



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Cambios ontogenéticos en el potencial  
cianogénico en *Turnera velutina*

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:  
SORIA TAPIA SERGIO

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. KARINA BOEGE PARÉ



LOS REYES IZTACALA, TLANEPANTLA, EDO. DE MÉXICO 2017



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.

## Agradecimientos

A mi segunda casa, la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al proyecto PAPIIT-IN211314 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Karina Boege Paré por aceptarme como su estudiante y por la asesoría que me brindo desde la elaboración de mi LICYT hasta el término de esta tesis, le agradezco mucho porque siempre estuvo al pendiente de mis avances, por tomarse el tiempo de sentarse conmigo para ver los análisis estadísticos y por adentrarme al mundo de las interacciones bióticas.

A los doctores Cesar Domínguez, Juan Fornoni y Rocío Santos por sus valiosos comentarios que me permitieron mejorar y enriquecer este proyecto de investigación.

A los miembros del jurado que revisaron, evaluaron y enriquecieron este proyecto con sus comentarios: Leonor Abundiz, Rocío Reyer, Alin Torres y Manuel Mandujano, con quien curiosamente comencé la carrera de Biología y con quien la finalicé.

Al M. en C. Rubén Pérez Ishiwara por el apoyo logístico y administrativo brindado para realización de este proyecto, le agradezco por que invirtió mucho tiempo para que se obtuviera la beca que fue de gran apoyo.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por permitirme utilizar los instrumentos del laboratorio de Alelopatía.

Al Dr. Sergio Cházaro Olvera por resolver algunas dudas que tenía sobre los análisis estadísticos que utilice en mi proyecto.

A todos los profesores de la FES Iztacala y de la Facultad de Ciencias.

## Agradecimientos personales

A mis padres Sergio Soria y Marina Tapia que siempre me han brindado todo su apoyo y me han motivado para seguir adelante, les agradezco por todo lo que me han dado y por darme otra oportunidad para poder estudiar de nuevo y cumplir mi sueño, los amo.

A mis hermanos Vanessa, Adrián y Luis que siempre estuvieron a mi lado apoyándome en todo momento, ustedes son una pieza fundamental para poder lograr mis metas. A mi sobrino Daniel que a pesar de su inocencia sabe cuándo tienes un mal día, basta con su sonrisa para alegrarte el día, los amo familia.

A Paola, gracias por el cariño que me das, por compartir todo este camino a mi lado, por todos los consejos y largas charlas, por estar ahí cuando más te necesitaba y por impulsarme a seguir con mis metas.

A Don Gerardo (que en paz descanse), por apoyarme en la etapa más crítica de mi vida, recuerdo todos esos fines de semana que arbitrábamos juntos, pasamos experiencias amargas y alegres en las canchas, pero sin duda usted fue el hombre más querido y las personas de la liga de fútbol lo extrañan demasiado, gracias por todo.

A todos mis amigos de Parajes, les agradezco por todas esas experiencias que vivimos, nos divertimos mucho jugando fútbol, nos alegrábamos por cada victoria y cada derrota nos impulsaba para dar lo mejor en el próximo partido.

A mis amigos de CCH que a pesar de las distancias y distintos caminos que tomamos, siguen en al pendiente de todo lo que hacemos, viví con ustedes una de las mejores etapas de mi vida, me divertí y aprendí muchas cosas a su lado, les agradezco todas esas experiencias que pasamos juntos.

A Alan mi "brou" que siempre me apoyó en todo, nos divertimos mucho a lo largo de la carrera, eres uno de mis mejores amigos, Jessica Admin mi maestra y mejor amiga, y a todos mis amigos de la FES Iztacala: Antonio Ríos, Uriel Moreno, Arianne Márquez, Lizbeth Espinoza, Xavier Sánchez, Ik Rodríguez, Tao Arellano, Anabel Alvarado, Elena Cayetano, Erika Torres, Christopher, nos divertimos y aprendimos mucho en estos cuatro años.

A los integrantes del LIPA que hicieron muy agradables e interesantes las charlas durante la comida, les agradezco por todos los momentos dentro y fuera del laboratorio, por recibirme de gran manera y por apoyarme desde el primer día. Les agradezco mucho a las "Turneritas" Sofía Ochoa y Xóchitl Damián por su apoyo y consejos, por llevarme muchas veces a campo, las admiro y las estimo mucho, es por ustedes que tome una de las mejores decisiones de mi vida y entre al laboratorio porque me incentivaron a hacerlo, Nora Villamil sin ti no hubiera podido hacer mi proyecto, gracias por todas las semillas que me llevaste, me salvaste. Gracias Paulina Zedillo y Michelle Maldonado por ayudarme a hacer pasteles de lodo, llenar macetas y trasplantar a mis bebés. Gracias a Inari Sosa, Coni Maubecin, Guadalupe Andraca, Guadalupe Roldan, Mitzi Fonseca, Ania Vargas, Aime Rubini, Emiliano Mora, Víctor Taracena, Roberto Rebollo, por ser tan "chéveres" conmigo.

## DEDICATORIA

*A mis padres, hermanos y a mi sobrino Daniel.  
A todos los que me apoyaron y por creer en mí.*

*“After climbing a great hill,  
one only finds that there are many more hills to climb”*

*Nelson Mandela*

*“Las cosas más pequeñas son las que nos  
hacen grandes”*

*Jonathan Rojas, “Akil Ammar”*

*“Que sea difícil no implica que sea imposible,  
que sea imposible no implica que vaya a rendirme”*

*Domingo Antonio Edjang Moreno, “El Chojin”*

## ÍNDICE

Resumen.....	I
Introducción.....	1
Objetivo.....	7
Hipótesis.....	7
Métodos.....	8
Resultados.....	12
Discusión .....	14
Conclusiones.....	19
Literatura Citada.....	20

## Resumen

La herbivoría es la interacción entre plantas y animales que resulta en el consumo de tejidos de diversas estructuras vegetales por parte de los herbívoros. Con frecuencia, este daño ocasiona una reducción en el desempeño o en la adecuación de las plantas. En respuesta a ello las plantas han evolucionado diferentes atributos para reducir o disminuir los efectos negativos causados por los herbívoros. Estos atributos se han clasificado en tres grupos: estrategias de escape, resistencia y tolerancia. Dentro de los mecanismos de resistencia se encuentra la cianogénesis, que consiste en la producción de cianuro de hidrógeno (HCN) en las hojas de las plantas, como respuesta al daño provocado por los herbívoros. La variación de la producción de HCN puede ocurrir en función de la cantidad de recursos disponibles en cada estadio ontogenético de la planta. Se sabe que *Turnera velutina* tiene la capacidad de producir HCN durante los primeros estadios ontogenéticos y que ésta se reduce durante los estadios juvenil y reproductivo, sin embargo, se desconoce el momento exacto en el que las plantas dejan de producir HCN durante su ontogenia. El objetivo del presente trabajo fue describir la trayectoria detallada de la cianogénesis durante el desarrollo de *Turnera velutina*. Se utilizaron 10 familias maternas, provenientes de plantas de una población natural ubicada en el Morro de la Mancha, Veracruz. Se sembraron 50 semillas para obtener aproximadamente 20 plantas por familia materna. Se colectaron hojas de cada nodo, desde la primera hoja verdadera, hasta que las plantas llegaron a su madurez (una hoja por individuo). El potencial cianogénico de las hojas se estimó utilizando la prueba de ácido pícrico con el tejido colectado mediante la cuantificación de la concentración promedio de HCN de las diferentes familias maternas en cada estadio ontogenéticos. La producción de HCN disminuyó de manera constante durante el desarrollo de las plantas. Estos resultados sugieren que la cianogénesis se produce justo cuando la planta tiene los suficientes recursos para ello (por ejemplo, en los cotiledones) y su disminución a lo largo del desarrollo puede ser causada por la producción de otro tipo de defensas (físicas o bióticas) para protegerse de los herbívoros.

Palabras clave: herbivoría, ontogenia, recursos, defensas, cianuro de hidrógeno.

## Introducción

La herbivoría es la interacción entre plantas y animales que resulta en el consumo de tejidos de diversas estructuras vegetales por parte de los herbívoros (Strauss y Zangerl, 2002). Con frecuencia, este daño ocasiona una reducción en el desempeño o en la adecuación de las plantas (Crawler, 1983; Coley y Barone, 1996). La selección de alimento de los herbívoros es muy variada, ya que se alimentan de yemas, hojas, semillas e inclusive de fluidos como la savia (Ramos, 2009). Los impactos del daño causado por los herbívoros dependen de varios factores, como la cantidad de tejido que remueven, la temporada del año en que es atacada la planta, el tipo de tejido removido, los recursos disponibles y la edad o el tamaño de la planta (Valverde et al., 2005), además de que la presencia e intensidad de esta interacción puede variar a lo largo del desarrollo de las plantas.

En respuesta a la herbivoría, las plantas han evolucionado diferentes atributos para reducir el daño o disminuir sus efectos negativos. Estos atributos se han clasificado en tres grupos: estrategias de escape, resistencia y tolerancia). El escape consiste en la expresión de características que impiden a los fitófagos encontrar a la planta, por ejemplo, la fenología foliar. El mecanismo de tolerancia consiste en la expresión de características que reducen el impacto negativo del daño foliar sobre la adecuación vegetal (Boege y Marquis, 2005). La resistencia (también definida como defensa) reduce el daño por herbívoros de una manera directa, al disminuir la calidad alimenticia de las plantas para los herbívoros o generando defensas para su protección (Strauss y Zangerl, 2002).

Dentro de los mecanismos de resistencia directa se encuentran una gran diversidad de atributos que disminuyen el ataque de los herbívoros, los cuales se clasifican en defensas físicas (tricomas, grosor de la hoja, espinas, entre otros), bióticas (atributos que promueven el patrullaje de los enemigos naturales de los herbívoros, e.g., nectarios extraflorales, compuestos volátiles) y químicas (metabolitos secundarios) (Ochoa-López, 2013). Las defensas químicas en las plantas pueden



clasificarse como constitutivas (que se expresan constitutivamente) o inducidas (expresadas en respuesta al ataque del herbívoro) (Karban, 2011; Moreira, 2016). Los beneficios y costos de estas estrategias defensivas varían dependiendo del contexto biótico y abiótico de donde se encuentren las plantas (Karban, 2011). En ambientes con menor cantidad de herbívoros, las plantas se benefician al expresar defensas químicas inducidas, al reducir los costos asociados a la producción constante de estas defensas (Zangerl, 1996). Por esta razón se dice que las defensas inducidas han evolucionado como una estrategia de ahorro de recursos y que se producen solo cuando es necesario (Boege y Marquis, 2005). Otra estrategia es el producir defensas únicamente en los estadios ontogenéticos más susceptibles a la herbivoría ocasionando una variación en la expresión de estas estrategias defensivas durante el desarrollo de las plantas. La mayoría de estos cambios pueden ser conducidos por la disponibilidad y la asignación de recursos para las defensas que son prioridad durante cada etapa ontogenética (Ochoa-López et al., 2015).

Barton y Koricheva (2010) reportan que los niveles de defensa química constitutiva incrementan durante la primera etapa del desarrollo (plántula) en plantas leñosas (Fig. 1) Sin embargo, en plantas herbáceas juveniles hay una disminución de la defensa química inducida, pero un aumento en la defensa química constitutiva. Finalmente, en el estadio correspondiente a la madurez, las plantas leñosas disminuyen la defensa química, mientras que en las plantas herbáceas se continúa con el incremento de la defensa química constitutiva y disminución de la inducida.

## Patrones generales de defensa

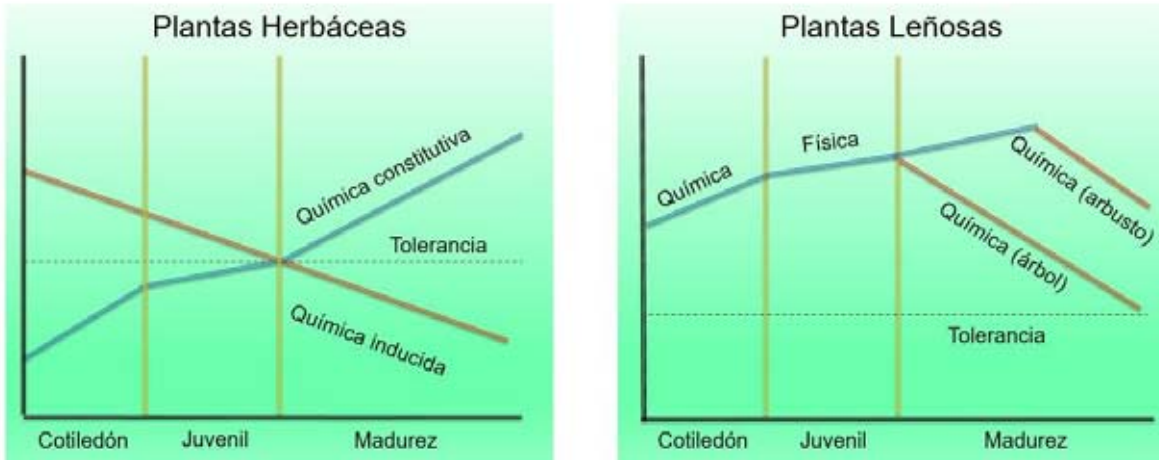


Fig. 1. Patrones ontogenéticos de las defensas químicas constitutivas e inducidas en plantas herbáceas y leñosas (Barton y Koricheva, 2010)

Dentro de las defensas químicas constitutivas se encuentran los metabolitos secundarios, que son compuestos sintetizados por el organismo y no tienen un rol directo con el crecimiento o reproducción del mismo (Sepúlveda *et al.*, 2003). Algunos ejemplos de metabolitos secundarios son las saponinas, hidroxámicos cíclicos y los glucósidos cianogénicos. Muchos de estos metabolitos secundarios juegan un papel esencial en la defensa, debido a que limitan o impiden a los herbívoros de alimentarse de sus tejidos. Algunos metabolitos secundarios de las plantas pueden ser tóxicos para algunos herbívoros. Estos compuestos químicos son almacenados en la pared celular de tejidos que aún no tienen la rigidez que proporciona la lignina o los silicatos, tal como en los brotes, hojas jóvenes y frutos inmaduros (Granados-Sánchez *et al.*, 2008).

El caso de los glucósidos cianogénicos.

La cianogénesis es una de las defensas químicas más estudiadas en las plantas (Schappert y Shore, 1995) y está presente en casi todos los grupos de plantas vasculares. Se sabe que especies de plantas tienen la capacidad de producir HCN dentro de las familias Fabaceae, Rosaceae, Linaceae, Compositae y Passifloraceae (Shore y Obrist, 1992) entre otras. Los glucósidos cianogénicos (GC) son el producto del metabolismo secundario en la síntesis de compuestos propios de las plantas que se componen de una aglicona tipo  $\alpha$ -hidroxinitrilo y de glucosa (principalmente D-glucosa) (Arrazola y Grane, 2013). Cuando hay un daño en el tejido de la planta (por masticación o proceso mecánico), los GC se convierten en ácido cianhídrico (HCN) por un proceso de dos etapas (EFSA, 2007): primero los GC son descompuestos en cianhídrinas por la enzima  $\alpha$ -hidroxinitrilasa y en azúcares por la enzima  $\beta$ -glucosidasa; posteriormente las cianhídrinas forman HCN espontáneamente o por una reacción enzimática catalizada por hidroxinitrilasa. El cianuro es una toxina respiratoria que puede causar envenenamiento y actuar como disuasivo de herbívoros (Jones, 1998). Otro modo de acción de los compuestos cianogénicos es bloquear la cadena transportadora de electrones en los herbívoros (Gleadow y Woodrow, 2002). El HCN también tiene efectos negativos sobre el desarrollo y la adecuación de los herbívoros, Ballhorn (2007) realizó un estudio en función a la capacidad cianogénica de *Phaseolus lunatus* (haba de Lima) y los efectos que tiene sobre el escarabajo mexicano (*Epilacha varivestis* Mulsant), en donde reporta que larvas del escarabajo que se alimentaron de plantas con alta capacidad cianogénica mostraron un lento desarrollo y un menor peso que las larvas que se alimentaron de plantas con baja capacidad cianogénica. Además, también reportan que la calidad de huevos fue menor en escarabajos que se alimentaron de plantas con alta capacidad cianogénica.

Los individuos cianogénicos suelen mostrar una considerable gama de concentraciones de glucósidos cianogénicos, que al parecer refleja la variación en su capacidad biosintética (Hughes, 1991; Woodrow y Gleadow, 2002). Se cree que

uno de los principales factores de mantenimiento de dicha variación en la cianogénesis en poblaciones naturales es por la cantidad de recursos disponibles y el costo energético que conlleva (Skogsmyr y Fagerström, 1992). En ausencia de herbívoros, las plantas acianogénicas tienen mayores tasas de crecimiento y aptitud reproductiva en comparación de las cianogénicas. También se cree que el 'costo' de la cianogénesis se puede moderar por factores ambientales como la disponibilidad de agua y de nutrientes (Woodrow y Gleadow, 2002).

En *Trifolium repens* se ha reportado un polimorfismo discreto con individuos cianogénicos y acianogénicos, basado en un sistema con dominancia de un alelo que produce los genes necesarios en la planta para la producción de HCN (GCs y enzimas). Este polimorfismo está determinado por cruza mendelianas, las plantas con al menos un alelo dominante son cianogénicos y en contraste la cruza homocigótica recesiva es acianogénica (Kooyers, 2013).

Muchos estudios han demostrado que las plantas cianogénicas de una misma especie o población pueden variar en la concentración de HCN para defenderse de los herbívoros. Algunos de estos estudios también han demostrado que la concentración de este compuesto puede cambiar a lo largo del desarrollo (Goodger y Choo, 2007). Por ejemplo, Dahler *et al.* (1995) realizaron un estudio en algunas especies del género *Macadamia* y describieron la liberación de HCN durante su ontogenia. Esta trayectoria se dividió en seis estadios: semilla, semilla hidratada, cotiledón, plántula con hoja sin dilatar, plántula con hoja dilatada y suave, y por último plántula con hoja endurecida. Los autores reportan que los niveles de HCN disminuyen con la maduración de la planta, siendo los estadios 3 y 4 los que tienen mayor concentración de HCN. Un estudio similar de Goodger *et al.* (2007), describe la trayectoria ontogenética de la producción de HCN y de la concentración de prunasina (GC) en *Eucalyptus yarraensis*. La trayectoria se dividió en dos cohortes, los cuales fueron: una entre los 43 y 73 días después de la siembra y otra entre los 94 y 338 días. Los autores reportan que hay un incremento gradual en la cianogénesis en la primera cohorte de plantas en los primeros días posterior a la

siembra mientras que en la segunda se produce una disminución constante en la producción de HCN. Sin embargo, este trabajo no abarca la trayectoria ontogénica completa de *Eucalyptus yarraensis*, debido a que el crecimiento del árbol es lento y hay una variación importante en los patrones de floración.

En otros trabajos se han utilizado de dos a tres estadios para describir la cianogénesis durante el desarrollo de las plantas (*Sorghum spp.* (Simili et al., 2013); *Phaseolus lunatus L.* (Ballhorn et al., 2005; Blue, 2015), por lo que, a la fecha no existe ningún trabajo de investigación que describa detalladamente este proceso defensivo durante todo desarrollo de la planta.

## **Objetivo**

Describir la trayectoria ontogenética de la cianogénesis en función del número de hojas y la presencia de estructuras reproductivas en *Turnera velutina*, para determinar el estadio en que las plantas dejan de producir el HCN.

## **Hipótesis**

Si existen cambios en las estrategias defensivas de las plantas debido al costo que implica su producción (como es el caso de la cianogénesis), las plantas reducirán estos costos optimizando el uso de recursos para otro tipo de defensas, generando trayectorias ontogenéticas en la expresión de las mismas.

## Métodos

Sistema de estudio y antecedentes.

*Turnera velutina* (Passifloraceae: Turneroideae) es un arbusto endémico de México que se distribuye en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Tamaulipas y Veracruz. Crece en dunas costeras y en el bosque tropical caducifolio. Esta especie era considerada como parte del complejo *Turnera ulmifolia* (*T. ulmifolia* var. *velutina*) pero recientemente fue renombrada por Arbo (2005) como *T. velutina*.

*T. velutina* presenta hojas lanceoladas con margen dentado, pubescentes en ambas superficies, con el envés más claro y la venación ligeramente prominente arregladas en verticilo a lo largo de un tallo ramificado que mide de 0.6 a 2m de largo cuando es adulta (Arbo, 2005). Las hojas poseen nectarios extraflorales (NEF), los cuales se encuentran en ambos lados del peciolo (Elias *et al.*, 1975). Las flores son axilares de entre 1.5 y 3 cm, de color amarillo y con pétalos que se unen en la parte inferior formando un tubo (hipanto). Los estambres son insertos, cerca de la base del hipanto, el ovario es súpero y los estigmas son densamente fimbriados (Gama *et al.*, 1985) Las flores duran solo un día. Los frutos son cápsulas de 5 a 12 mm de ancho y sus semillas son ovoide-oblongas, pardas a negras, de 2.2 a 3.5 mm de largo y de 1 a 2 mm de ancho, y estas tienen elaisoma (Salazar-Rojas *et al.*, 2012). El principal herbívoro de *T. velutina* es la oruga *Euptoieta hegesi* (Lepidoptera: Nymphalidae), que tiene actividad entre junio a agosto, aunque puede encontrarse en todo el año (Ochoa-López, 2013)

A partir de un estudio sobre sistemática y evolución del complejo *T. ulmifolia* en torno a la cianogénesis y la variación dentro del complejo, se ha propuesto que existen sub especies de este complejo que son acianogénicas y otras cianogénicas (Shore y Obrist, 1992). *Turnera ulmifolia* produce GC que hidroliza con la enzima  $\beta$ -glucósidasas, generando la liberación de ácido cianhídrico (HCN) cuando el tejido es consumido por los herbívoros. *T. velutina* al ser una especie cercana a *T. ulmifolia* dentro de este complejo, podría tener el mismo mecanismo de defensa mediante la

producción de HCN. Villamil-Buenrostro (2012) realizó pruebas colorimétricas de picrato de sodio y ácido pícrico a 101 individuos de *T. velutina* (17 juveniles, 28 pre-productivos y 56 reproductivos), de los cuales todos mostraron ser acianogénicos. Sin embargo, Ochoa-López (2013) reportó una reacción positiva en la prueba ácido pícrico en *T. velutina* en los estadios cotiledón y plántula. Esto indica que la cianogénesis ocurre durante los primeros estadios ontogenéticos y se inhibe durante los estadios de juvenil y reproductivo que son acianogénicos (Ochoa-López et al., 2015). No obstante, a la fecha se desconoce el momento preciso en que las plantas dejan de producir el HCN y si esto es debido a los costos energéticos de mantener la síntesis de HCN o debido a una disyuntiva en la asignación de recursos para la producción de otro tipo de defensas como estrategia de la planta contra los herbívoros.

Trabajo en invernadero y laboratorio

Germinación de plantas.

En una población nativa en la costa de Veracruz (coordenadas 19°35'25"N, 96°22'49"W). Se colectaron 3846 semillas de *T. velutina* correspondientes a 34 familias maternas. Se retiró el elaisoma de manera manual y las semillas se germinaron en bandejas de germinación utilizando un sustrato de tierra mezclada con vermiculita en una proporción 1:1. Posteriormente, cuando emergieron los cotiledones, se registró la fecha y se les etiquetó. Cuando empezaron a expandir su primera hoja, las plantas se trasplantaron a macetas de 2 litros de capacidad. A partir de este momento, las plantas fueron regadas cada dos días.



Diseño experimental.

Debido a una baja viabilidad de las semillas (aproximadamente el 2%), solo se obtuvieron suficientes plantas (entre 20 a 25 individuos) de 10 familias maternas.

La cuantificación de HCN y descripción de su trayectoria ontogenética se realizó en plantas con un número secuencial de hojas. Esto es, cada planta se utilizó para muestrear únicamente la hoja  $x$  (donde  $x$  corresponde desde cotiledón hasta la hoja número 20). Desde el estadio cotiledón a la hoja número diez se hicieron 15 repeticiones ( $N= 1$  o 2 plantas/familia), para dar prioridad a estos estadios cianogénicos y detectar la variación asociada a la transición hacia la acianogénesis. A partir de la hoja 11 a la hoja 20, se hicieron 10 repeticiones ( $N= 1$  planta/familia), para confirmar que estos estadios son acianogénicos, como ha sido reportado por Ochoa-López et al. (2015).

Trayectoria ontogenética de la cianogénesis.

Para determinar la presencia de HCN se utilizó la prueba de ácido pícrico (Shore & Obrist, 1992, modificado por Ochoa-López *et al.*, 2015), para lo cual se colectó una hoja de cada planta, a la cual se le cortaron seis círculos de lámina foliar utilizando una perforadora de 0.5 mm de diámetro. Tres círculos fueron colectados en un tubo Eppendorf de 1.5ml, donde se maceraron con 7 $\mu$ L de cloroformo. Inmediatamente después se colocó un papel indicador, preparado previamente con una solución acuosa de 0.5% de ácido pícrico con 5% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Después de cerrar el tubo Eppendorf las muestras se dejaron reposar por 24 h en la oscuridad y a temperatura ambiente (25-27°C). Posteriormente se registró la reacción del papel filtro ante la presencia de HCN, que cambia de color amarillo brillante a anaranjado o rojo oscuro, en función de la cantidad de HCN. Utilizando una perforadora se cortó un círculo de 0.5 mm de diámetro del papel picrato reaccionado utilizando una perforadora y se colocó en un tubo con 1ml de etanol al 50%, el cual fue conservado en oscuridad y en refrigeración. Posteriormente los tubos Eppendorf se centrifugaron a 130 rpm por 10 minutos, para después añadir 200 $\mu$ L de cada

muestra en 3 pozos de una placa EIA, en la que realizaron las lecturas en un espectrofotómetro ELISA a 590 nm (BioTek®: modelo ELx808, EE.UU.)

Se realizó una curva patrón utilizando diferentes concentraciones (5–200 µm) de cianuro de potasio (KCN), y siguiendo el mismo protocolo usado para que con las hojas. De esta manera se obtuvieron los datos necesarios para poder transformar las absorbancias a microgramos de HCN. Finalmente, para obtener la concentración de HCN en el tejido, se utilizaron los 3 discos de tejido vegetal adicionales, los cuales fueron secados a temperatura ambiente y pesados. La concentración se estimó como mg de HCN/ peso seco de los 3 discos de tejido y fue determinado por la siguiente ecuación:

$$\text{HCN} = \frac{\text{absorbancia} - 0.0368651(\text{blanco})}{0.001236 (\text{pendiente})} \div (\text{peso fresco})$$

Análisis estadísticos.

Se aplicó un GLM (Modelo Lineal Generalizado por sus siglas en inglés: General Lineal Model) de normalidad gamma, para evaluar si existe variación genética en las trayectorias ontogenéticas de la producción de HCN.

## Resultados.

### Trayectoria Ontogénica de la Cianogénesis en *Turnera velutina*.

Todas las plantas analizadas resultaron tener algún grado de cianogénesis. Como era de esperarse, la concentración de HCN disminuyó drásticamente durante el desarrollo (Fig. 1). Se encontró que en los primeros estadios correspondientes a cotiledón y hoja 1, la producción de HCN es 2 a 6 veces mayor que los demás estadios, y que a partir de la hoja 3, la producción de HCN disminuye de manera constante, con un mínimo aumento en la producción de HCN en las hojas 4, 8 y 19.

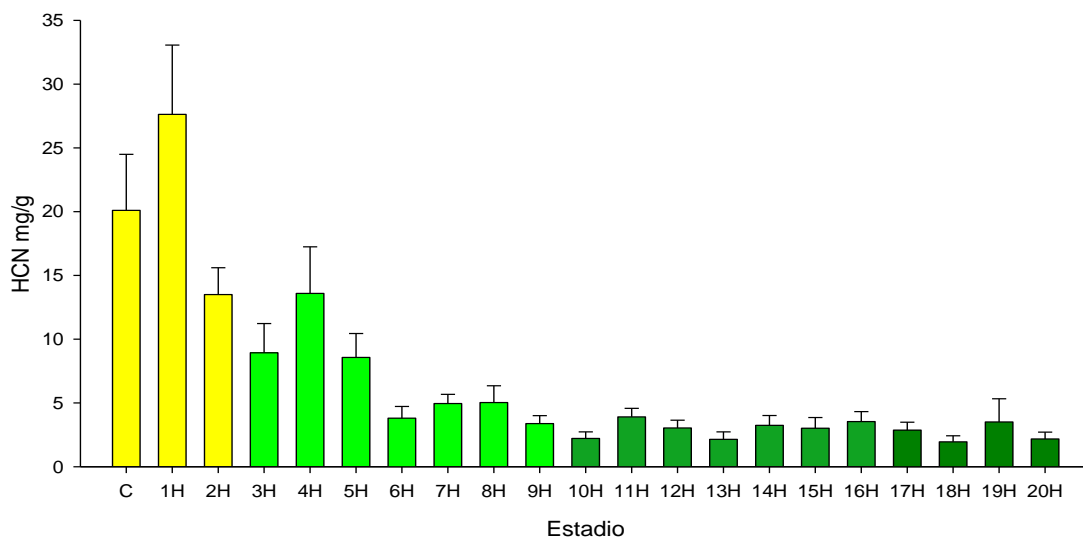


Fig. 2. Trayectoria de la cianogénesis en la ontogenia de *T. velutina*. Se muestra la concentración y la variación en la producción de HCN durante todos sus estadios; plántula (amarillo), juvenil (verde claro), pre-reproductivo (verde) y reproductivo (verde oscuro).

En cuanto a la edad de la planta, los niveles de HCN aumentaron en promedio de 20.0985 mg/g a 27.6291 mg/g del día 45 al 70, posteriormente los niveles decrecen en el día 112 a 8.9379 mg/g; en el día 124 hay un ligero aumento en la producción de HCN 13.5909 mg/g; en los días consecutivos decrecen los niveles de HCN siendo el valor máximo 5.0292 mg/g y el mínimo 0.4771 mg/g.

El análisis de GLM reveló que existe variación genética en la producción de HCN ( $X^2=208.7152$ ,  $P < 0.001$ : Fig. 3).

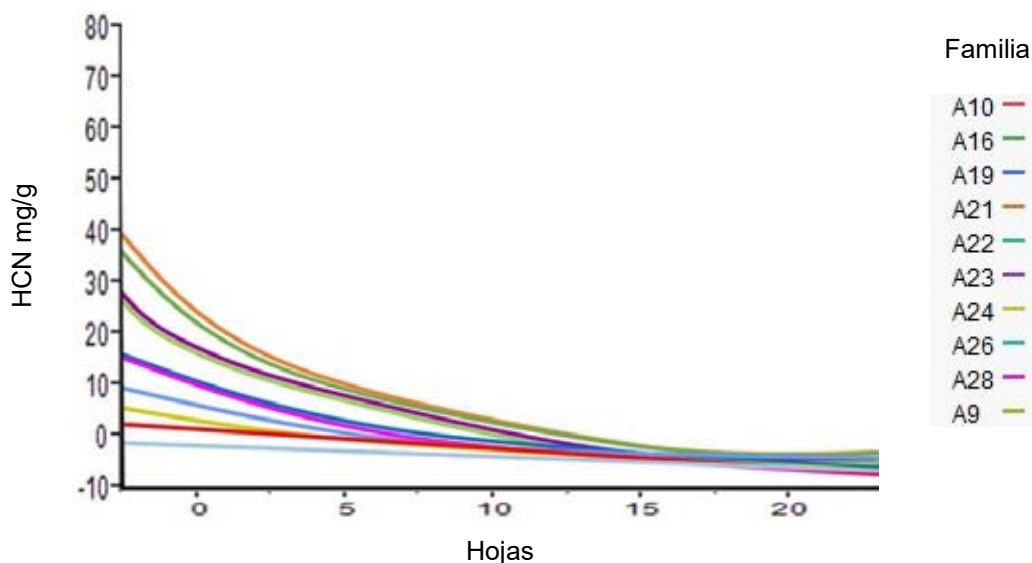


Fig. 3. Variación genética de la cianogénesis de las diferentes familias maternas de *T. velutina*

## Discusión.

### Trayectoria ontogenética de la cianogénesis

Éste es uno de los primeros estudios en reportar detalladamente la trayectoria ontogenética de un atributo defensivo, desde el estadio cotiledón hasta la etapa reproductiva. La producción de HCN se detectó durante todos los estadios de *Turnera velutina*, aunque fue reduciéndose gradualmente durante el desarrollo de las plantas, hasta presentar valores, mínimos en estadios pre-reproductivos y reproductivos (Fig.2). En la especie hermana *T. ulmifolia*, también se ha reportado que las plántulas presentan mayores niveles de HCN que aquellas que se encuentran en el estadio de reproductivo (Schapert y Shore ,1995). Sin embargo, se desconoce en qué momento la cianogénesis se deja de producir. Este patrón contrasta con los resultados de un meta-análisis realizado por Barton y Koricheva (2010), en el que se reporta que en general, la defensa química constitutiva aumenta a lo largo del desarrollo de las plantas herbáceas. El patrón reportado en este estudio puede ser explicado por la teoría de defensa óptima, que predice que las plantas jóvenes deben de ser más defendidas que las plantas viejas porque el impacto de los herbívoros disminuye a con la edad de las plantas (Warner y Cushman, 2002). Los resultados coinciden sólo parcialmente con el modelo descrito por Boege y Marquis (2005), que predice la disminución de las defensas durante la transición de cotiledón a plántula, debido al agotamiento de los recursos maternos, seguido de un periodo de una baja producción de defensa y aumento de área fotosintética. Sin embargo, este modelo predice un aumento en la defensa en el estadio juvenil, lo cual solo se observa simultáneamente en las trayectorias observadas para *T. velutina*, seguidas de un decremento sustancial al inicio de la reproducción.

La disminución de este atributo químico durante la ontogenia puede ser explicado por el costo energético que implica producirla (Skogsmyr y Fagerström, 1992), pues se ha reportado que es una defensa química que exige la asignación de recursos

(en particular de nitrógeno), y que puede representar el 15% de nitrógeno total foliar de las plantas (Gleadow *et al.*, 1998; Goodger *et al.*, 2002; Goodger y Woodrow, 2002).

Probablemente la disminución en la producción de HCN durante la ontogenia es una estrategia de la planta para reducir los costos asociados a esta defensa, optimizando el uso de recursos para procesos relacionados con la madurez de la planta o para otro tipo de defensas contra la herbivoría. *T. velutina*, además de producir HCN, produce diversas defensas a lo largo de su ontogenia: físicas (tricomas) y bióticas [nectarios extraflorales (NEF) que atraen a hormigas defensoras] (Ochoa-López, 2013). Ochoa-López *et al.* (2015) reportan una disminución en la defensa química en los primeros estadios ontogenéticos y un aumento de defensas físicas y bióticas en *T. velutina*, sugiriendo una correlación negativa entre las defensas químicas y físicas (Ballhorn *et al.*, 2013) o la presencia de switches ontogenéticos entre los diferentes tipos de defensa (física, química y biótica; Boege *et al.*, 2007).

La disminución del potencial cianogénico durante la ontogenia tiene un efecto negativo, en particular para los estadios juveniles. Esto se ve reflejado en el daño recibido por los herbívoros, que es mayor durante estos estadios, en comparación con las plántulas y plantas reproductivas (Villamil *et al.*, 2013). Este estadio parece ser el más vulnerable ya que ha dejado de producir HCN, y aún no presenta otro tipo de defensas, como tricomas o nectarios extraflorales para atraer hormigas defensoras (Ochoa-López *et al.*, 2015).

El patrón ontogenético de producción de HCN encontrado coincide con otras especies *Macadamia spp.* (Dahler *et al.*, 1995), *Eucalyptus yarraensis* (Goodger *et al.*, 2007) y *Phaseolus lunatus* L. (Ballhorn *et al.*, 2005; Blue *et al.*, 2015). Asimismo, este patrón ontogenético se ha reportado para otro tipo de defensas químicas. Goodger *et al.* (2013) realizaron un estudio en donde contrastan las trayectorias ontogenéticas de fenoles y terpenos en *Eucalyptus froggattii*. Los autores reportan

que los compuestos fenólicos disminuyen a lo largo de la ontogenia, mientras que los terpenos aumentan. Los autores sugieren que estos cambios ontogénicos se deben a la cantidad de recursos disponibles en los diferentes estadios de la planta y proponen que estos cambios son una estrategia defensiva contra los herbívoros.

La concentración de HCN en *T. velutina* fue veinte veces mayor a la reportada para *T. ulmifolia*, Shappert y Shore (2000) registran la concentración de HCN con respecto a la edad de la planta siendo el valor máximo 3.424 mg/g y el mínimo de 0.351 mg/g, mientras que en *T. velutina* se encontró como valor máximo 20.09 mg/g y el mínimo de 0.72 mg/g de HCN, probablemente hay variación en la capacidad biosintética de GC de cada especie (Hughes, 1991; Woodrow *et al.*, 2002), o la cantidad de recursos disponibles es diferente (Skogsmyr y Fagerström 1992), o existe una variación genética para este carácter (Schapert y Shore 1995). De manera alternativa el método utilizado para la cuantificación de HCN podría ser un factor que explique las altas concentraciones encontradas, ya que en *T. ulmifolia* las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro fueron a los 504nm, mientras que en este trabajo las lecturas se realizaron a los 590nm. En otros trabajos se han utilizado diferentes lecturas en el espectrofotómetro, que van desde los 510nm (Drochioiu *et. al*, 2008) hasta los 585nm (Dahler *et al.*, 1995; Ballhorn *et al.*, 2010; Blue *et al.*, 2014), pero no hay ningún trabajo donde reporte cual es la mejor absorbancia para medir la concentración de HCN. Se utilizó la longitud de onda de 590nm debido a que la regresión lineal realizada para la transformación de absorbancia a concentración de HCN fue la que se ajustó mejor a los datos obtenidos ( $R^2=93\%$ ).

En otras especies se han reportado distintos niveles en la concentración de HCN, aunque no mayor a la encontrada para *T. velutina*, por ejemplo, Simili *et al.* (2013) realizaron un estudio en cultivos híbridos de *Sorghum* en función de la concentración de HCH durante su trayectoria ontogenética. Los autores reportan que la concentración máxima de estos híbridos es de 230.3 mg HCN/ 100g de tejido y la mínima de 5.9 mg HCN/ 100g de tejido, además de que reportan que los niveles

de HCN disminuyen con la maduración de la planta, siendo las plantas juveniles las más tóxicas para los animales. Goodger *et al.* (2007) reportan para *Eucalyptus yarraensis* que la concentración máxima de HCN es de 2.1 mg/g y la mínima es de 0.001 mg/g. Los autores reportan que el GC que contiene *Eucalyptus yarraensis* es prunasina y este disminuye su concentración durante su trayectoria ontogenética, lo cual explicaría la disminución de este carácter defensivo durante su ontogenia y los niveles en la concentración de HCN en esta planta.

A la fecha no se han realizado estudios sobre los tipos y la concentración de GC que contiene *T. velutina*, los cuales podrían ser un factor para explicar los altos niveles de HCN que producen. Para *T. ulmifolia* se ha reportado que produce cuatro tipos de GC *deidaclina*, *tetrafilina A*, *tetrafilina B* y *vacianina* (Olafsdottir *et al.*, 1990; Szewczyk, 2013), pero no hay un estudio sobre la efectividad de estos GC y si todos pueden llegar a producir HCN. Sería recomendable realizar estudios sobre los tipos de GC que contiene *T. velutina* y su capacidad de producir HCN.

Se encontró variación genética en la producción de HCN en *T. velutina* (Fig. 3). Shore y Obrist (1992) reportan para las poblaciones de *T. ulmifolia* var. *velutina* ubicadas en Tuxtla Gutiérrez, Veracruz y Acapulco una variación discreta en la intensidad de la reacción con el ácido pícrico, así como un pequeño porcentaje de plantas acianogénicas, además de que ellos sugieren que existe un polimorfismo cianogénico en *T. ulmifolia* var. *velutina*, sin embargo, en este trabajo no se encontró ninguna planta acianogénica, lo cual refleja que *T. velutina* no exhibe un polimorfismo cianogénico muy marcado. Kooyers (2014) menciona que el polimorfismo cianogénico ocurre a nivel molecular, en donde hay una eliminación de genes que codifican para el citocromo P450 el cual es el responsable de la biosíntesis de glucósidos cianogénicos. Esta supresión tiene como consecuencia una disminución en la producción GC y por lo tanto una menor concentración de HCN que pueda liberarse después del daño por herbívoros. La variación ontogenética en la producción de HCN entonces puede ser explicada por la concentración de GC que tiene la planta durante el desarrollo (Hughes 1991;



Woodrow 2002) o puede ser por la cantidad de nitrógeno disponible para este tipo de defensa.

Con este trabajo se ha caracterizado de manera detallada la cianogénesis durante la ontogenia de *T. velutina*, lo cual fue sugerido por Villamil (2011) y Ochoa-López (2013), pero aún quedan algunas preguntas pendientes, como por ejemplo si los herbívoros tienen un efecto directo en los patrones de producción de diferentes defensas a lo largo de la ontogenia. Sería importante en un futuro hacer un estudio que incluya al herbívoro generalista (*Euptoieta hegesi* Cramer), para observar si este aprovecha los niveles bajos de HCN en plantas juveniles para poder alimentarse de la planta sin intoxicarse, o al haber niveles bajos de HCN este pueda secuestrar este componente y de esta manera poder alimentarse libremente de la planta.

## Conclusiones

Este estudio demuestra que *Turnera velutina* es una planta cianogénica durante toda su ontogenia, con niveles más bajos en los estadios pre-reproductivos y reproductivos. Este patrón se ha observado en varios grupos de plantas, por lo que representa una estrategia común, probablemente para evitar los costos que la cianogénesis implica y poder optimizar el uso de recursos para la producción de otro tipo de defensas o funciones relacionado con la madurez, como la reproducción.

Finalmente, se reporta la variación genética en la producción de HCN en *Turnera velutina* y que esto podría ser por las diferentes concentraciones de GC que tienen las plantas o por la cantidad de recursos que se puedan destinar a esta defensa química.

## Literatura Citada.

- Arbo, M.M., 2005. Estudios sistemáticos de Turnera (Turneraceae). III Series Anomale y Turnera. Bonpladia 14(3-4): 115-318.
- Arrázola, P., Grané, G. 2013. Determinación de compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras (*prunus dulcis* l) utilizando cromatografía líquida de alta resolución Revista Colombiana de Química [en línea]. [Fecha de consulta: 1 de septiembre de 2015] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309032110004>> ISSN 0120-2804.
- Ballhorn, D.J., Lieberei, R., Ganzhorn, J.U. 2005. Plant Cyanogenesis of *Phaseolus lunatus* and its relevance for herbivore-plant interaction: The importance of quantitative data. *Journal of Chemical Ecology*, 31(7):1445-1473.
- Ballhorn, D.J., Godschalx A.L., Kautz, S. 2013. Co-variation of Chemical and Mechanical Defenses in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.). *J. Chem Ecol.* 39: 413-417.
- Ballhorn, D.J, Pietrowski, A., Lieberei, R. 2010. Direct trade-off between cyanogenesis and resistance to a fungal pathogen in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) *Journal of Ecology*, 98: 226-236.
- Ballhorn, D. J., Kautz, S., Laumann, J. M. 2016. Herbivory damage induces a transgenerational increase of cyanogenesis in wild lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Chomoecology*, 26:1–5.
- Barton, K. E. y Koricheva, J. 2010. The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist* 175(4):481-493.
- Blue, E., Kay, J., Younginger, B.S., Ballhorn D.J. 2014. Differential effects of type and quantity of leaf damage on growth, reproduction and defence of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) *Plant biology*, 17: 712-719.

- Boege, K., R. Marquis. 2005. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trend in Ecology and Evolution*, 8: 441-448.
- Boege, K., Dirzo, R., Siemens, D., Brown, P. 2007. Ontogenic switches from plant resistance to tolerance: minimizing cost with age? *Ecology Letters*, 10:177-187.
- Crawler, M.J. 1983. *Herbivory. The dynamics of animal-plant interactions*. Blackwell Scientific, Oxford, Inglaterra, pp. 437.
- Coley, P.D. y Barone, J. A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forest. *Annual Review Ecology and Systematics* 27: 305-335.
- Dahler, J.M., McConchie, C. A., Turnbull, C. G. N. 1995. Quantification of Cyanogenic Glycosides in Seedlings of Tree *Macadamia* (Preoteaceae) Species. *Jornal Botany* 43, 619-628.
- Elias, T. S., W. R. Rozich y L. Newcombe. 1975. The foliar and floral nectaries of *Turnera ulmifolia* L. *American Journal of Botany* 62(6):570-576.
- EFSA, (European Food Safety Authority) (2007) Opinion of the scientific panel on contaminations in the food chain on a request from the commission related to cyanogenic compounds as undesirable substances in animal feed. *EFSA J* 434:1–67
- Gama, L., Narave, H. y Moreno, N. 1985. Turneraceae. En: V. Sosa (Ed.) *Flora de Veracruz* 74: 1-15.
- Gleadow, R.M. y Woodrow, I.E. 2002. Cyanogenic polymorphism as an indicator of genetic glycosides in herbivore defense. *Journal of Chemical Ecology* 28 (7): 1301-1313.
- Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P., Barrera-Escorcia, H. *Ecología de la herbivoría*. 2008. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* [en línea], 14 (enero-junio): [Fecha de consulta: 1 de septiembre de 2015] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62914109>> ISSN 2007-3828.

- Goodger, J.Q.D., Choo, T.Y.S. 2007. Ontogenetic and temporal trajectories of chemical defence in a cyanogenic eucalypt. *Oecologia* 53:799–808.
- Goodger, J.Q.D., Heskes, A.M., Woodrow, I.E. 2013. Contrasting ontogenetic trajectories for phenolic and terpenoid defences in *Eucalyptus froggattii*. *Annals of Botany* 112: 651-659.
- Hughes M.A. 1991 The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity* 66: 105–115
- Jones D. A. 1998. Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry*, 47: 155-162.
- Karban, R. 2011. The ecology and evolution of induced resistance against herbivories. *Funct. Ecol.*, 25, 339-347.
- Kooyers, N.J., Olsen, K.M. 2013. Searching for the bull’s eye: agents and targets of selection vary among geographically disparate cyanogenesis clines in white clover (*Trifolium repens* L.) *Heredity*, 111: 495–504.
- Moreira, X., Sampedro, L., Zas, R., Pearse, I. S. 2016. Defensive Traits in Young Pine Trees Cluster into Two Divergent Syndromes Related to Early Growth Rate. *PLoS ONE* 11(3): e0152537.doi: 10.1371/journal.pone.0152537.
- Olafsdottir, E.S., Jaroszewski, J.W., Arbo, M.M., 1990. Cyanohydrin glucosides of Turneraceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 18, 435–438.
- Ochoa-López, S. 2013. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa y tolerancia de *Turnera velutina* y su variación genética. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 5-38
- Ochoa-López, S., Villamil, N., Zedillo-Avelleyra, P., Boege, K. 2015. Plant defence as a complex and changing phenotype throughout ontogeny. *Annals of Botany* 116: 797-806.

- Ramos, M. P. 2009. Análisis de los patrones de herbivoría en la comunidad arbórea y arbustiva de la Selva Baja Caducifolia de la Isla Cocinas de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala, Jalisco. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 7-8.
- 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.
- Schappert, P.J. y Shore, J.S. 1995. Cyanogenesis in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). I. Phenotypic distribution and genetic variation for cyanogenesis on Jamaica. *Heredity* 74: 392-404.
- Sepúlveda J. G., Porta D. H., Rocha S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-262.
- Shore, J. S., Obrist, C. M. 1992. Variation in Cyanogenesis within and among Populations and Species of *Turnera* series *Canaligeræ* (Turneraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 20 (1): 9-15.
- Simili, F., Pereira, M., Merino, M., Paro de Paz, C., Ruggieri, A., Andrade, R. 2013. Hydrocyanic acid content and growth rate of *Sorghum* X *Sudangrass* hybrid during fall. *Ciênc.agrotec.*, Lavras, 37(4): 299-305.
- Skogsmyr, I., Fagerström T. 1992. The cost of anti-herbivory defence: an evaluation of some ecological and physiological factors. *OIKOS* 64, 451–457.
- Valverde, T., Meave, J., Carabias, J. y Cano-Sentena, Z. 2005. *Ecología y Medio Ambiente*. Ed. Pearson Education. México. Págs. 61-65
- Strauss, S.Y., y Zangerl, A.R. 2002. Plant-Insect interaction in terrestrial ecosystems. En: C.M. Herrera y O. Pellmyr (eds.). *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach*. Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford- págs. 77-106.

- Szewczyk, K., Zidorn, C. 2013. Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana- *Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology* 52 (2014) 424–443.
- Valverde, T., Meave, J., Carabias, J. y Cano-Sentena, Z. 2005. *Ecología y Medio Ambiente*. Ed. Pearson Education. México. Págs. 61-65
- Villamil-Buenrostro, N. 2011. Caracterización de las trayectorias ontogenéticas de la defensa contra la herbivoría en *Turnera ulmifolia*. Tesis profesional. Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Págs. 4-76.
- Villamil, N., Márquez-Guzmán, J., Boege, K. 2013. Understanding ontogenetic trajectories of indirect defence: ecological and anatomical constraints in the production of extrafloral nectaries. *Annals of Botany*, 1: 1-9.
- Warner, P.J. y Cushman. 2002. Influence of herbivores on a perennial plant: variation with life history stage and herbivore species. *Oecologia* 132: 77-85.
- Weeber, B. L., Woodrow, I. E. 2008. Intra-plant variation in cyanogenesis and the continuum of foliar plant defense traits in the rainforest tree *Ryaparosa kurrangii* (Achariaceae) *Tree Physiology* 28, 977-984.
- Woodrow, I., Slocum, J.D., Gleadow, R.M. 2002. Influence of water stress on cyanogenic capacity in *Eucalyptus cladocalix*. CSIRO. *Functional Plant Biology. Continuing Australian Journal of Plant Physiology.*; 29: 103-110.
- Zangerl, A.R., Rutledge, C.E. 1996. Probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *Am Nat.*; 147:599–608.