de dos soluciones estándar de concentración de escopolamina y atropina conocida (Sigma-Aldrich SA de CV) (Castillo *et al.*, 2013).

## **Análisis Estadísticos**

Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias entre poblaciones respecto al daño foliar relativo, la densidad de tricomas foliares y la concentración de atropina y escopolamina. Para comparar las diferencias entre el área nativa (*Castillo et al.*, 2013) y el área de introducción se realizaron pruebas de t de Student con las medias de las poblaciones de cada lugar de origen para cada uno de los caracteres medidos. Los valores de frutos, semillas, densidad de tricomas y concentración de alcaloides fueron previamente transformados a logaritmo base 10, mientras que el daño y la resistencia se transformaron a arcoseno (Sokal y Rohlf, 1994).

Para calcular los gradientes de selección direccional en cada población se utilizaron análisis de regresión múltiple siguiendo el procedimiento de Lande y Arnold (1983). Los gradientes de selección lineal fueron estimados a partir de los coeficientes de regresión parcial estandarizados ( $\beta$ ). Los valores de resistencia relativa (calculada como 1 - porcentaje de daño foliar), densidad de tricomas, concentración de atropina y concentración de escopolamina fueron estandarizados previo a los análisis y las medidas de adecuación, número de frutos y semillas, relativizados por población utilizando la fórmula: daño relativo = (Número total de semillas o frutos - Media de la población para este rasgo) / Desviación Estándar (Lande y Arnold, 1983).

Debido al tamaño muestral de cada población ( $n \leq 30$  individuos), únicamente se estimaron los gradientes de selección direccional. Los gradientes estandarizados de selección lineal ( $\beta$ ) se obtuvieron ajustando una regresión lineal, donde la adecuación se consideró como la variable de respuesta y los tres caracteres que componen a la defensa como las variables predictivas (*Castillo et al.*, 2014).

Como estimadores de la adecuación, se utilizó tanto el número de frutos como el número de semillas con el fin de que los resultados fueran comparables con estudios previos realizados en el área nativa de la especie. El número de semillas fue estimado a partir del volumen del fruto utilizando la ecuación correspondiente al volumen de un esferoide prolato y multiplicando éste por una constante calculada previamente.

$$\text{Volumen del fruto (V)} = \frac{4}{3} \pi a^2 b$$

donde a= radio del fruto  
b= largo del fruto

$$\text{Número de semillas por fruto} = V * 0.026$$

## RESULTADOS

### Variación entre Poblaciones

Se encontraron diferencias significativas en el daño relativo por herbívoros entre poblaciones españolas ( $F_{13,360} = 19.79$ ,  $P < 0.0001$ ). Los niveles de daño fueron bajos ( $\bar{x} \pm DE$ :  $0.02 \pm 0.0312$ , alcanzando un máximo de 0.2) (Figura 4). Al momento de la colecta, fue posible identificar a seis especies de invertebrados fitófagos alimentándose sobre las plantas (Tabla 1). En todas las poblaciones el daño fue causado principalmente por la larva de mariposa nocturna generalista *Helicoverpa armigera* Hübner (Noctuidae: Lepidoptera), que consume tanto el tejido foliar como las semillas (P. L. Valverde, comunicación personal).

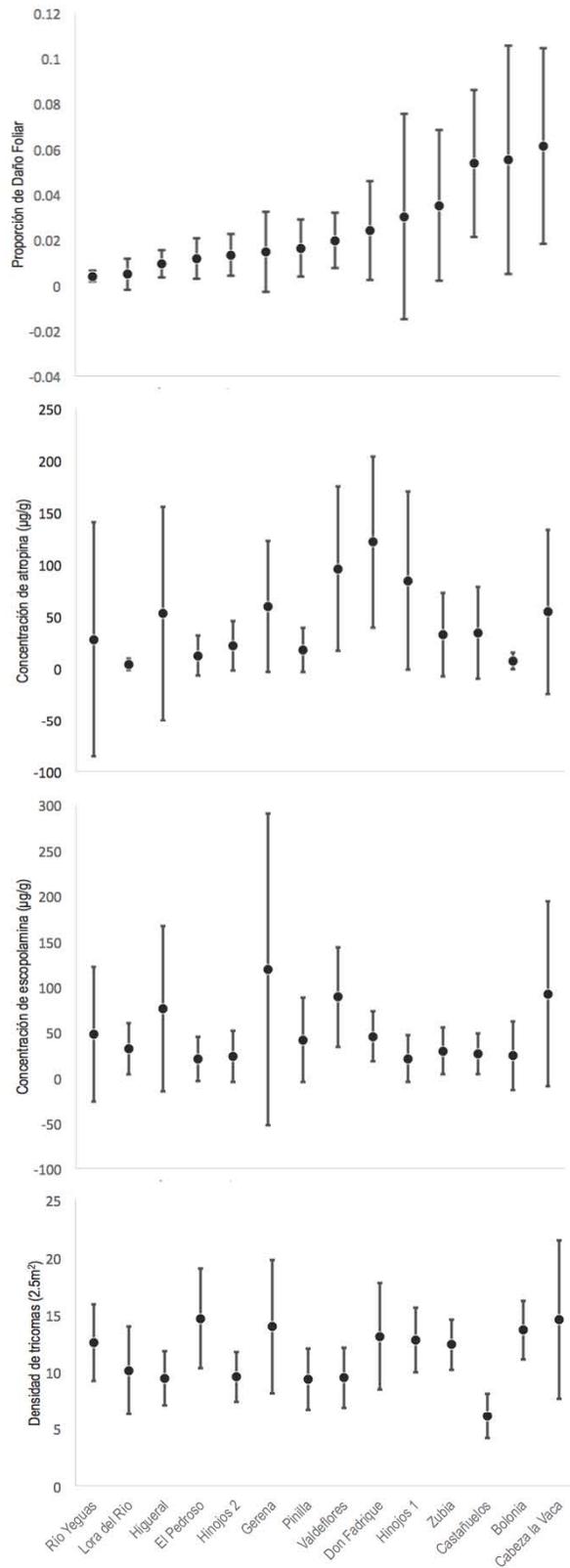
**Tabla 2.** Insectos reportados en las 14 poblaciones de *Datura stramonium* muestreadas en España.

Nombre	Clase	Autoridad	Orden
<i>Helicoverpa armigera</i>		Hubner, 1808	Lepidoptera
1. <i>armigera</i>		Linnaeus, 1758	Hemiptera
2. <i>Nezara viridula</i>	Insecta	Linnaeus, 1758	Hemiptera
3. <i>Pyrrhocoris apterus</i>		Germar, 1817	Coleoptera
4. <i>Coniatus repandus</i>		Serville, 1831	Orthoptera
5. <i>Phaneroptera</i> sp.		Müller, 1774	Pulmonata
6. <i>Theba pisana</i>	Gastropoda		

La densidad de tricomas por  $2.5\text{mm}^2$  ( $\bar{x} \pm DE$ ) fue de  $15.07 \pm 9.2$ , el valor mínimo fue de 1.06 tricomas x  $2.5\text{mm}^2$  y el máximo fue de 77.83 tricomas x  $2.5\text{mm}^2$ . El análisis de varianza detectó diferencias entre poblaciones para este carácter ( $F_{13,360} = 11.13$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figura 4). La concentración promedio de atropina por gramo de peso seco de tejido foliar ( $\bar{x} \pm DE$ ) fue de  $43.39 \pm 73.03 \mu\text{g/g}$ , en un rango entre el 0 y un máximo de  $621.91 \mu\text{g/g}$  (Figura 4). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de atropina entre poblaciones ( $F_{12,352}=8.85$ ,  $P < 0.0001$ ). La concentración promedio de escopolamina por gramo de peso seco de tejido foliar ( $\bar{x} \pm DE$ ) fue de  $51.58 \pm 77.27 \mu\text{g/g}$  en un rango desde el 0 al  $772.19 \mu\text{g/g}$  (Figura 4). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de escopolamina entre poblaciones ( $F_{12,352} = 5.99$ ,  $P < 0.0001$ ).

Las pruebas de de t de Student probaron que no existen diferencias significativas entre poblaciones respecto al año de colecta.

**Figura 4.** Media y desviación estándar para el porcentaje de daño foliar y los componentes de la defensa de las 14 poblaciones españolas estudiadas de *Datura stramonium* ordenadas de manera ascendente según sus niveles de daño foliar promedio.



### **Relación de los caracteres de defensa con las variables climáticas**

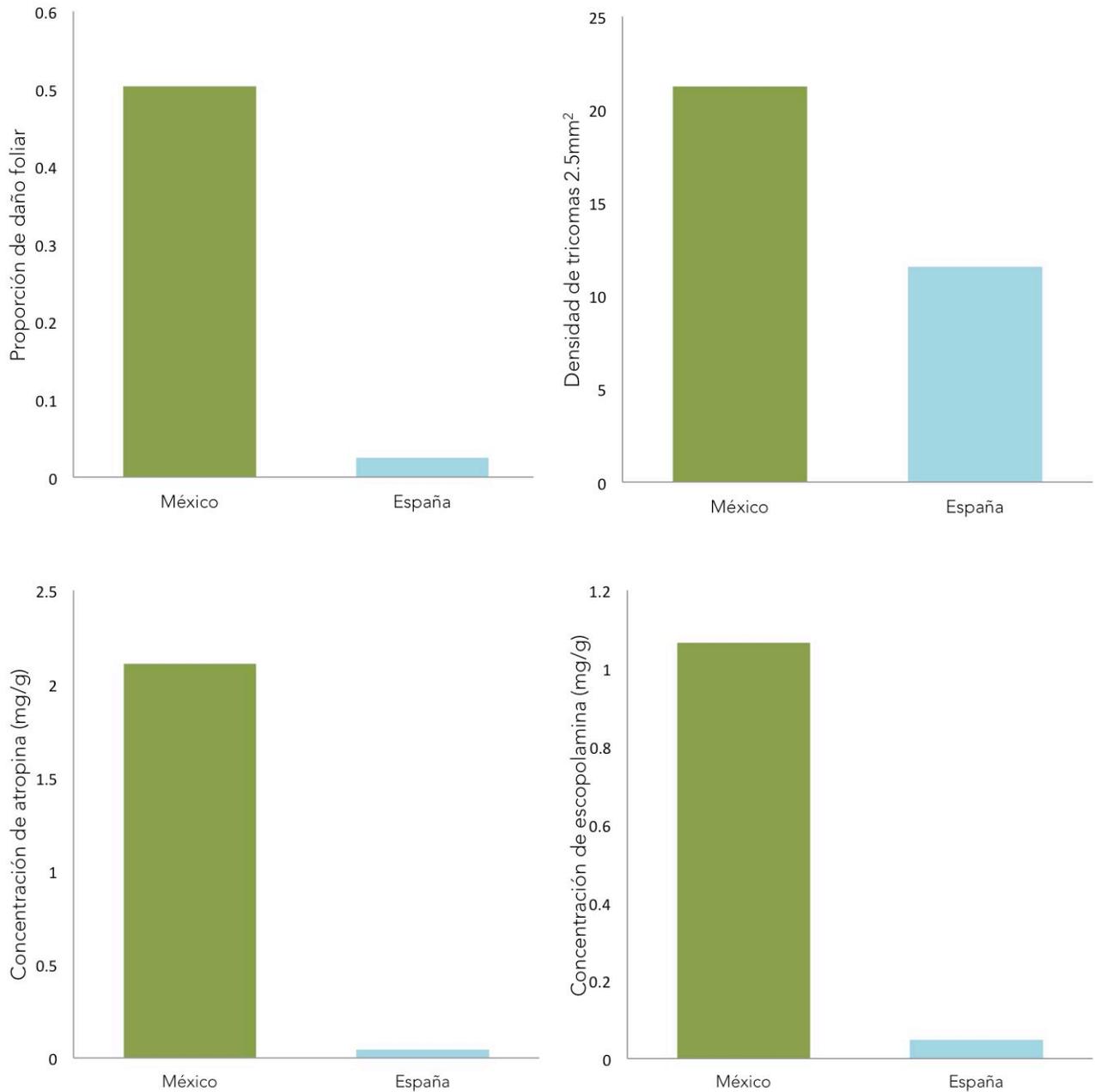
No se encontró que ninguno de los caracteres de defensa estuviera correlacionado con ninguna de las variables climáticas medidas (precipitación anual promedio y temperatura anual promedio) ( $P > 0.05$ )

### **Diferencias entre México y España**

Las pruebas de  $t$  revelaron diferencias significativas entre los niveles de daño y los atributos defensivos entre poblaciones españolas y los valores reportados por Castillo *et al.* (2013) para poblaciones mexicanas de *D. stramonium*. Se encontraron diferencias en daño ( $t = 1.73$ ,  $P < 0.0001$ ), siendo éste menor en plantas españolas que en mexicanas, para las cuales se reportan ( $\bar{x} \pm DE$ ) porcentajes de  $0.5 \pm 0.056$ . También se encontraron diferencias significativas entre los componentes de la defensa en ambos continentes: densidad de tricomas ( $t = 1.74$ ,  $P = 0.00075$ ), concentración de atropina ( $t = 1.73$ ,  $P < 0.0001$ ) y concentración de escopolamina ( $t = 1.74$ ,  $P < 0.0001$ ). Para todos ellos, los valores medios fueron menores en poblaciones españolas (véase Castillo *et al.*, 2013).

Las pruebas de  $t$  de Student mostraron que no existen diferencias significativas entre las condiciones climáticas reportadas para las poblaciones mexicanas y aquellas reportadas para las españolas.

**Figura 5.** Diferencias entre las 14 poblaciones españolas muestreadas y los valores reportados por Castillo et al. (2013) para poblaciones mexicanas respecto a proporción de daño foliar, densidad de tricomas, concentración de atropina y concentración de escopolamina



## **Efecto de los caracteres defensivos sobre el daño relativo**

Se encontró una relación significativa negativa entre densidad de tricomas y proporción de daño foliar en Castañuelos ( $F_{1,7} = 14.13, P = 0.0071$ ), y marginalmente negativa para Gerena ( $F_{1,28} = 3.86, P = 0.0594$ ). Sólo se detectó una relación positiva y marginalmente significativa entre atropina y daño en El Pedroso ( $F_{1,28} = 3.78, P = 0.062$ ) e Hinojos 1 ( $F_{1,16} = 3.78, P = 0.067$ ). Entre daño y escopolamina no se encontró ninguna relación significativa en ninguna de las poblaciones.

Respecto al efecto de los atributos defensivos sobre la proporción de daño, no se encontró que la interacción entre población y los caracteres fuera significativa para ninguno de ellos, lo cual significa que el efecto de la concentración de atropina, de escopolamina y la densidad de tricomas foliares sobre el daño es igual en todas las poblaciones.

## **Relación entre componentes de la defensa**

Se encontró una relación positiva entre densidad de tricomas y concentración de atropina en Puebla de Don Fadrique ( $r = 0.507, F_{1,23} = 7.97, P = 0.0069$ ), Lora del Río ( $r = 0.39, F_{1,27} = 14.32, P = 0.0008$ ) y en Higueral ( $r = 0.402, F_{1,28} = 5.41, P = 0.0275$ ). Se encontró una relación negativa significativa entre densidad de tricomas y concentración de escopolamina en Pinilla ( $r = 0.374, F_{1,28} = 4.56, P = 0.0416$ ). A excepción de Valdeflores y Castañuelos, se detectó una relación positiva altamente significativa entre concentración de atropina y concentración de escopolamina ( $0.517 > r > 0.84, P = 0.0048$ ).

## **Selección sobre la resistencia**

Al utilizar la cantidad de frutos por individuo como estimador de la adecuación, se encontró una relación significativa a favor de la resistencia en Hinojos 2 ( $F_{1,20} = 9.99, P = 0.0049$ ) y en La Zubia ( $F_{1,28} = 7.45, P = 0.011$ ). Al utilizar la cantidad de semillas como estimador de

adecuación, se detectó selección positiva sobre la resistencia en La Zubia ( $F_{1,28} = 5.44$ ,  $P = 0.0271$ ). En Valdeflores esta relación fue positiva pero marginalmente significativa ( $F_{1,28} = 3.66$ ,  $P = 0.066$ ). No se encontró que existiera variación interpoblacional en la selección sobre la resistencia para ninguno de los dos estimadores de adecuación.

## Gradientes de selección direccional

Los análisis de regresión múltiple mostraron que existe selección direccional significativa sobre, por lo menos, uno de los componentes de la defensa en dos de catorce poblaciones al usar frutos como estimador de adecuación, y en dos de catorce poblaciones al usar las semillas (Tabla 3). Estimando la adecuación como frutos, se encontró que en Hinojos 1 la concentración de atropina se está seleccionando en contra y la concentración de escopolamina a favor (Tabla 3), mientras que en La Zubia, se seleccionan en contra la concentración de atropina y la densidad de tricomas (Tabla 3). Al estimar la adecuación como número de semillas se encontró selección en contra de la concentración de atropina y de la densidad de tricomas en La Zubia, y selección positiva marginalmente significativa sobre la concentración de escopolamina en Hinojos 2 ( $P = 0.0599$ ) y sobre la densidad de tricomas en Bolonia ( $P = 0.058$ ). Al corregir por Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1994), la significancia de los gradientes de selección reportados utilizando frutos como estimadores de la adecuación se mantiene ( $\alpha = 0.016$  para Hinojos 1 y  $\alpha = 0.0112$  para La Zubia), pero para los análisis donde se usó el número de semillas como estimador de la adecuación se pierde la significancia en La Zubia ( $\alpha = 0.016$ ).

Los análisis de selección correlativa revelaron selección a favor de la interacción de la concentración de atropina con la concentración de escopolamina en La Zubia, para ambos estimadores de adecuación ( $\gamma_{ij} = 0.399$ ,  $EE = 0.187$ ,  $t = 2.14$  y  $P = 0.0441$  para semillas, y  $\gamma_{ij} = 0.362$ ,  $EE = 0.157$ ,  $t = 2.31$  y  $P = 0.0305$  para frutos).

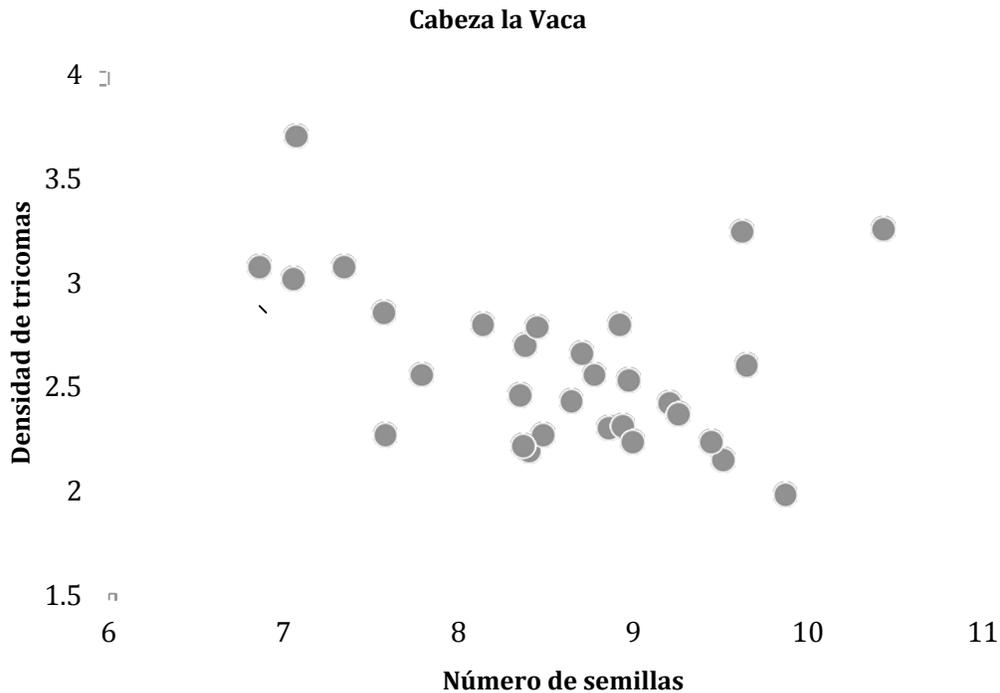
**Tabla 3.** Gradientes de selección direccional sobre los componentes de la defensa en 14 poblaciones españolas de *D. stramonium*.

Población		adecuación = número de frutos				adecuación = número de semillas			
		$\beta$	ES	t	P	$\beta$	ES	t	P
Hinojos 1	Atropina	<b>-1.057</b>	<b>0.368</b>	<b>-2.88</b>	<b>0.0122</b>	-0.999	0.696	-1.44	0.1730
	Escopolamina	<b>0.837</b>	<b>0.353</b>	<b>2.37</b>	<b>0.0327</b>	0.888	0.668	1.33	0.2050
	Tricommas	0.125	0.257	0.49	0.6346	0.181	0.486	0.37	0.7161
Hinojos 2	Atropina	-0.262	0.238	-1.10	0.2879	-0.237	0.225	-1.05	0.3084
	Escopolamina	0.244	0.214	1.14	0.2691	0.408	0.202	2.02	0.0599
	Tricommas	0.054	0.148	0.36	0.7218	-0.027	0.140	-0.20	0.8469
Bolonia	Atropina	-0.412	0.252	-1.63	0.1145	-0.565	0.306	-1.57	0.1282
	Escopolamina	0.31	0.255	1.21	0.2359	-0.036	0.363	-0.10	0.9216
	Tricommas	0.336	0.227	1.48	0.1501	0.641	0.322	1.99	0.0577
Gerena	Atropina	-0.199	0.258	-0.77	0.4484	-0.187	0.311	-0.60	0.5523
	Escopolamina	0.176	0.254	0.69	0.4952	0.1917	0.306	0.63	0.5364
	Tricommas	0.126	0.210	0.60	0.5537	0.011	0.253	0.04	0.9670
Zubia	Atropina	<b>-0.621</b>	<b>0.227</b>	<b>-2.74</b>	<b>0.0112</b>	<b>-0.644</b>	<b>0.269</b>	<b>-2.39</b>	<b>0.0246</b>
	Escopolamina	0.169	0.231	0.74	0.4706	0.137	0.274	0.50	0.6227
	Tricommas	<b>-0.428</b>	<b>0.176</b>	<b>-2.43</b>	<b>0.0224</b>	<b>-0.471</b>	<b>0.208</b>	<b>-2.26</b>	<b>0.0328</b>
Castañuelos	Atropina	-0.358	0.336	-1.07	0.3351	-0.453	0.29	-1.56	0.1797
	Escopolamina	-0.258	0.336	-0.77	0.4774	-0.045	0.290	-0.15	0.8830
	Tricommas	-0.544	0.307	-1.77	0.1367	-0.504	0.265	-1.90	0.1157
Higueral	Atropina	-0.352	0.251	-1.41	0.1715	-0.435	0.359	-1.18	0.2479
	Escopolamina	0.011	0.245	0.04	0.9661	-0.047	0.0351	-0.13	0.8942
	Tricommas	-0.129	0.225	-0.57	0.5707	-0.126	0.322	-0.39	0.6980
Pinilla	Atropina	-0.237	0.336	-0.70	0.4877	-0.280	0.445	-0.63	0.5344
	Escopolamina	0.464	0.338	1.38	0.1818	0.584	0.446	1.31	0.2029
	Tricommas	0.299	0.260	1.15	0.2610	0.345	0.343	1.01	0.3218
Don Fadrique	Atropina	-0.283	0.378	-0.75	0.4617	-0.266	0.525	-0.51	0.6175
	Escopolamina	-0.177	0.356	-0.50	0.6252	-0.337	0.495	-0.68	0.5029
	Tricommas	-0.381	0.311	-1.22	0.2350	-0.521	0.433	-1.21	0.2416
Lora del Río	Atropina	-0.204	0.200	-1.02	0.3183	-0.316	0.251	-1.26	0.2191
	Escopolamina	0.035	0.167	0.21	0.8351	0.085	0.210	0.41	0.6883
	Tricommas	0.054	0.178	0.30	0.7629	-0.115	0.223	-0.51	0.6112
El Pedroso	Atropina	-0.481	0.252	-1.90	0.0680	-0.497	0.315	-1.58	0.1267
	Escopolamina	0.160	0.250	0.64	0.5293	0.168	0.313	0.54	0.5965
	Tricommas	-0.186	0.175	-1.06	0.2973	-0.313	0.218	-1.44	0.1629
Cardeña	Atropina	-0.070	0.285	-0.25	0.8070	-0.162	0.328	-0.49	0.6255
	Escopolamina	-0.105	0.268	-0.39	0.6983	-0.068	0.308	-0.22	0.8279
	Tricommas	-0.016	0.225	-0.07	0.9455	0.085	0.259	0.33	0.7458
Valdeflores	Atropina	-0.012	0.157	-0.07	0.9413	-0.074	0.176	-0.42	0.6782
	Escopolamina	0.102	0.161	0.64	0.5297	0.135	0.180	0.75	0.4601
	Tricommas	0.125	0.151	0.83	0.4146	0.108	0.170	0.64	0.5289
Cabeza la Vaca	Atropina	-0.304	0.235	-1.29	0.2075	-0.306	0.195	-1.57	0.1282
	Escopolamina	0.0127	0.237	0.05	0.9579	0.044	0.296	0.22	0.8246
	Tricommas	0.257	0.213	1.21	0.2386	0.042	0.176	0.24	0.8134

## Costos de la defensa

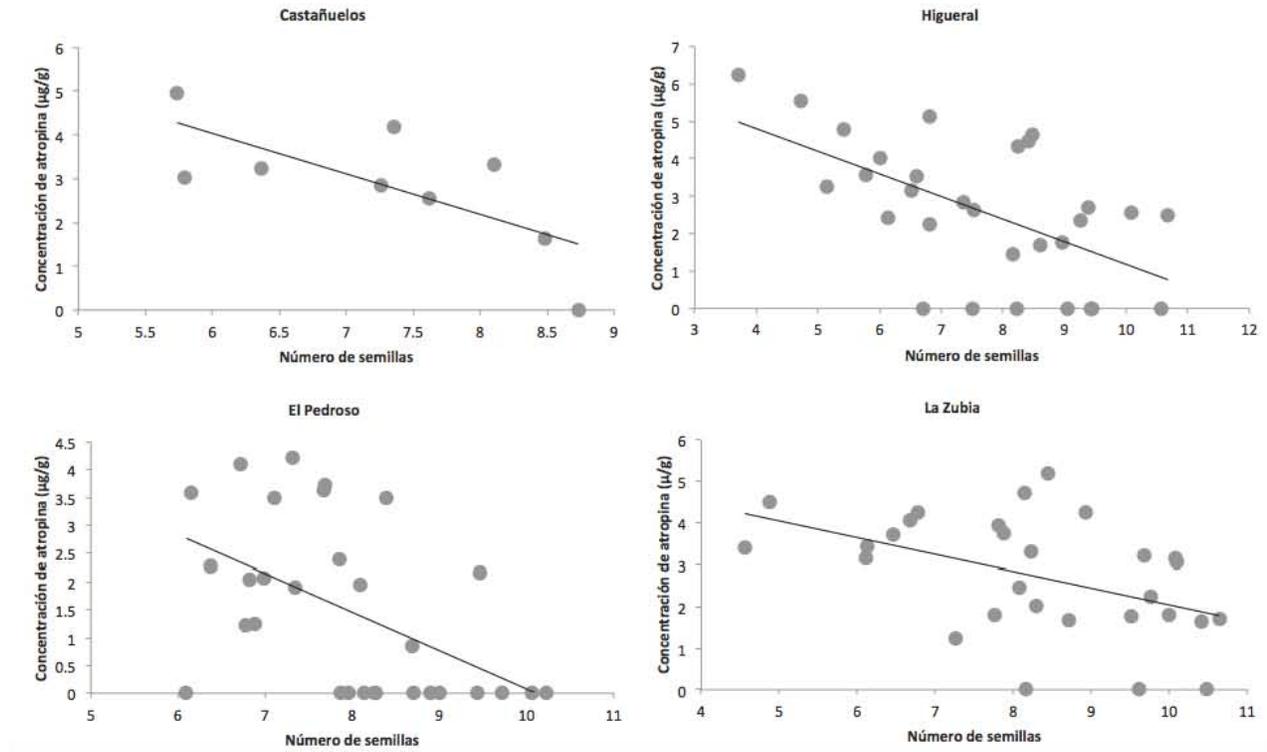
Se encontró una relación marginalmente negativa entre la densidad de tricomas y el número de frutos en Castañuelos ( $F_{1,7} = 4.31$ ,  $P = 0.077$ ) y Don Fadrique ( $F_{1,23} = 3.43$ ,  $P = 0.077$ ). Se encontró relación negativa con el número de semillas en Cabeza La Vaca ( $F_{1,28} = 4.36$ ,  $P = 0.046$ ), marginal negativa en Don Fadrique ( $F_{1,23} = 3.51$ ,  $P = 0.074$ ), El Pedroso ( $F_{1,28} = 3.205$ ,  $P = 0.0843$ ) e Higueral ( $F_{1,28} = 3.59$ ,  $P = 0.068$ ).

**Figura 6.** Relación entre densidad de tricomas foliares y número de semillas en la población Cabeza La Vaca.

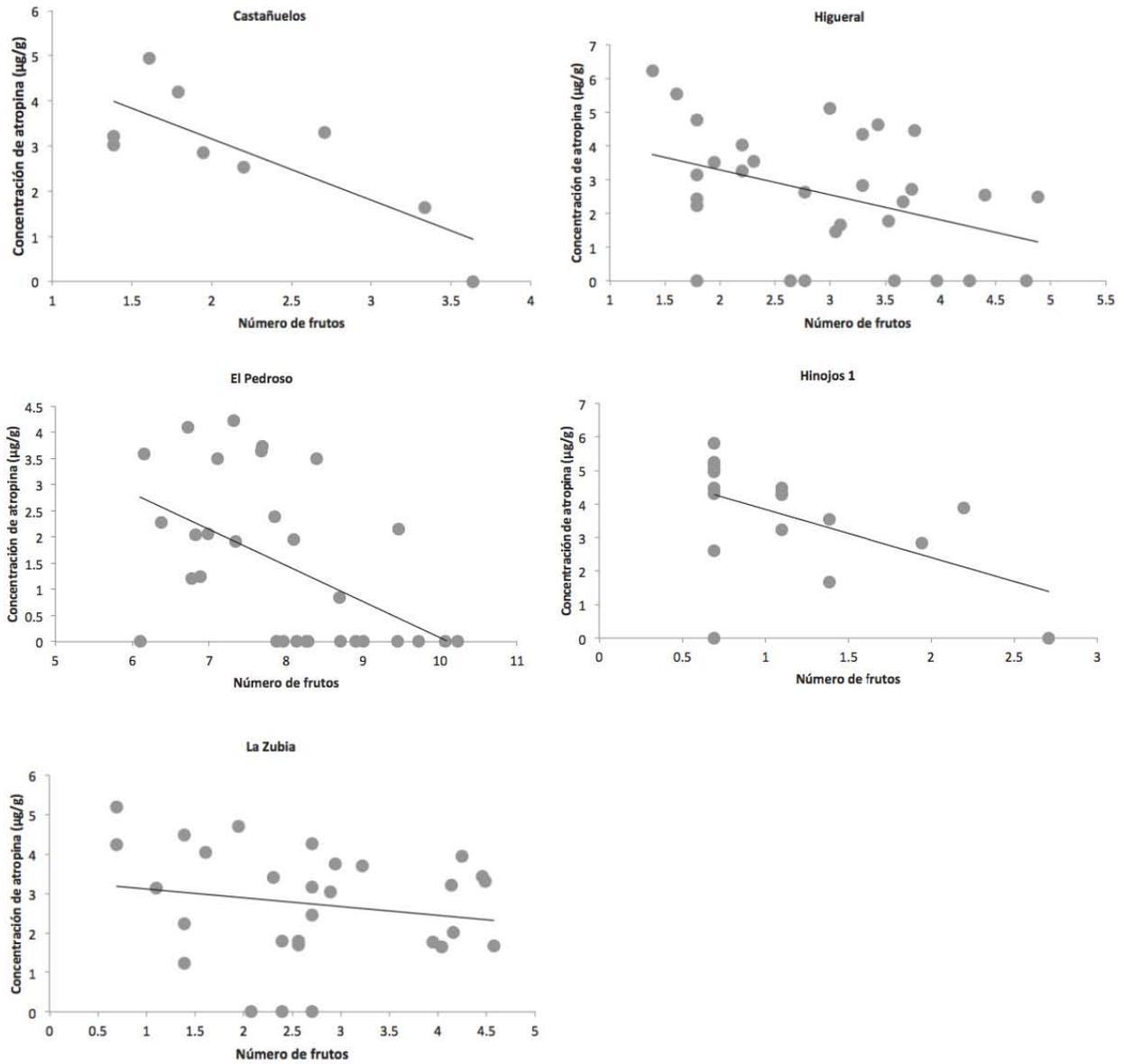


Se encontró una relación significativa negativa entre concentración de atropina y número de frutos en Castañuelos ( $F_{1,7} = 11.49$ ,  $P = 0.0116$ ), El Pedroso ( $F_{1,28} = 11.66$ ,  $P = 0.0020$ ), Higueral ( $F_{1,28} = 5.33$ ,  $P = 0.0286$ ), Hinojos 1 ( $F_{1,16} = 5.658$ ,  $P = 0.0302$ ) y La Zubia ( $F_{1,364} = 8.98$ ,  $P = 0.0355$ ). Midiendo adecuación como número de semillas, se encontró una relación significativa negativa en Castañuelos ( $F_{1,7} = 7.43$ ,  $P = 0.0295$ ), El Pedroso ( $F_{1,28} = 9.96$ ,  $P = 0.0038$ ), Higueral ( $F_{1,28} = 14.3$ ,  $P = 0.0008$ ) y La Zubia ( $F_{1,27} = 7.59$ ,  $P = 0.0104$ ).

Figura 7. Costos en número de semillas de la concentración de atropina.



**Figura 8.** Costos en número de frutos de la concentración de atropina.



## Diferencias en Selección

Posteriormente, se examinaron los gradientes de selección sobre los caracteres que componen la defensa entre ambos continentes, únicamente para aquellas poblaciones donde se hubiese detectado selección. Para la concentración de atropina se encontraron diferencias significativas entre poblaciones mexicanas (Acolman, Patria Nueva, Santo Domingo y Valsequillo) y Españolas (Hinojos 1 y La Zubia), siendo mayor la intensidad de selección negativa en las poblaciones de España ( $t = 2.24, P = 0.044$ ). No se encontraron diferencias en la selección sobre la concentración de escopolamina ( $t = -0.81, P = 0.717$ ) ni en la selección sobre la densidad de tricomas ( $t = -0.403, P > 0.5$ ).

## DISCUSIÓN

Las poblaciones españolas de *D. stramonium* difieren entre sí en la magnitud de los caracteres medidos, situación que se reporta también para las poblaciones mexicanas (Castillo *et al.*, 2013). Esto puede deberse a las diferencias en las especies de herbívoros presentes en cada población, a que se han originado por distintos eventos de colonización o a otro tipo de presiones ambientales. Las diferencias en la disponibilidad de recursos en cada población da lugar a la variación en los costos y beneficios de la producción de la defensa, lo cual a su vez repercute en la magnitud y dirección de la selección sobre ésta (Fornoni *et al.*, 2004).

De acuerdo con lo esperado, los valores de los componentes de la defensa (alcaloides y tricomas) fueron significativamente menores a los reportados en el área nativa de *D. stramonium* (Castillo *et al.*, 2013). Esto concuerda con lo predicho por la HLE, pues parece indicar que, una vez relajada la presión selectiva ejercida por los herbívoros especialistas en el área de introducción, se han favorecido por selección natural aquellos genotipos que asignan menos recursos energéticos a la producción de estos rasgos.

A pesar de estar menos defendidas, el porcentaje de daño foliar en las poblaciones españolas fue aproximadamente veinte veces menores que aquel reportado para su área nativa. Esto podría sugerir que estos bajos valores de defensa son suficientes para afectar negativamente la herbivoría por enemigos no especializados, como es el caso de aquellos encontrados en las poblaciones estudiadas en España. Sin embargo, a grandes rasgos, no se encontró que la resistencia ni los caracteres defensivos supongan una ventaja adaptativa en estas poblaciones.

Sólo en una de catorce poblaciones, Castañuelos, se encontró relación entre densidad de tricomas y proporción de daño, lo cual sugiere que, de manera general, en España los tricomas han perdido su papel en la defensa. En Castañuelos, los análisis detectaron una correlación negativa, siendo ésta una de las poblaciones con mayor proporción de daño foliar (Media  $\pm$  EE = 0.054  $\pm$  0.032). Sin embargo, no se detectó selección sobre la densidad de tricomas en esta población. Entonces, en Castañuelos los tricomas afectan negativamente la proporción de daño foliar pero no están sujetos a selección. En el resto de las poblaciones

españolas, los tricomas han perdido su papel defensivo. Este resultado contrasta con lo reportado anteriormente por Valverde *et al.* (2001) y Kariño-Betancourt y Núñez-Farfán (2015), quienes encontraron en poblaciones nativas de *D. stramonium* del centro de México una relación negativa entre densidad de tricomas y proporción de daño, indicando que éstos cumplían un rol en la defensa. Castillo *et al.* (2013), por su parte, encontraron en un estudio de mosaicos geográficos que aquellas poblaciones que presentaban mayor densidad de tricomas eran también las más dañadas.

No se encontró relación de la concentración de atropina con el porcentaje de daño foliar. Esto contrasta con los resultados de estudios en áreas nativas, donde se había reportado relación positiva entre concentración de atropina y porcentaje de daño foliar (Castillo *et al.*, 2013), al funcionar este alcaloide como fagoestimulante para sus herbívoros especialistas (*Lema trilineata* y *Epitrix parvula*), así como refugio contra sus depredadores (Agrawal y Heil, 2012). Esta relación no se encontró en este estudio. Esto no concuerda con la hipótesis planteada para su área de introducción: al ser un alcaloide menos derivado, se esperaría que la atropina tuviera efecto negativo contra los herbívoros generalistas (que son los que se encuentran en su área de introducción), resultando efectiva para prevenir el daño (Berenbaum, 1983; Levin y York, 1987; Shonle y Bergelson, 2000). Tampoco se encontró ninguna relación entre daño y escopolamina, lo que sugiere que este alcaloide no tiene papel en la defensa de *D. stramonium* en las poblaciones españolas estudiadas. Es de esperarse que, siendo un alcaloide más derivado y más tóxico que la atropina, los herbívoros generalistas de las poblaciones españolas no estén adaptados para consumir el tejido foliar. El hecho de que tampoco se haya encontrado una relación negativa entre estos alcaloides y los niveles de daño posiblemente se deba a los bajos niveles de este último. Una vez más, esto concuerda con lo esperado según la HLE: las plantas españolas se han liberado de sus enemigos naturales y tienen valores de daño tan bajos que los componentes de la defensa no influyen en ellos.

Se encontró que la concentración de atropina está relacionada positivamente con la densidad de tricomas en tres de catorce poblaciones: Puebla de Don Fadrique, Lora del Río e Higueral. En ninguna de estas poblaciones se encontró que estos caracteres defensivos estuvieran relacionados con los niveles de daño foliar. Una de las funciones de los tricomas, además de evitar la herbivoría, es el mantenimiento de la humedad, de modo que las

condiciones ambientales de las poblaciones podrían dar cuenta de sus niveles de densidad (Tabla 1). Sin embargo, se esperaría que en ese caso la correlación con la concentración de atropina fuera negativa, puesto que la producción de alcaloides en poblaciones con poca disponibilidad de agua debería disminuir (Castillo *et al.*, 2013; Elle *et al.*, 1998). No se encontró relación para estos dos componentes de la defensa en el resto de las poblaciones. No se detectó ningún tipo de relación entre concentración de escopolamina y densidad de tricomas a excepción de una población, Pinilla, donde se encontró una relación negativa entre estos dos atributos.

Se encontró que las concentraciones de atropina y de escopolamina están fuertemente correlacionadas positivamente. Esto tiene sentido, debido a que la atropina es precursora de la escopolamina, de manera que la biosíntesis de esta última depende de la primera, y un aumento en el nivel de este precursor implicaría un aumento también en los niveles de escopolamina (Berembaum *et al.*, 1986; Agrawal *et al.*, 2009a; Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015).

Al analizar la selección actuando sobre la resistencia, únicamente se encontró selección a favor en La Zubia para ambos estimadores, mientras que en Hinojos 2 encontramos una relación positiva significativa al usar el número de frutos como estimación de la adecuación y Valdeflores marginalmente al usar las semillas.

Se detectó selección direccional negativa en contra de la atropina en dos de catorce poblaciones. Esto parecería apoyar lo encontrado por Castillo *et al.* (2013), quienes reportan que la atropina podría estar funcionando como fagoestimulante y encontraron selección en su contra en tres de ocho poblaciones estudiadas (y a favor en una de ellas). Sin embargo, el que sólo se haya encontrado relación positiva marginalmente significativa entre la concentración de atropina y el daño en dos poblaciones parece contradecir esta explicación. Una de estas dos poblaciones es Hinojos 1, donde la concentración de atropina se selecciona negativamente y la relación de ésta es con los niveles de daño fue positiva pero marginalmente significativa. No parece ser que en Hinojos 1 la atropina esté cumpliendo este papel fagoestimulante ya que los niveles de daño allí son de los más bajos reportados entre las poblaciones estudiadas en España. En esta población también se encontró selección a favor de la concentración de escopolamina, siendo la única población de las catorce

estudiadas donde se detectó algún tipo de selección sobre la concentración de este alcaloide. Estudios previos habían ya reportado selección de uno de los alcaloides independiente de la selección sobre el otro (Shonle y Bergelson, 2000; Castillo *et al.*, 2014). Respecto a la densidad de tricomas foliares, no se encontró selección con excepción de una población, La Zubia, donde son seleccionados en contra. La densidad de tricomas foliares puede estar explicada por aspectos no analizados en este estudio, como humedad (Ehleringer *et al.*, 1976; Kariñho-Betancourt y Núñez-Farfán, 2015) y vigor de la planta (estimado como número de ramificaciones): en su estudio con poblaciones mexicanas, Castillo *et al.* (2013) encuentran que aquellas poblaciones con mayor productividad (estimada a partir del vigor de las plantas) presentaban mayor densidad de tricomas, además de mayor proporción de daño foliar.

Así, en la mayoría de las poblaciones españolas la resistencia y la defensa no suponen ninguna ventaja adaptativa. Aparentemente, el daño impuesto por los herbívoros generalistas en poblaciones españolas no es suficientemente alto como para resultar una presión selectiva. Estudios previos han demostrado que bajos niveles de daño tienen el mismo efecto en la adecuación que no tener daño en absoluto, es decir, las plantas los toleran en su totalidad (Marquis, 1984; Fornoni y Núñez-Farfán, 2000; Fornoni *et al.*, 2003b). Sin embargo, a pesar de los bajos niveles hallados en los componentes de la defensa y de su ausencia de correlación con el daño, estas características no han desaparecido del todo en estas poblaciones. Como ya se mencionó anteriormente, el género *Datura*, y la solanáceas en general, comprenden especies particularmente ricas en alcaloides. El componente genético detrás de la producción de éstos podría dar cuenta de su mantenimiento en poblaciones donde no son adaptativos. Los tricomas, por su parte, podrían estarse seleccionando debido a otras funciones que no son la defensa, como el mantenimiento de la humedad, aunque en poblaciones españolas estudiadas en las que se encontró relación positiva entre tricomas y adecuación tienen los registros más altos de precipitación anual media (Tabla 1),

Una población que llama la atención es La Zubia, donde se detectó selección natural a favor de la resistencia pero en contra de la densidad de tricomas y la concentración atropina. La proporción de daño foliar en esta población no es particularmente alta. Es posible que esta población se trate de una introducción más reciente, siendo así una población que lleve

un menor número de generaciones en ausencia de herbívoros especialistas y por ello no haya experimentado los mismos cambios evolutivos en su defensa como el resto de las poblaciones españolas.

Se ha demostrado que los costos que supone la resistencia son dependientes del ambiente y que la selección sobre ésta dependerá de estos costos (Fornoni *et al.*, 2004). Se llevó a cabo un análisis de la correlación entre componentes de la defensa y adecuación para estimar los costos de la producción de las defensas. De acuerdo con Mauricio y Rausher (1997), una vez que se eliminan los herbívoros se eliminan también las ventajas de la defensa, de manera que una diferencia en adecuación estaría reflejando únicamente un costo asociado a la producción de los caracteres defensivos. De manera general, se encontró que la concentración de atropina tiene un costo tanto respecto a frutos (en cinco poblaciones) como a semillas (hallados en tres poblaciones). No se encontraron costos asociados a la producción de escopolamina. Respecto a la densidad de tricomas, encontramos relaciones negativas con número de semillas únicamente en una población. En el resto de las poblaciones no los hay.

Esta ausencia de relación entre caracteres de defensa y cantidad de frutos y semillas indican que no existe un compromiso en adecuación al producirlos en este ambiente sin enemigos. Daehler y Strong (1997) reportan en un estudio con *Spartina alterniflora* que aquellas poblaciones menos defendidas (con una historia evolutiva en la cual fueron liberadas de enemigos) tenían más nitrógeno. La riqueza de este nutriente podría dar cuenta del aumento en la producción de frutos y semillas (Rausher, 2001): al no utilizar el nitrógeno disponible para la formación de defensas construidas con nitrógeno éste se puede destinar al almacenamiento, crecimiento y reproducción (Futuyma, 1983; Bazzaz *et al.*, 1987; Simms y Rausher, 1987; Chapin *et al.*, 1990; Volenec *et al.*, 1996; Kakes 1989; de Jong y van der Meijden 2000; Purrington, 2000; Strauss *et al.*, 2002).

La fauna antagonista local puede condicionar el valor adaptativo de las distintas estrategias de defensa (de Jong y van der Meijden, 2000; Fornoni *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio demuestran que las plantas estudiadas en España son mucho menos dañadas por herbívoros y presentan una densidad significativamente menor de tricomas, así como concentraciones más bajas de atropina y escopolamina. Esto

concuera con lo que se esperaba según la Hipótesis de Liberación de Enemigos e indica que las generaciones que han transcurrido desde la introducción de *D. stramonium* a esta nueva área, y consecuente liberación de sus herbívoros especialistas, han sido suficientes para apreciar cambios evolutivos relacionados con su defensa. Estos resultados son relevantes ya que arrojan información acerca de los cambios evolutivos de una especie al liberarse de las presiones selectivas ejercidas por sus enemigos naturales.

## CONCLUSIONES

1. Los caracteres de defensa no son adaptativos en las poblaciones españolas estudiadas.
2. Las poblaciones españolas estudiadas difieren entre ellas respecto a los caracteres medidos en este estudio. Estas diferencias pueden deberse a provienen de distintos eventos de introducción, a que cada población está especiando sin que exista flujo génico entre ellas debido a la distancia, y/o a factores ambientales y ecológicos no medidos en este estudio.
3. Las poblaciones españolas estudiadas son menos dañadas por los herbívoros, están menos defendidas y no experimentan selección sobre estos rasgos, a diferencia de las mexicanas. Han escapado a la presión selectiva impuesta por la herbivoría.
4. No se encontraron costos asociados a la producción de la defensa en las poblaciones españolas estudiadas. Esto parece indicar que, de manera general, estos caracteres tienen un valor adaptativo neutro.
5. Las generaciones que lleva *D. stramonium* en el sur de España han sido suficientes para que experimenten cambios evolutivos en su defensa respecto a sus conespecíficos de áreas nativas.
6. Los resultados obtenidos en este estudio son relevantes ya que ponen a prueba la evolución adaptativa en poblaciones que se han liberado de los herbívoros con los que su especie había co-evolucionado. Apoyan las predicciones de la Hipótesis de Liberación de Enemigos (Keane y Crawley, 2002) y suponen evidencia de un evento evolutivo contemporáneo.

## PERSPECTIVAS A FUTURO

- I. Estudios con otras poblaciones de esta especie de introducción más recientes a nuevas áreas podrían resultar útiles para aportar al estudio sobre los patrones evolutivos de su defensa.
- II. Estudios sobre la genética de las poblaciones españolas podrían aportar información valiosa acerca de la diversidad genética de éstas, así como del tamaño y número de introducciones en esta región. También podrían explicar la base filogenética detrás del mantenimiento de los caracteres de defensa.
- III. Experimentos de trasplantes recíprocos y de jardín común con individuos de ambos continentes arrojarían información acerca de cómo la preferencia de los herbívoros funciona como presión selectiva sobre cuáles caracteres.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal AA, Alminen JP, Fishbein M. 2009a. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): evidence for escalation. *Evolution* 63: 663–673.
- Agrawal, A. A., & Heil, M. (2012). Synthesizing specificity: multiple approaches to understanding the attack and defense of plants. *Trends in plant science*, 17(5), 239.
- Agrawal, A. A., & Fishbein, M. (2006). Plant defense syndromes. *Ecology*, 87(sp7), S132-S149.
- Bazzaz, F. A., Chiariello, N. R., Coley, P. D., & Pitelka, L. F. (1987). Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*, 58-6
- Berenbaum, M. R., Zangerl, A. R., & Nitao, J. K. (1986). Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution*, 1215-1228.
- Berenbaum, M. (1983). Coumarins and caterpillars: a case for coevolution. *Evolution*, 163-179.
- Blossey B, Notzold R. (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* 83: 887-889.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales*. Zaragoza: Acribia.
- Castillo G, Cruz LL, Hernández-Cumplido J, Oyama K, Flores-Ortiz CM, Fornoni J, Valverde PL, Núñez-Farfán J. (2013) Geographic association and temporal variation of defensive traits and leaf damage in *Datura stramonium*. *Ecological Research* 28:663-672.
- Castillo G, Cruz LL, Tapia-López R, Olmedo-Vicente E, Carmona D, Anaya-Lang AL, Fornoni J, Andraca-Gómez G, Valverde PL, Núñez-Farfán J. (2014) Selection mosaic on chemical and physical defense against herbivores in *Datura stramonium*. *Plos One* 9:e102478.
- Chapin, F. S., Schulze, E. D., & Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annual review of ecology and systematics*, 423-447.
- Conklin, M. 1976. Genetic and biochemical aspects of the development of *Datura*. Vol. 12. E.Wolsky, ed. *Monographs in developmental biology*. S. Karger, New York .
- Crawley MJ. (1987) What makes a community invasible? In: Gray AJ, Crawley MJ, Edwards PJ, eds. *Colonization, succession and stability*. London: Blackwell, 429-453
- Daehler, C. C., & Strong, D. R. (1996). Status, prediction and prevention of introduced cordgrass *Spartina* spp. invasions in Pacific estuaries, USA. *Biological Conservation*, 78(1), 51-58.
- Daehler, C. C., & Strong, D. R. (1997) Reduced herbivore resistance in introduced smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*) after a century of herbivore-free growth. *Oecologia*, 110(1), 99-108.

- Dana-Sánchez ED, Sobrino-Vespertino E, Sanz-Elorza M. (2004) Plantas invasoras en España: un nuevo problema en las estrategias de conservación. In: Bañares A, Blancas G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S, eds. *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España*. Madrid: Dirección General de la Naturaleza, 1011-1029.
- De Jong, T. J., & Van Der Meijden, E. (2000). On the correlation between allocation to defence and regrowth in plants. *Oikos*, 88(3), 503-508.
- DeWalt, SJ, Denslow, JS, & Hamrick, JL (2004). Biomass allocation, growth, and photosynthesis of genotypes from native and introduced ranges of the tropical shrub *Clidemia hirta*. *Oecologia*, 138(4), 521-531.
- Ehleringer, J. R., Björkman, O. & Mooney, H. A. (1976) Leaf pubescence: effects on absorbance and photosynthesis in a desert shrub. *Science* 192: 376-377.
- Ehrlich, PR & Raven, PH. (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Elle, E., van Dam, N. M., & Hare, J. D. (1999). Cost of glandular trichomes, a "resistance" character in *Datura wrightii* Regel (Solanaceae). *Evolution*, 22-35.
- Evans WC. (1979) Tropane alkaloids of the Solanaceae. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding A, eds. *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. London, UK: Academic Press, 241-254.
- Evert, R. F. (2006). *Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. John Wiley & Sons.
- Fenner M, Lee WG. (2001) Lack of pre-dispersal seed predators in introduced Asteraceae in New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 25:95-99.
- Fornoni, J., Núñez-Farfán, J., Valverde, P. L. & Rausher, M. D. 2004a. Evolution of mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution* 58: 1685- 1695.
- Fornoni, J., Valverde, P. L. & Núñez-Farfán, J. (2003) Quantitative genetics of plant tolerance and resistance against natural enemies in two natural populations of *Datura stramonium*. *Evol Ecol Res.* 5: 1049-1065.
- Fornoni, J., Núñez-Farfán, J., & Valverde, P. L. (2003). Evolutionary ecology of tolerance to herbivory: advances and perspectives. *Comments on Theoretical Biology*, 8, 643-663.
- Fornoni, J, Valverde, PL & Núñez-Farfán, J. (2004b) Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. *Evolution* 58: 1696-1704.
- Fornoni, J. (2000). Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: genetic variation and costs for tolerance to defoliation. *Evolution*, 54(3), 789-797.
- Futuyma, DJ (1983). *Science on trial: the case for evolution* (p. 82). Pantheon Books.

- Geeta, R., & Gharaibeh, W. (2007). Historical evidence for a pre-Columbian presence of *Datura* in the Old World and implications for a first millennium transfer from the New World. *Journal of biosciences*, 32(3), 1227-1244.
- Genton, BJ, Kotanen, PM, Cheptou, PO, Adolphe, C, & Shykoff, JA (2005). Enemy release but no evolutionary loss of defence in a plant invasion: an inter-continental reciprocal transplant experiment. *Oecologia*, 146(3), 404-414.
- Genton BJ, Shykoff JA, Giraud T. (2005). High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology* 14:4275-4285.
- Gottlieb, L, & Meyers, AI (1990). An asymmetric synthesis of aporphine and related alkaloids via chiral formamidines.(+)-glaucine,(+)-homoglaucine, and (-)-8, 9-didemethoxythalisopavine. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(21), 5659-5662.
- Handley R, Ekbom B, Ågren J. (2005) Variation in trichome density and resistance against a specialist insect herbivore in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecological Entomology* 30:284-292.
- Holeski LM. (2007) Within and between generation phenotypic plasticity in trichome density of *Mimulus guttatus*. *Journal of Evolutionary Biology* 20:2092-2100.
- Jakobs G, Weber E, Edwards PJ. 2004. Introduced plants of the invasive *Solidago gigantea* (Asteraceae) are larger and grow denser than conspecifics in the native range. *Diversity and Distributions* 10:11-19.
- Jiao, M., Luna-Cavazos, M., & Bye, R. (2002). Allozyme variation in Mexican species and classification of *Datura* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 232(3-4), 155-166.
- Johnson B. (1975) Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review* 41:233-258.
- Juenger, T., & Bergelson, J. (1998). Pairwise versus diffuse natural selection and the multiple herbivores of scarlet gilia, *Ipomopsis aggregata*. *Evolution*, 1583-1592.
- Kakes, P. (1989). An analysis of the costs and benefits of the cyanogenic system in *Trifolium repens* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(1), 111-118.
- Kariñho-Betancourt E. (2009) Disyuntiva evolutiva entre la resistencia y la tolerancia a los herbívoros en *Datura stramonium*. MSc thesis, Mexico, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kariñho-Betancourt, E, Agrawal, AA, Halitschke, R., & Núñez-Farfán, J. (2015). Phylogenetic correlations among chemical and physical plant defenses change with ontogeny. *New Phytologist*.

- Keane RM, Crawley MJ. (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* **17**:164-170.
- Koricheva J. (2002) Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defenses. *Ecology* **83**:176-190.
- Lande, R., & Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 1210-1226.
- Levin DA. (1973) The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology* **48**:3-15.
- Levin, DA, & York, BM (1978). The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6(1), 61-76.
- Marquis, RJ (1992) The selective impact of herbivory. In: Plant Resistance to Herbivory and Pathogens. Ecology, Evolution and Genetics (R. S. Fritz & E. L. Simms, eds), pp. 301±325. The University of Chicago Press, Chicago.
- Marquis, RJ, (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science* 226: 53- 539.
- Mauricio, R. Rausher, MD & Burdick, DS (1997) Variation in the defense strategies of plants: are resistance and tolerance mutually exclusive? *Ecology* 78: 1301-1311.
- Moles AT, Gruber MAM, Bonser SP. (2008) A new framework for predicting invasive plant species. *Journal of Ecology* **96**:13-17.
- Motten, A. F., & Antonovics, J. (1992). Determinants of outcrossing rate in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 419-427.
- Núñez-Farfán, J. & Dirzo, R. (1994) Evolutionary ecology of *Datura stramonium* L. in Central México: natural selection for resistance to herbivorous insects. *Evolution* 48: 423-436.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., & Valverde, P. L. (2007). The evolution of resistance and tolerance to herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 541-566.
- Núñez-Farfán, J., & Dirzo, R. (1991). Effects of defoliation on the saplings of a gap-colonizing neotropical tree. *Journal of Vegetation Science*, 2(4), 459-464.
- Núñez-Farfán, J., & Schlichting, C. D. (2005). Natural selection in *Potentilla glandulosa* revisited. *Evolutionary Ecology Research*, 7(1), 105-119.
- Parr AJ, Payne J, Eagles J, Chapman BT, Robins RJ, Rhodes MJ. (1990) Variation in tropane alkaloid accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. *Phytochemistry* 29: 2545–2550.
- Purrington CB (2000) Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**:305-308.
- Rausher, MD (2001) Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411:857- 864
- Roddick J (1991) The importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy. In: Hawkes JG,

- Lester RN, Nee M, Estrada RN, eds. Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution. London, UK: the Royal Botanic Gardens, Kew, 7–23.
- Rodriguez E, Healy PL, Mehta I, eds. (1984) *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum.
- Sanz-Elorza M, Dana-Sánchez ED, Sobrino-Vespertinas E, eds. (2004) *Atlas de las plantas alóctonas invasoras en España*. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad.
- Schaller, A. (Ed.). (2008). *Induced plant resistance to herbivory* (pp. 349-365). Germany: Springer.
- Shonle, I. & Bergelson, J. (2000) Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54: 778-788.
- Simms. EL & Rausher, MD (1987) Costs and benefits of plant resistance to herbivory. *Am. Nat.* 130: 570-581
- Simms. EL & Rausher, MD (1989) The evolution of resistance to herbivory in *Ipomoea purpurea*. II. Natural selection by insects and costs of resistance. *Evolution* 43: 573-585.
- Simms, EL (1990). Examining selection on the multivariate phenotype: plant resistance to herbivores. *Evolution*, 1177-1188.
- Simms, EL, & Fritz, RS (1992). Costs of plant resistance to herbivory. *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics.*, 392-425.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1994. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. W.H. Freeman, New York. 887 p.
- Strauss, SY, Rudger, Lau, JA & Irwin, RE (2002) Direct and ecological costs of resistance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.* 17:278-285.
- Thompson, J.N. 1994. *The coevolutionary Process*. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Valverde, PL, Fornoni, J & Núñez-Farfán J. (2001) Defensive role of leaf trichome in resistance to herbivorous in *Datura stramonium*. *J. Evol. Biol.* 14: 424-432.
- Valverde PL, Fornoni J, Núñez-Farfán J. (2003) Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: equal plant fitness benefits of growth and resistance against herbivory. *Journal of Evolutionary Biology* 16:127-137.
- Van Dam, N. M., Hare, J. D., & Elle, E. (1999). Inheritance and distribution of trichome phenotypes in *Datura wrightii*. *Journal of Heredity*, 90(1), 220-227.
- van Kleunen M, Johnson SD. (2007) Effects of self-compatibility on the distribution range of invasive European plants in North America. *Conservation Biology* 21:1537-1544.
- Vilà M, Maron JL, Marco L. (2005) Evidence for the enemy release hypothesis in *Hypericum perforatum*. *Oecologia* 142:474-479.