



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

EFFECTO DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO DE *DATURA STRAMONIUM* EN LAS
ESTRATEGIAS DE DEFENSA CONTRA HERBÍVOROS

TESIS

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

PRESENTA:

LAURA JUDITH GIRALDO KALIL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, IZTAPALAPA
DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y
SUSTENTABILIDAD, UNAM-MORELIA

MÉXICO, D.F., DICIEMBRE 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.

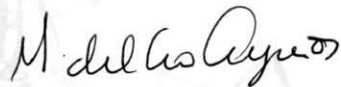
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática, en su sesión ordinaria del día 21 de septiembre 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 **GIRALDO KALIL LAURA JUDITH** con número de cuenta **514351045** con la tesis titulada **"EFECTO DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO DE *Datura stramonium* EN LAS ESTRATEGIAS DE DEFENSA CONTRA HERBÍVOROS"**, bajo la dirección del **DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**:

Presidente: DRA. KARINA BOEGE PARÉ
Vocal: DR. GERMÁN AVILA SAKAR
Secretario: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
Suplente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Suplente: DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de noviembre de 2015.



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) por permitirme realizar mis estudios de maestría

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca para estudiar (Número de registro de becario 295745, Número de apoyo 364322)

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por su apoyo financiero para la realización del proyecto PAPIIT IN-212214, "Evolución adaptativa de la defensa en plantas durante la invasión de ambientes nuevos" del cual hace parte este trabajo.

Al programa de apoyo a estudiantes de posgrado PAEP de la UNAM, por darme apoyo económico para la realizar varios cursos y asistir a un congreso

A los miembros de mi Comité Tutor: Juan Núñez Farfán (tutor principal), Ek del Val y Pedro Luis Valverde por su asesoría durante la realización del proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Juan Núñez porque, además de asesorarme en todo momento desde el inicio de mi proyecto, me dio la oportunidad de hacer un posgrado y venir a este país maravilloso, conocer lugares increíbles y aprender cosas totalmente inesperadas. Su paciencia, confianza y enseñanzas han sido fundamentales para mí. Gracias por abrirme puertas, y mostrarme caminos.

A los miembros de mi comité y de mi jurado, Dra. Ek del Val y Dr. Pedro Luis Valverde, por sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de mi proyecto, y por su apoyo y comprensión en momentos críticos. A los otros miembros del jurado, Dra. Karina Boege, Dr. Germán Avila, y Dr. Ken Oyama por revisar mi manuscrito en detalle y hacer observaciones muy valiosas que lo mejoraron considerablemente.

A Laura Lorena Cruz, quien apoyó la realización de mi proyecto de principio a fin, y me ayudó con todos los aspectos de la realización del experimento y la toma de datos. Su ayuda y su paciencia fueron muy valiosas para llevar a cabo este proyecto. A Rosalinda Tapia López por su apoyo constante durante la planeación del experimento, por asegurar siempre la disponibilidad de materiales y equipos, y por su disposición a ayudar.

A todos mis colegas y amigos del laboratorio de genética ecológica y evolución del Instituto de Ecología de la UNAM, porque todos me ayudaron a llevar a cabo la parte práctica del proyecto. En especial porque desde mi llegada recibí su apoyo, cariño y amistad, además de consejos y muchísimas enseñanzas. Siempre me hicieron sentir en casa.

A la bióloga Blanca Hernández, a Teresa Caudillo, la Dra. Ana Luisa Anaya, y la Dra. Rocío Cruz por permitirme realizar la extracción de alcaloides de mis plantas en el laboratorio de aleopatía del Instituto de Ecología y apoyarme durante el proceso.

Al Dr. Antonio González y Jesús Llanderal (IIES) por prestarme su equipo IRGA para medir fotosíntesis, además de enseñarme a usarlo, ayudarme cuando tuve dudas al respecto y darme sugerencias muy útiles para analizar mis datos.

Al Dr. Luis Barbo y al Dr. César Flores por permitirme realizar la cuantificación de alcaloides en el laboratorio de biogeoquímica de la UBIPRO, FES Iztacala, además de asesorarme durante todo el proceso. A Fernando García, y Rodolfo Becerril por ayudarme cuando las cosas no salían bien.

A Iván Camargo por su asesoría y su ayuda con el planteamiento de mi proyecto, también a Lilia Roa por sus consejos. A ambos les debo mis primeros pasos en México.

A mi familia, por animarme a emprender esta aventura lejos de casa, también a mis viejos amigos por estar siempre, incluso desde lejos. A mis nuevos amigos por apoyarme y llenarme de alegría.

A Ernesto por su apoyo constante, su comprensión, y su inmenso cariño. Por trasnochar y madrugar conmigo. Por México. Por nuestra casa. Por cambiar el rumbo de mi vida.

A la familia Cañón Narváez por su apoyo inmenso a nuestra llegada a México. Nos tendieron la mano en el momento más decisivo, y nos ofrecieron su amistad desde el comienzo.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	1
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL	2
TABLA DE CONTENIDO	3
LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES	13
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
SISTEMA DE ESTUDIO	15
Diseño experimental:	15
Aspectos generales del trabajo en invernadero	16
MEDICIÓN DE CARACTERES VEGETATIVOS.....	17
Tasa relativa de crecimiento.....	17
Área Foliar:	17
Fotosíntesis y variables fisiológicas asociadas:.....	17
Daño foliar:	18
COMPONENTES DE ADECUACIÓN.....	18
Adecuación relativa.....	18
COMPONENTES DE DEFENSA	19
Tolerancia.....	19

Resistencia.....	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
Efectos del sistema de apareamiento, la varianza genética y el tratamiento	21
Depresión endogámica	22
Relación entre estrategias de defensa.....	23
Análisis de Selección Natural y costos adaptativos	23
RESULTADOS	24
CARACTERES VEGETATIVOS	24
COMPONENTES DE LA ADECUACIÓN	28
CARACTERES DE DEFENSA.....	31
DEPRESIÓN ENDOGÁMICA.....	36
SELECCIÓN NATURAL Y COSTOS ADAPTATIVOS.....	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	49
LITERATURA CITADA.....	50

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. MANOVA de los caracteres vegetativos y fisiológicos (área foliar promedio, tasa relativa de crecimiento, tasa de fotosíntesis), componentes de la adecuación (adecuación relativa, peso promedio de las semillas), y caracteres de defensa (densidad promedio de tricomas foliares, concentración de tropano alcaloides) en *D. stramonium*. Se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). 24
- Tabla 2. Análisis de varianza de caracteres vegetativos de *D. stramonium*. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo. Los caracteres marcados con el superíndice ^{NS} no tuvieron un valor P significativo de ajuste al modelo de análisis de varianza. 25
- Tabla 3. Análisis de varianza de la adecuación relativa y de la masa promedio de las semillas en progenies de *Datura stramonium* derivadas de entre- e intra-cruzamiento, con y sin daño foliar. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo. 29
- Tabla 4. Análisis de varianza de los valores reproductivos ("breeding values" o promedio familiares) de caracteres defensivos de *D. stramonium*. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo. 32
- Tabla 5. Promedios de la depresión endogámica errores estándar ($S\delta$) y valores de t y P para diferentes caracteres de crecimiento, adecuación y defensas en plantas dañadas y no dañadas de *D. stramonium*. En negrita se resaltan los valores medios que son significativamente distintos de cero. 36
- Tabla 6. Análisis de regresión lineal múltiple de los gradientes de selección direccional (β) sobre los valores genéticos y fenotípicos de los caracteres vegetativos y de resistencia en *D. stramonium* en progenies generadas por diferentes sistemas de apareamiento y con diferente tratamiento. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo de regresión lineal, junto a ella se muestran los valores de P y F del modelo de ANOVA de la regresión múltiple lineal. 39
- Tabla 7. Análisis de regresión cuadrática múltiple de los gradientes de selección natural no lineal (γ) sobre los valores genéticos y fenotípicos de los caracteres vegetativos y de resistencia en *D. stramonium* en progenies generadas por diferentes sistemas de apareamiento y con diferente tratamiento. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo de regresión. junto a ella se muestran los valores de P y F del modelo de ANOVA de la regresión múltiple lineal. En el caso de los valores genéticos no fue posible incluir en el modelo los factores cuadráticos de los alcaloides debido a sesgos estadísticos 40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de asignación de tratamiento a unidades experimentales a progenies de <i>D.stramonium</i> generadas por diferente sistema de apareamiento.	16
Figura 2. Valores familiares promedio (\pm DS) de Área foliar (A) y Tasa relativa de crecimiento (B) de <i>D. stramonium</i>	26
Figura 3. Valores promedio (\pm EE) de la tasa relativa de crecimiento para plantas de <i>D. stramonium</i> con diferente sistema de apareamiento (A) y tratamiento (B).	27
Figura 4. Valores promedio (\pm EE) de Área foliar para la interacción Sistema de apareamiento \times Tratamiento en <i>D. stramonium</i>	27
Figura 5. Tasa fotosintética promedio (\pm EE) en plantas de <i>D. stramonium</i> sometidas a diferente nivel de daño según su sistema de apareamiento.	28
Figura 6. Valores promedio (\pm EE) de adecuación relativa (w) para la interacción Sistema de apareamiento \times Tratamiento de daño en <i>D. stramonium</i>	29
Figura 7. Valores familiares promedio (\pm DS) de adecuación relativa (A) y peso promedio de las semillas (B) de <i>D. stramonium</i>	30
Figura 8. Valores familiares promedio (\pm EE) de tolerancia (T) para plantas con diferente sistema de apareamiento de <i>D. stramonium</i> . Valores $T < 0$ indican subcompensación, $T = 0$ indican tolerancia completa, y $T > 0$ indican sobrecompensación	31
Figura 9. Valores familiares promedio (\pm DS) de densidad de tricomas foliares por planta de <i>D. stramonium</i>	32
Figura 10. Concentración de Atropina y Escopolamina (\pm DS) en diferentes familias de <i>D. stramonium</i>	33
Figura 11. Relación entre la densidad promedio de tricomas foliares y la concentración de tropano alcaloides en plantas de <i>D.stramonium</i> generadas por autofecundación de acuerdo al tratamiento. (Atropina: Control $R^2 = 0.036$, $P = 0.2073$, Daño $R^2 = 0.18$, $P = 0.0334$; Escopolamina: Control $R^2 = 0.34$, $P = 0.0034$, Daño $R^2 = 0.13$, $P = 0.0563$).	34
Figura 12. Relación entre la concentración de Atropina y Escopolamina en plantas generadas a partir de diferentes sistemas de apareamiento en <i>D. stramonium</i> (Autofecundación: $R^2 = 0.233$, $P = 0.008$; Entrecruzamiento: $R^2 = 0.410$, $P < 0.0001$).	34
Figura 13. Correlación entre valores familiares promedio de densidad promedio de tricomas foliares y tolerancia en <i>D. stramonium</i> . (Autofecundación $R^2 = 0.485$, $P = 0.004$; Entrecruzamiento $R^2 = 0.076$, $P = 0.1210$).....	35

Figura 14. Relación entre la tolerancia y la concentración de tropano alcaloides en *D.stramonium* para progenies de plantas generadas por diferentes sistemas de apareamiento (Atropina: Autofecundación $R^2 = 0.05$, $P = 0.82$, Entrecruzamiento $R^2 = 0.20$, $P = 0.0233$; Escopolamina: Autofecundación $R^2 = 0.028$, $P = 0.2291$, Entrecruzamiento $R^2 = 0.19$, $P = 0.0264$)..... 35

Figura 15. Depresión endogámica en caracteres vegetativos, defensivos y de adecuación en *D. stramonium* según el tratamiento. Se resaltan con asterisco las variables cuyos valores medios fueron significativamente distintos de cero..... 37

Figura 16. Análisis de costos en la adecuación relativa (w) por la producción de tricomas foliares (Autofecundación $R^2 = 0.2972$, $P = 0.00146$; Entrecruzamiento $R^2 = 0.2499$, $P = 0.0025$) en plantas sin daño de *D. stramonium*..... 38

RESUMEN

La evolución de las estrategias de defensa de las plantas está condicionada tanto por la interacción con sus herbívoros como por la diversidad genética en las poblaciones, que depende en gran parte de los sistemas de apareamiento. La reproducción por autofecundación aumenta considerablemente la homocigosis y puede causar un efecto de depresión endogámica al facilitar la expresión de alelos deletéreos recesivos. Por el contrario, el entrecruzamiento promueve la heterocigosis y, por ende, el mantenimiento de la diversidad genética.

Con base en lo anterior, se ha postulado que los sistemas de apareamiento repercuten directamente en la expresión fenotípica de caracteres defensivos en las plantas, y por lo tanto en su capacidad de respuesta ante el ataque por herbívoros. Se espera que entre mayor sea la diversidad genética en las plantas, mayor será la expresión de defensas. Estudios previos desarrollados en condiciones naturales demuestran que las progenies de plantas autógamas son más consumidas por herbívoros que las exógamas. Sin embargo, aún se desconoce si la respuesta diferencial al ataque de herbívoros entre plantas descendientes de diferentes sistemas de apareamiento puede ser causada por diferencias en la expresión fenotípica de caracteres defensivos entre progenies autogamas y exogamas.

El objetivo de este trabajo fue determinar cómo la endogamia afecta la expresión de defensas *Datura stramonium*. Para ello medimos caracteres relacionados con la tolerancia (modificaciones en el crecimiento, en el vigor de la planta, la tasa fotosintética y la adecuación relativa), y la resistencia (densidad de tricomas foliares, concentración de tropano alcaloides), además de componentes de adecuación en progenies de plantas generadas por autofecundación y entrecruzamiento. Asimismo evaluamos las correlaciones entre estos caracteres, y sus gradientes de selección natural.

Encontramos que las progenies de plantas autógamas tuvieron más tolerancia que las exógamas, sin embargo presentaron depresión endogámica en la adecuación relativa, el área foliar promedio y la densidad de tricomas foliares. Aunque no detectamos un efecto significativo del sistema de apareamiento sobre la expresión de caracteres de resistencia en las progenies exógamas, sí encontramos depresión endogámica para la resistencia. Por otra parte, encontramos que las correlaciones entre diferentes caracteres de defensa están determinadas tanto por el sistema de apareamiento por el cual se generan las plantas, como por la presencia o no de daño. Además, creemos que las diferencias en el desempeño en progenies de diferente sistema de apareamiento no solo están dadas por la expresión diferencial de las defensas y sus correlaciones, sino por factores como la cantidad de daño y el crecimiento.

ABSTRACT

Genetic diversity and plant-herbivore interaction drives the evolution of plant defence. Plant responsiveness to environmental pressure imposed by herbivores depends on the genetic diversity available for optimal phenotypic expression of defensive traits. Reproduction by selfing increases homozygosity as well as the expression of recessive deleterious alleles, which, in turn, promotes inbreeding depression. In contrast, outbreeding promotes heterozygosity and the maintenance of genetic diversity.

Thus, it has been proposed that mating systems directly affect the phenotypic expression of defensive traits on plants. It is expected that, the greater the genetic diversity, the greater the phenotypic expression of defenses. Previous studies have shown that autogamous plant progenies are more consumed by herbivores than the exogamous progenies. However, it remains unclear if the differential response between progenies of different mating systems to herbivores attack is due to differences on the expression of plant defensive traits.

The aim of this study was to determine how inbreeding affects the defence against herbivores in *Datura stramonium* plants. Therefore, we measured several traits related to tolerance (changes in growth and plant vigor, photosynthetic rate and relative fitness), and resistance (leaf trichomes density, tropane alkaloids concentration), as well as fitness components on selfed and outcrossed progenies. We assessed the correlations among these traits, and estimated gradients of natural selection.

Although we found that selfed progenies were more tolerant than outbred ones, we detected inbreeding depression on relative fitness, leaf area, and leaf trichome density. Contrary to expectations, we did not find a greater expression of resistance traits on outbred progenies, but we have detected inbreeding depression for those traits. Moreover, we found that the correlation between defense traits not only depends on the mating system, but also on plant damage. We argue that the differences between offspring produced by different mating systems are not only caused by defence expression, but also by the amount of damage and the growth rate.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de respuesta de las plantas ante la presión selectiva que imponen los herbívoros está determinada por factores como el tipo de herbívoro, el tipo y la cantidad de daño, y la disponibilidad de recursos abióticos, así como por la diversidad genética disponible para la expresión fenotípica de rasgos defensivos (Núñez-Farfán, Fornoni, & Valverde, 2007). Se espera que la respuesta de las plantas ante el ataque sea más efectiva entre mayor sea la variación genética disponible, y ésta depende en gran medida del sistema de apareamiento por el cual se originan.

La autofecundación y el entrecruzamiento son los diferentes *sistemas de apareamiento* mediante los cuales las plantas pueden reproducirse. Si bien son alternativos, ambos tipos de reproducción pueden ocurrir de manera simultánea en las plantas, lo que se conoce como estrategia reproductiva mixta. La reproducción por autofecundación aumenta considerablemente la homocigosis en las progenies, lo que favorece la expresión de alelos deletéreos recesivos y causa *depresión endogámica*, que es una disminución en la *adecuación* respecto a los organismos generados por entrecruzamiento. Por el contrario, la reproducción cruzada promueve la heterocigosis y, por ende, el mantenimiento de la diversidad genética. Las diferencias en adecuación entre progenies de ambos sistemas de apareamiento pueden ser debidas a la ventaja de los heterocigotos (sobredominancia) o a la recesividad (parcial) de alelos deletéreos (Charlesworth & Charlesworth, 1987).

Varios estudios señalan que la autofecundación puede ser ventajosa en plantas colonizadoras, ya que asegura la reproducción en ambientes poco predecibles donde los individuos conspecíficos son escasos (Campbell & Kessler, 2013; Núñez-Farfán et al., 1996). Sin embargo la autofecundación trae costos como la depresión endogámica y el *descuento de gametos*, lo que ha puesto en duda el alcance de la *garantía reproductiva* en plantas con dicho sistema de apareamiento. Por lo anterior, se ha cuestionado si la autofecundación puede ser una alternativa adaptativa en plantas con sistema de apareamiento mixto, o si por el contrario es maladaptativa (Barrett, 2003).

La acción de la selección natural sobre las estrategias de apareamiento puede afectar la expresión de defensas contra herbívoros porque determina la magnitud de la depresión endogámica, y la diversidad genética (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010, 2011; Campbell et al., 2013; Núñez-Farfán et al., 1996, 2007). Así mismo, el herbivorismo puede tener un efecto sobre el sistema de apareamiento porque afecta el vigor de la planta, la disponibilidad de flores para el entrecruzamiento, y la asignación de recursos a componentes de adecuación como flores y gametos; por ello el daño por herbívoros puede incidir también en la atracción de polinizadores (Campbell, 2015; Steets et al, 2006; Steets et al, 2007; Strauss, 1997).

La *resistencia* y la *tolerancia* son los dos tipos de defensas que las plantas presentan para contrarrestar los efectos negativos del herbivorismo. Los caracteres de resistencia evitan o reducen el daño ocasionado por herbívoros, y pueden expresarse de forma constitutiva desde antes de que el daño ocurra, y/o como respuestas fenotípicamente plásticas después del daño (Agrawal & Karban, 1999). Entre los caracteres de resistencia más comunes se incluyen compuestos químicos (*i.e.*, *metabolitos secundarios*) como los alcaloides, flavonoides, terpenos y glucosinolatos, y caracteres físicos como los tricomas foliares, las espinas, y engrosamiento de tejidos entre otros (Agrawal, 2011; Kariñho-Betancourt, et al., 2015).

En muchas familias de plantas, los tejidos tienen propiedades disuasivas gracias a la producción de metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros, cuya producción puede ser inducida luego de que los insectos consuman las hojas (Müller, 2006). Estos compuestos son liberados por la activación de múltiples vías metabólicas gracias a la interacción con elicitores, lo que genera repulsión o intoxicación a la mayoría de insectos herbívoros evitando que el ataque se repita (Kessler & Baldwin, 2002). Sin embargo, algunos metabolitos secundarios pueden atraer a algunos insectos, e incluso pueden ser secuestrados por los herbívoros para defenderse de sus depredadores, lo que genera costos para la planta e incrementa la adecuación del insecto (Simmonds, 2001, 2003). Varios estudios señalan que el potencial defensivo de los metabolitos secundarios de las plantas está dado por su diversidad cualitativa y cuantitativa, y que su efecto depende del tipo de herbívoro (Bennett & Wallsgrave, 1994; Treutter, 2005).

Por otra parte, la tolerancia se define como la capacidad de las plantas para reducir los efectos negativos del daño por herbívoros en la adecuación una vez que éste ha ocurrido (Fornoni, 2010; Stowe et al., 2000; Strauss & Agrawal, 1999). La tolerancia es una propiedad del genotipo para disminuir o amortiguar la pérdida de adecuación generada por un factor ambiental o extrínseco a la planta (Fornoni, Valverde, & Núñez-Farfán, 2003), por ello, en ausencia de dicho factor la tolerancia no se expresa. La tolerancia implica la expresión de respuestas fenotípicas plásticas después del daño como la reasignación de recursos, el crecimiento compensatorio para reemplazar tejido (Stowe et al., 2000), el aumento en la tasa fotosintética en las hojas, o en la absorción de nutrientes del suelo (Del Val, 2012); y depende de la disponibilidad de recursos y la expresión de otros rasgos antes de que ocurra el daño (Fornoni, 2010).

Tanto la tolerancia como la resistencia se consideran rasgos defensivos adaptativos, por ello se asume que involucran costos en adecuación que determinan su mantenimiento o eliminación de manera independiente o incluso el mantenimiento simultáneo de las dos estrategias en poblaciones naturales (Fornoni, Núñez-Farfán, Valverde, & Rausher, 2004; Núñez-Farfán et al., 2007).

Se ha postulado que la producción de caracteres constitutivos de resistencia cuando éstos no son requeridos implica un alto costo para la planta porque requiere de la inversión continua de recursos limitantes (Kessler & Baldwin, 2002). Por otra parte, la tolerancia implica costos por la capacidad del mantenimiento de la inducción de la respuesta (Moore et al., 2013); también por la reasignación de recursos que dejan de invertirse en procesos como la supervivencia y el crecimiento, y por las modificaciones que esto tiene sobre las interacciones con otros organismos (Fornoni et al., 2003).

Ha sido de especial interés el mantenimiento simultáneo de la tolerancia y la resistencia porque se consideran alternativas defensivas redundantes, ya que ambas evitan la pérdida de adecuación causada por el ataque de herbívoros, y podrían implicar costos similares en adecuación. Dado que los individuos con alta tolerancia no se verían beneficiados por tener también altos niveles de resistencia y viceversa, se ha encontrado que aunque ambas estrategias se mantengan de forma simultánea en las poblaciones, la selección tenderá a favorecer altos niveles de una pero no de ambas; por lo tanto se espera que exista una correlación negativa entre ambas estrategias (Fornoni et al., 2004; Mauricio, et al 1997; Núñez-Farfán et al., 2007; Simms & Triplett, 1994).

Varios estudios recientes han demostrado que la reproducción por autofecundación es desfavorable respecto a la reproducción por entrecruzamiento ya que las progenies autogamas presentan una reducción en la expresión de caracteres de adecuación y crecimiento, y sugieren que esto mismo ocurre con las defensas contra herbívoros (Campbell et al, 2014; Campbell et al., 2013; Campbell & Kessler, 2013), ya que se han observado mayores niveles de daño por herbívoros en progenies de plantas originadas por autofecundación (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010, 2011). Algunos trabajos en los que se ha abordado el daño artificial, sugieren que la depresión endogámica podría reflejarse tanto en los componentes constitutivos como inducidos de la defensa (Schlichting & Levin, 1986). Sin embargo otros estudios no detectan diferencias entre ambos sistemas de apareamiento (Núñez-Farfán et al., 1996) o incluso reportan un aumento en el crecimiento compensatorio en plantas generadas por autogamia (Hull-sanders & Eubanks, 2008). Se ha planteado que la endogamia en las plantas, además de afectar los niveles de tolerancia y resistencia, puede afectar sus interacciones con insectos consumidores porque podría repercutir simultáneamente en la calidad del tejido vegetal y su aceptación por parte de los herbívoros (Carr & Eubanks, 2014; Delphia, 2009).

A pesar de los avances realizados en el tema, aún no es claro si las diferencias en las respuestas al herbivorismo de las progenies de plantas descendientes de autofecundación y entrecruzamiento se deben a diferencias en la expresión fenotípica de caracteres de defensa contra herbívoros dadas por el sistema de apareamiento. Por eso, este proyecto pone a prueba la hipótesis de que la autofecundación genera menor adecuación y expresión fenotípica de rasgos defensivos que el entrecruzamiento. Nuestro objetivo fue determinar cómo la endogamia afecta la expresión de la resistencia y la tolerancia en comparación con progenies derivadas de entrecruzamiento, tomando plantas de *Datura stramonium* L. (Solanaceae) como sistema de estudio.

ANTECEDENTES

Algunos estudios que se han llevado a cabo en *D. stramonium* demuestran que su tasa de entrecruzamiento en poblaciones naturales puede ser muy variable, (de menos de 10% (Motten & Antonovics, 1992) a 17% (Cuevas García, 1996)), y que presenta depresión endogámica para la producción de semillas (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010; Núñez-Farfán et al., 1996).

Varios experimentos realizados en condiciones naturales han mostrado que para *D. stramonium* el daño por herbívoros disminuye la adecuación de las plantas (Núñez-Farfán & Dirzo, 1994). Además, las progenies de plantas generadas por autofecundación son más dañadas por herbívoros y patógenos, y presentan más infestación de frutos por depredadores especialistas de semillas que las progenies generadas por entrecruzamiento. Lo anterior sugiere que la autogamia podría causar la disminución de la expresión de resistencia y/o tolerancia; y aunado a la depresión endogámica en la producción de semillas, podría implicar que la autofecundación es costosa en presencia de herbívoros, ya que el daño podría exacerbar la depresión endogámica. Esto podría además evitar el mantenimiento de la autofecundación como única estrategia reproductiva para la especie (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010, 2011).

Con respecto a la resistencia, varios autores han demostrado que los tricomas foliares, así como los tropano alcaloides son rasgos adaptativos que disminuyen el daño por herbívoros en *D. stramonium*. Dichos caracteres pueden estar correlacionados, y su correlación puede variar espacial y temporalmente, y estar además determinada por factores bióticos como los herbívoros, y por factores abióticos como el clima, la humedad y la temperatura (Castillo et al., 2013, 2014; Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015; Núñez-Farfán & Dirzo, 1994; Shonle & Bergelson, 2000; Valverde et al., 2001).

A pesar de estos hallazgos, no es claro qué ocasiona las respuestas diferenciales observadas entre plantas provenientes de distintos sistemas de apareamiento, ni el impacto que éstos tienen sobre la expresión fenotípica de rasgos de defensa. Por lo anterior, este proyecto aborda la expresión de caracteres de resistencia y tolerancia en plantas de ambos sistemas de apareamiento.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La endogamia ocasiona la reducción en la expresión fenotípica de caracteres defensivos de tolerancia y resistencia (*i.e.*, tricomas foliares, tropano alcaloides) en *Datura stramonium*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar cómo la endogamia afecta la expresión de las estrategias de defensa, resistencia y tolerancia, en comparación con progenies derivadas de entrecruzamiento, empleando como sistema a la especie *D. stramonium*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los caracteres defensivos físicos (densidad de tricomas foliares) y químicos (concentración de atropina y escopolamina) en progenies con distinto nivel de endogamia, derivadas de autofecundación ($f = 0.5$ aproximadamente) y de entrecruzamiento ($f = 0$ aproximadamente).

Determinar la adecuación promedio de las plantas generadas por autofecundación y entrecruzamiento con y sin daño foliar, para cuantificar los cambios en la expresión de la tolerancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

SISTEMA DE ESTUDIO

Datura stramonium L. (Solanaceae), también conocida como "toloache", es una hierba anual nativa de México y de distribución cosmopolita que crece frecuentemente en ambientes perturbados (Motten & Antonovics, 1992; Núñez-Farfán & Dirzo, 1994; Weaver & Warwick, 1984). Sus flores son hermafroditas y es autocompatible, por lo que puede reproducirse tanto por autofecundación como por entrecruzamiento.

Si bien la tasa de entrecruzamiento varía en las poblaciones naturales, su valor promedio es de 18% (Motten & Antonovics, 1992; Núñez-Farfán et al., 1996; Núñez-Farfán & Dirzo, 1994), lo que puede explicarse por varias características florales que facilitan la autopolinización como la cercanía de las anteras y el estigma, y la maduración del polen antes de la apertura de la corola. Sin embargo otras características están asociadas al entrecruzamiento como el olor fragante de las flores, y la producción de néctar (Núñez-Farfán & Dirzo, 1994). Además, las flores pueden o no presentar hercogamia; se ha visto que la variación en la distancia entre anteras y estigma es muy variable y también repercute en la tasa de entrecruzamiento poblaciones (Motten & Antonovics, 1992; Moten & Stone, 2000).

Entre los polinizadores de *D. stramonium* se encuentran esfingidos, abejas y abejorros (Núñez-Farfán & Dirzo, 1994). Sus frutos son cápsulas dehiscentes con un número muy variable de semillas (Weaver & Warwick, 1984). Las hojas del toloache son consumidas por herbívoros especialistas como *Lema trilineata* y *Epitrix parvula* (Coleoptera: Chrysomelidae), y generalistas como *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphyidae).

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Llevamos a cabo el experimento en un invernadero con plantas provenientes de 21 familias genéticas para detectar posibles efectos genéticos sobre la expresión de rasgos defensivos. De cada familia, cuatro plantas generadas por autofecundación y cuatro por entrecruzamiento, fueron asignadas a un tratamiento de daño mecánico ($n = 2$) y a un grupo control ($n = 2$) (Figura 1). En cada planta medimos varios caracteres relacionados con el crecimiento, el vigor y el metabolismo (tasa relativa de crecimiento, área foliar, tasa fotosintética, eficiencia en el uso del agua), así como con la adecuación (número de frutos, semillas, y peso de semillas). Adicionalmente medimos la expresión de caracteres asociados a la resistencia (densidad de tricomas foliares y tropano alcaloides), y a la tolerancia (producción promedio de semillas por fruto y compensación en caracteres de crecimiento y metabolismo). Para el desarrollo del experimento y el análisis estadístico consideramos tres principales fuentes de variación que influyen en la expresión de caracteres defensivos de las plantas: los genotipos o familias, el sistema de apareamiento, y el daño foliar.

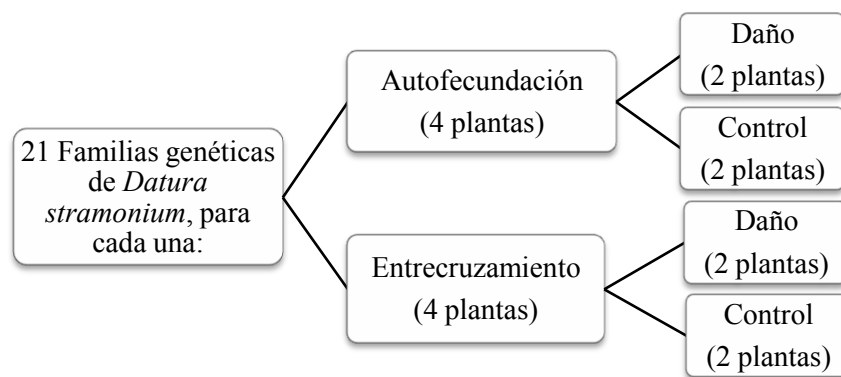


Figura 1. Esquema de asignación de tratamiento a unidades experimentales a progenies de *D.stramonium* generadas por diferente sistema de apareamiento.

ASPECTOS GENERALES DEL TRABAJO EN INVERNADERO

Las plantas crecieron en un invernadero por 17 semanas (entre mayo y octubre del 2014), durante ese tiempo las reorganizamos tres veces (una cada 4 semanas aproximadamente) para aleatorizar su distribución.

Germinación:

Las semillas que usamos para este trabajo son producto de cruza controladas que se llevaron a cabo en plantas provenientes de Teotihuacan (2010) en condiciones de invernadero. La mitad de las flores de cada planta fue emasculada (antes de la maduración del polen) y se polinizó con polen de 5 flores de diferentes plantas, mientras que la mitad restante se polinizó con su propio polen. De esa forma se obtuvieron frutos generados por entrecruzamiento y por autofecundación de la misma planta madre, es decir, de la misma familia genética.

Escogimos y empacamos en bolsas de tul 50 semillas por familia y sistema de apareamiento, e hicimos previamente un pequeño corte en la testa para facilitar la imbibición a la mitad de dichas semillas. Las dejamos en remojo en una cubeta durante 7 días dentro de una cámara de germinación, a una temperatura de 25° C en el día y 20° C en la noche, con 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Mantuvimos el agua constantemente oxigenada con una bomba para acuario y la cambiamos varias veces al día.

Siembra, transplante y riego:

Con el fin de exacerbar los posibles efectos de la depresión endogámica sobre las plantas procuramos que estuvieran sometidas a un ambiente estresante (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011), por esta razón sembramos nuestras plantas en un sustrato con recursos limitados. Sembramos las semillas en macetas de 1L en una mezcla de sustrato con 50% arena, 25% perlita (Agrolita ®) para aumentar la aireación y la retención de agua, y 25% vermiculita para favorecer la retención de nutrientes en el suelo. Programamos cinco riegos diarios por micro-aspersión entre las 07:00 y las 17:00 hrs separados cada dos horas, siendo el primero y el último de 3 min, y los intermedios de 1 min. Tras dos semanas de desarrollo, transplantamos cada plántula en una maceta y mantuvimos las condiciones de riego.

Fertilización e insecticida:

Fertilizamos tres veces el sustrato con 200 mL de solución de fertilizante Peters ® 20:20:20 (N,P, K) 100mg/L (un nivel bajo de nutrientes reportado en la tabla 1 de McConnaughay & Coleman, 1999). Hicimos la primera fertilización justo después del transplante, y las dos siguientes cada 15 días. Tras este periodo redujimos a la mitad la concentración del fertilizante y realizamos una última aplicación 5 semanas después. Rociamos las plantas con insecticida en aerosol (Raid ®) dos veces después de detectar moscas blancas (*Bemisia tabaci*) dentro del invernadero.

MEDICIÓN DE CARACTERES VEGETATIVOS

TASA RELATIVA DE CRECIMIENTO

Durante el experimento medimos las hojas y tallos de cada planta, justo antes de aplicar el daño foliar (tras 4 semanas del transplante), y al final del experimento (a las 14 semanas del transplante). Medimos la longitud del tallo desde la base hasta la última ramificación, y obtuvimos la tasa relativa de crecimiento con la *Ecuación 1*:

Ecuación 1

$$\text{Tasa Relativa de crecimiento: } \frac{\text{Longitud 2} - \text{Longitud 1}}{\text{Tiempo 2} - \text{Tiempo 1}}$$

También contamos el número total de hojas y medimos su longitud para calcular el área foliar.

ÁREA FOLIAR:

En 8 plantas elegidas al azar, siendo cada una de diferente familia, siendo la mitad de cada sistema de pareamiento, medimos la longitud de todas las hojas y su área con un medidor de área foliar (LI-COR, LI 3100C); con esta información hicimos una regresión lineal y obtuvimos la *Ecuación 2*:

Ecuación 2

$$A = 0.53151 - 0.33425 L + 0.43555 L^2$$

donde A es el área de la hoja, y L es su longitud. ($R^2 = 0.972$)

Empleamos esta ecuación para calcular el área de las hojas de todas las plantas a partir de su longitud (Núñez-Farfán & Dirzo, 1994; Valverde et al., 2001).

FOTOSÍNTESIS Y VARIABLES FISIOLÓGICAS ASOCIADAS:

Medimos la tasa fotosintética ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la conductancia estomática ($\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y la transpiración ($\text{mmol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en todas las plantas antes (a las 4 semanas del transplante) y después del tratamiento de daño (a las 9 semanas del transplante) con un equipo IRGA LI-6400 XT. Realizamos las medidas con luz roja y azul (1200 RFA) entre las 09:00 y las

16:00 hrs. Hicimos una medida por hoja por planta, en hojas de la misma edad. Adicionalmente calculamos la eficiencia en el uso del agua (EUA) para cada planta con la *Ecuación 3*:

Ecuación 3

$$\text{Eficiencia en el Uso del Agua} = \frac{\text{Fotosíntesis}}{\text{Transpiración}}$$

DAÑO FOLIAR:

Antes de iniciar la floración de las plantas, dañamos mecánicamente sustrayendo el 50% del área de cada hoja. Para ello utilizamos sacabocados metálicos e hicimos hoyos circulares de área conocida, simulando el daño que realizan algunos herbívoros. Previamente medimos el largo de cada hoja y empleamos la *Ecuación 2* para calcular el área a dañar y el número de hoyos por hoja según el diámetro del sacabocados. Antes de dañar las plantas retiramos manualmente el primer botón floral a las plantas que empezaban a desarrollarlo, asegurando que la floración de todas ocurriera después del daño.

COMPONENTES DE ADECUACIÓN

Polinizamos todas las flores con su propio polen para asegurar la producción de frutos. Contamos el número de ramas y frutos por planta, así como el número de semillas por fruto; adicionalmente escogimos y pesamos aleatoriamente 15 semillas de un sólo fruto por planta. Tras la colecta de los frutos, empacamos las semillas en bolsas de papel glassine para asegurar su preservación, y aireación.

ADECUACIÓN RELATIVA

Calculamos la adecuación relativa por planta con la *Ecuación 4*:

Ecuación 4

$$w = \frac{w_i}{\bar{w}}$$

donde w_i es el número de semillas totales por planta, y \bar{w} es el promedio de semillas por planta en la población (Lande & Arnold, 1983).

COMPONENTES DE DEFENSA

TOLERANCIA

El cálculo de la tolerancia se hizo con base en la adecuación relativa de las plantas dañadas y control de cada familia con la *Ecuación 5*: (Modificada de Strauss & Agrawal, 1999):

Ecuación 5

$$\bar{T} = \frac{\bar{w}_a \text{ Daño} - \bar{w}_a \text{ Control}}{\bar{w}_a \text{ Control}}$$

donde w_a es la adecuación relativa de las plantas de la familia a . Valores $\bar{T} < 0$ indican subcompensación, $\bar{T} = 0$ indican tolerancia completa, y $\bar{T} > 0$ indican sobrecompensación.

RESISTENCIA

Densidad de tricomas foliares:

Colectamos y prensamos todas las hojas de cada planta y las secamos en una estufa a 35 °C. Hicimos el conteo de tricomas con un esteromicroscopio en un campo visual de 4,15mm² en la superficie adaxial de cada hoja, en la zona basal derecha, entre la primera y segunda vena (Valverde et al., 2001). Medimos la longitud de cada hoja para calcular la densidad de tricomas con base en el área foliar usando la *Ecuación 6*: para evitar sesgos debidos al tamaño de la hoja.

Ecuación 6

$$\text{Densidad de tricomas por hoja} = \frac{a_i \times t_i}{c},$$

donde a_i es el área de la hoja i , t_i es el número de tricomas de la hoja i en un campo, y c es el área de dicho campo. Luego calculamos la densidad promedio de tricomas foliares por planta con la *Ecuación 7*:

Ecuación 7

$$\text{Densidad promedio de tricomas foliares por planta} = \frac{\sum \text{Densidad de tricomas por hoja}}{\# \text{ Hojas}}$$

donde n es el número total de hojas.

Concentración de tropano alcaloides:

Extracción:

Realizamos una extracción por partición ácido básica de tropano alcaloides a partir de hojas secas previamente pesadas. Tras hacer el conteo de tricomas, molimos todas las hojas de la planta, y dejamos agitando en un matraz con 10 mL de MeOH (99% - grado HPLC) durante 12 horas, evitando la exposición a la luz de la mezcla. Filtramos los residuos vegetales y evaporamos el MeOH en un multivapor (Multivapor™ P-6 / P-12, Büchi) a 50 °C con una presión de 235 mbar.

Posteriormente añadimos 10 mL de HCL 0,1N y realizamos dos lavados sucesivos con 10 mL de CHCl₃ (grado HPLC) en un embudo de decantación (conservando siempre la fase menos densa). Neutralizamos esta mezcla con 0,082 g de NaHCO₃ y añadimos 20 mL de CHCl₃ para solubilizar los alcaloides (conservando esta vez la fase más densa). Evaporamos el CHCl₃ en el multivapor a 40 °C con una presión de 306 mbar, y transvasamos el extracto a viales de vidrio diluyendo en MeOH (Castillo et al., 2013). Posteriormente permitimos la evaporación del MeOH y almacenamos las muestras en seco. Las extracciones, al igual que la cuantificación de alcaloides se hicieron en un orden totalmente aleatorio de las plantas de las distintas familias y tratamientos.

Cuantificación:

Resuspendimos en MeOH e inyectamos cada muestra en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, Agilent 1100 Series), empleando una columna de fase reversa (Discovery C-18, Supelco Analytical) para la separación de los componentes de la muestra. La fase móvil que usamos fue una solución de CH₃CN, MeOH y un buffer de fosfatos 30mM (11:6:83 v/v/v) a un pH de 6.0. Mantuvimos el detector DAD a una longitud de onda de 210 nm. Dada la poca cantidad de extracto de las muestras, el volumen de resuspensión en MeOH fue de 100 µL por muestra, y el volumen de inyección fue de 20 µL. Hicimos las corridas con un flujo de 1mL/min durante los primeros 5 min y aumentamos a 1,5mL/min hasta el final de la corrida, que duró en total 20 min por muestra. Como referencia usamos soluciones de estándares de atropina y escopolamina a concentraciones de 0.01 y 0.005 mg/mL, que inyectamos cada fecha en que corrimos muestras (Modificado de Castillo et al., 2013). Cabe aclarar que, debido a la limitada cantidad de extracto obtenido para las muestras, solo fue posible realizar una inyección por muestra, por lo que no obtuvimos replicas a nivel individual.

Cálculo de la concentración:

Para calcular la concentración de alcaloides, tomamos como referencia los picos de los estándares para cada fecha. De acuerdo al tiempo de retención de dichos estándares, integramos manualmente los picos correspondientes a la atropina y la escopolamina obtenidos en las muestras. Para empezar, partimos de los estándares con concentración conocida y calculamos el peso (mg) de cada alcaloide (X_1) presente en el volumen inyectado (µL) de estándar de acuerdo a la *Ecuación 8*:

Ecuación 8

$$X_1 = \frac{\text{mg alcaloide en solución de estándar} \times \mu\text{L inyectados}}{\mu\text{L de solución}}$$

A partir de X_1 y la altura del pico del estándar y la muestra, calculamos el peso de alcaloides en la muestra (X_2) con la *Ecuación 9*:

Ecuación 9

$$X_2 = \frac{X_1 \times \text{altura de pico del estándar}}{\text{altura de pico muestra}}$$

Luego, con base en X_2 calculamos el peso (mg) de cada alcaloide en el volumen de muestra inyectado partiendo del volumen de solvente usado para la resuspensión de la muestra (X_3) con la Ecuación 10:

Ecuación 10

$$X_3 = \frac{X_2 \times \mu\text{L de solvente de resuspensión de muestra}}{\mu\text{L de muestra inyectado}}$$

Por último, usamos X_3 para calcular el peso de alcaloide (mg) por gramo de hoja molida de la muestra (X_4) con la Ecuación 11

Ecuación 11

$$X_4 = \frac{X_3 \times 1\text{g de hoja}}{\text{g de hoja molida de la muestra}}$$

De esta forma calculamos la concentración de escopolamina y atropina en las muestras; además, calculamos los *alcaloides totales* sumando la concentración de ambos alcaloides.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos nuestros análisis estadísticos empleamos el programa JMP® 10, y para graficar usamos GraphPad Prism® 6.

EFFECTOS DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO, LA VARIANZA GENÉTICA Y EL TRATAMIENTO

Hicimos análisis multivariado de varianza (MANOVA) tomando la familia como efecto aleatorio, y el tratamiento de daño, el sistema de apareamiento como fijos, incluimos además la interacción entre estos dos últimos factores como fuentes de variación. Incluimos en el modelo varios caracteres vegetativos y fisiológicos (área foliar, tasa relativa de crecimiento, tasa fotosintética y variables asociadas) los componentes de adecuación (adecuación relativa, peso promedio de las semillas), y caracteres de defensa (concentración de escopolamina y atropina, alcaloides totales, y densidad de tricomas foliares). Posteriormente hicimos análisis de varianza univariados para dichas variables.

Usando el método de EMS (Expected Mean Squares) realizamos análisis de varianza (ANOVA) con los promedios familiares (valores genéticos) de todos los rasgos para evaluar si los caracteres de resistencia, tolerancia y adecuación fueron determinados por tres principales fuentes de variación: el tratamiento de daño (plasticidad fenotípica entre controles y plantas dañadas), el sistema de apareamiento y la familia (efectos de la varianza genética sobre expresión de rasgos defensivos). Tomamos el tratamiento y el sistema de apareamiento como efectos fijos, y la familia como aleatorio. Cuando son significativas, las interacciones sistema de apareamiento \times tratamiento, y familia \times tratamiento, indican una interacción entre el genotipo y el ambiente. La ausencia de

diferencias significativas en un atributo entre plantas control y plantas dañadas indica que las últimas están compensando.

Empleamos la transformación logarítmica (base 10) para normalizar las siguientes variables: tasa relativa de crecimiento, fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, la eficiencia en el uso del agua, concentración de atropina y escopolamina y los alcaloides totales.

DEPRESIÓN ENDOGÁMICA

Calculamos la depresión endogámica (δ) de 20 familias de *D. stramonium* para el área foliar promedio, la tasa relativa de crecimiento, la densidad promedio de tricomas foliares, la adecuación relativa, y el peso promedio de las semillas, de acuerdo a la *Ecuación 12*: (Lande & Schemske, 1985):

Ecuación 12

$$\delta = 1 - \left(\frac{\bar{w}_{\text{autofecundación}}}{\bar{w}_{\text{entrecruzamiento}}} \right),$$

Donde $\bar{w}_{\text{autofecundación}}$ y $\bar{w}_{\text{entrecruzamiento}}$ son los valores promedio para cada carácter en las progenies de plantas endogámicas y exogámicas, respectivamente. También calculamos la depresión endogámica para la tolerancia con la *Ecuación 13*: para hacer más intuitiva su interpretación, ya que esta variable puede tomar valores negativos.

Ecuación 13

$$\delta = \left(\frac{\bar{w}_{\text{autofecundación}}}{\bar{w}_{\text{entrecruzamiento}}} \right) - 1.$$

Valores positivos indican depresión endogámica, mientras que valores negativos indican depresión exogámica, y el cero indica igualdad estadística en la respuesta de ambos tipos de progenie. Realizamos un re-muestreo mediante Jackknife con el fin de estimar el error y la media de la depresión endogámica; para ello calculamos los valores promedio de cada carácter y sistema de apareamiento, removiendo una familia i diferente cada vez del conjunto de n familias. A partir de estos nuevos datos recalculamos la depresión endogámica como δ_{-i} (tomando como base la *Ecuación 13*:), y posteriormente obtuvimos los pseudovalores de nuestro estadístico con la *Ecuación 14*: (Modificada de Núñez-Farfán, 1991)

Ecuación 14

$$\tilde{\delta}_i = n\delta - (n - 1)\delta_{-i}$$

A partir de dichos pseudovalores estimamos la media del estadístico ($\bar{\delta}$) y su error estándar ($S_{\bar{\delta}}$) con la *Ecuación 15* y *Ecuación 16*, respectivamente (Modificadas de Núñez-Farfán, 1991)

Ecuación 15

$$\bar{\delta} = \frac{\sum \bar{\delta}_i}{n}$$

Ecuación 16

$$S_{\bar{\delta}} = \sqrt{\frac{\sum(\bar{\delta}_i - \bar{\delta})^2}{n(n-1)}}$$

Con las estimaciones obtenidas hicimos una prueba *t* de Student de dos colas ($\alpha/2=0.025$) para evaluar si la depresión endogámica estimada es significativamente diferente de cero ($H_0: \mu; H_a: \mu$). Calculamos los valores de *t* para cada carácter con la *Ecuación 17* (siendo $\mu=0$):

Ecuación 17

$$t = \frac{\bar{\delta} - \mu}{S_{\bar{\delta}}}$$

RELACIÓN ENTRE ESTRATEGIAS DE DEFENSA

Con el fin de evaluar la existencia de una correlación genética entre la tolerancia y la resistencia, realizamos un análisis de correlación de los valores familiares promedio de tolerancia y densidad de tricomas foliares y concentración de tropano alcaloides. También realizamos análisis de correlación entre todos los caracteres de resistencia.

ANÁLISIS DE SELECCIÓN NATURAL Y COSTOS ADAPTATIVOS

Evaluamos la existencia de costos de la expresión de caracteres defensivos mediante la regresión de los valores genéticos de la adecuación y los caracteres de defensa en plantas control. En ausencia de daño, las defensas no representan un beneficio para el organismo, sino un costo (Simms & Rausher, 1987). Hicimos además un análisis de selección natural sobre los caracteres de defensa según el tratamiento y el sistema de apareamiento, empleando para ello los valores los valores fenotípicos, y también los genéticos (promedios familiares) para evitar sesgos debidos a la covarianza entre los rasgos y el ambiente (Núñez-Farfán, 1991, Núñez-Farfán & Dirzo, 1994; Rausher, 1992). Dado que la varianza genética indica potencial evolutivo, sólo realizamos los análisis de selección tras la detección de varianza genética para los caracteres. Para estimar la selección direccional realizamos una regresión múltiple lineal de la adecuación relativa (*w*) como función de cada uno de los rasgos defensivos (densidad de tricomas foliares y concentración de tropano alcaloides), siendo el coeficiente β_i el gradiente de selección direccional del carácter x_i . Valores negativos de β_i indican selección direccional negativa, y valores positivos indican selección direccional positiva. Por otro lado, para establecer si hubo selección disruptiva o balanceadora realizamos una regresión múltiple de la adecuación en función de los valores cuadráticos de los caracteres defensivos; en este caso el coeficiente γ_{ii} es el gradiente de selección curvilínea en el carácter x_i . Si γ_{ii} es positiva, indica selección disruptiva, mientras que si es negativa, indica selección balanceadora (Núñez Farfán, 1991; Lande & Arnold, 1983; Falconer, 1997).

RESULTADOS

Un análisis multivariado de varianza (MANOVA) (Tabla 1) o que la familia, el daño y la interacción del daño con el sistema de apareamiento tienen un efecto significativo sobre las variables que medimos en éste estudio, por lo que en adelante se muestran análisis de varianza (ANOVA) para cada una incluyendo dichos factores.

Tabla 1. MANOVA de los caracteres vegetativos y fisiológicos (área foliar promedio, tasa relativa de crecimiento, tasa de fotosíntesis), componentes de la adecuación (adecuación relativa, peso promedio de las semillas), y caracteres de defensa (densidad promedio de tricomas foliares, concentración de tropano alcaloides) en *D. stramonium*. Se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$).

Fuente de variación	Wilk's λ	<i>F</i>	g.l. Numerador	g.l. Denominador	<i>P</i>
Modelo	0.0381	2.3584	207	1029	< 0.0001
Familia	0.0550	2.3599	180	1008.2	< 0.0001
Sistema de apareamiento	0.0116	1.5473	9	120	0.1391
Tratamiento	0.2794	3.7264	9	120	0.0004
Sistema de apareamiento × Tratamiento	0.1569	2.0916	9	120	0.0353

CARACTERES VEGETATIVOS

Los análisis de varianza mostraron que, tanto para la tasa relativa de crecimiento como para el área foliar promedio, hubo un efecto familiar significativo (Tabla 2, Figura 2); asimismo, las plantas de entrecruzamiento tuvieron en promedio valores más altos que las de autofecundación (7% mayores para la tasa de crecimiento, y 6% mayores para el área foliar promedio). No encontramos evidencias de crecimiento compensatorio de tallos, ya que después de un tiempo de recuperación de aproximadamente siete semanas tras el daño foliar artificial, las plantas dañadas presentaron valores menores (11%) en la tasa relativa de crecimiento que las plantas control (Figura 3). Por otra parte, la interacción tratamiento × sistema de apareamiento no fue significativa para esta variable. Aunque nuestras plantas sufrieron de una enfermedad viral al final del experimento, ésta no tuvo efectos significativos sobre los caracteres medidos.

Las plantas control derivadas de exogamia presentaron un área foliar 12% mayor que las dañadas y tuvieron valores superiores a las plantas derivadas de autogamia. No se encontraron diferencias significativas entre progenies de plantas autógamias con y sin daño foliar (Figura 4), lo que indica compensación en área foliar (interacción tratamiento × sistema de apareamiento significativa).

No hubo diferencias significativas en fotosíntesis y variables fisiológicas asociadas entre niveles de daño foliar o sistema de apareamiento, antes o después del daño (Figura 5).

Tabla 2. Análisis de varianza de caracteres vegetativos de *D. stramonium*. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo. Los caracteres marcados con el superíndice ^{NS} no tuvieron un valor P significativo de ajuste al modelo de análisis de varianza.

Carácter	Fuente de variación	R^2	g.l.	F	P
Log Tasa relativa de crecimiento	Sistema de apareamiento		1	4.567	0.0367
	Tratamiento	0.38	1	14.123	0.0004
	Familia		20	2.6339	0.0020
Área foliar promedio	Sistema de apareamiento		1	4.3937	0.0404
	Tratamiento		1	13.931	0.0004
	Sistema de apareamiento × Tratamiento	0.42	1	4.594	0.0362
	Familia		20	2.9348	0.0007
Log Fotosíntesis ^{NS}	Sistema		1	1.1869	0.2777
	Tratamiento	0.03	1	2.6237	0.1074
	Familia		21	1.202	0.2576
Log Conductancia estomática ^{NS}	Sistema		1	0.4267	0.5146
	Tratamiento	0.09	1	0.6077	0.4369
	Familia		21	1.9359	0.0124
Log Transpiración ^{NS}	Sistema		1	0.2093	0.6480
	Tratamiento	0.07	1	0.411	0.5225
	Familia		21	1.7003	0.0365
Log Eficiencia del uso del agua ^{NS}	Sistema		1	0.016	0.8996
	Tratamiento	0.00	1	0.0514	0.8209
	Familia		21	1.0883	0.3667

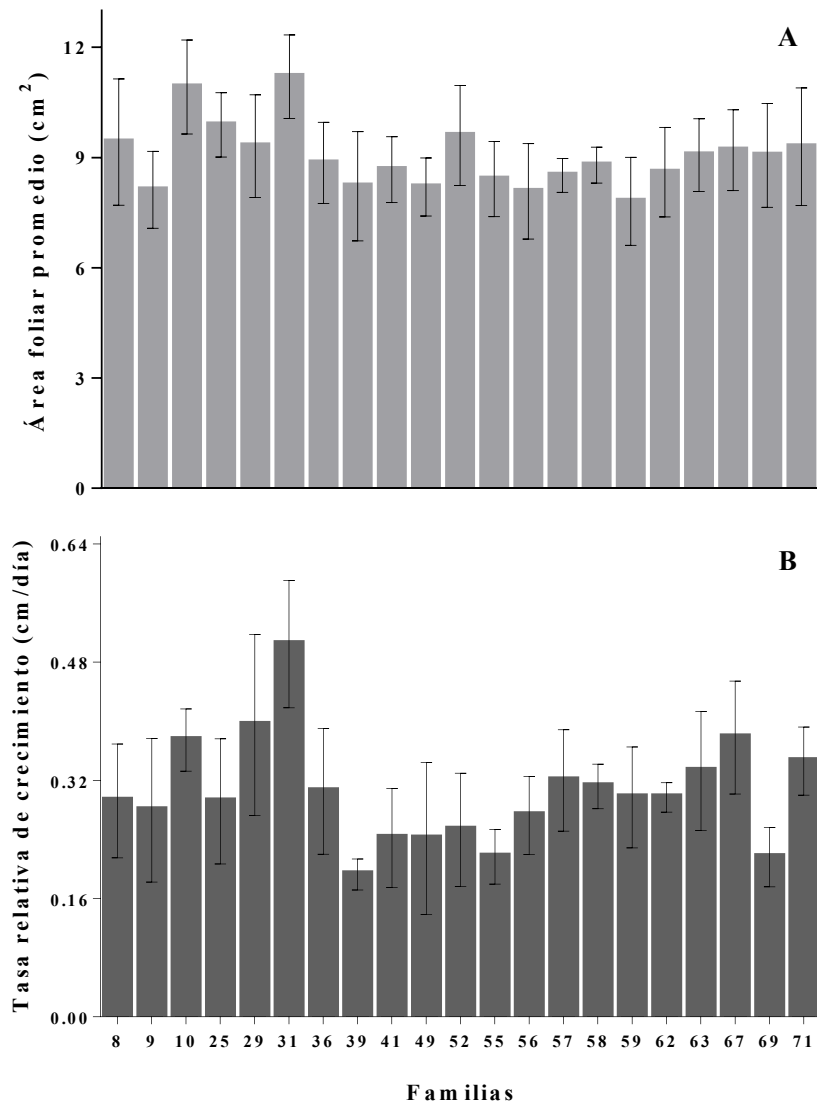


Figura 2. Valores familiares promedio (\pm DS) de Área foliar (A) y Tasa relativa de crecimiento (B) de *D. stramonium*.

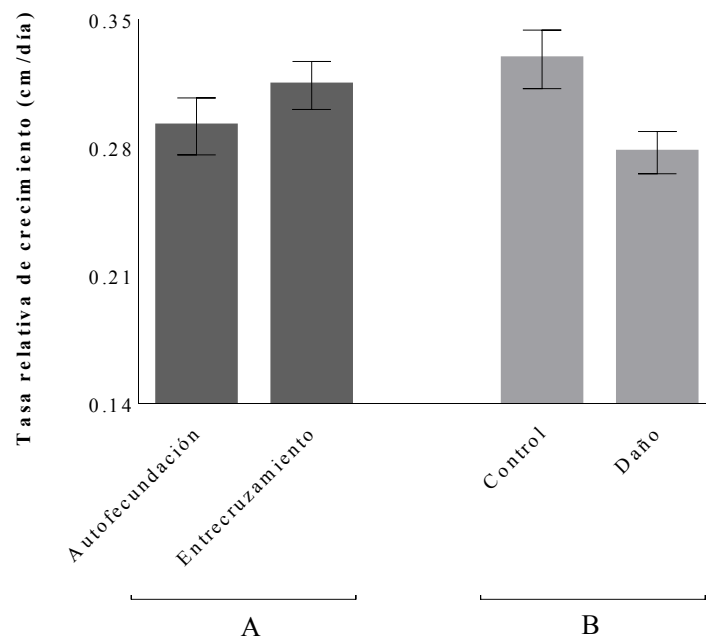


Figura 3. Valores promedio (\pm EE) de la tasa relativa de crecimiento para plantas de *D. stramonium* con diferente sistema de apareamiento (A) y tratamiento (B)

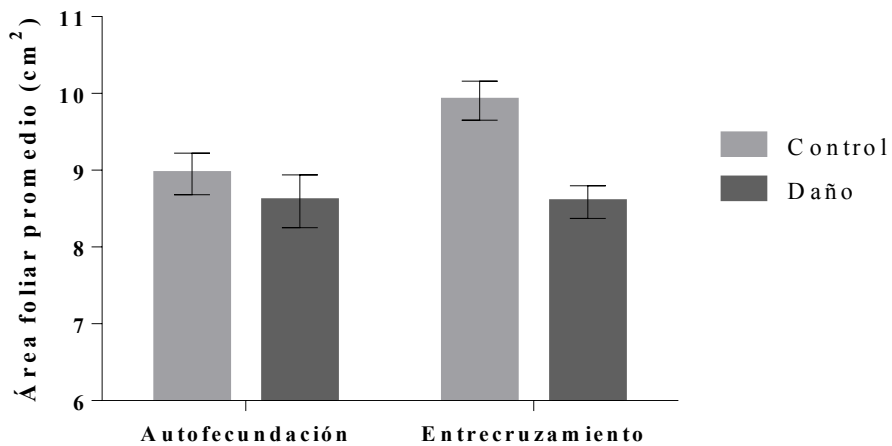


Figura 4. Valores promedio (\pm EE) de Área foliar para la interacción Sistema de apareamiento \times Tratamiento en *D. stramonium*.

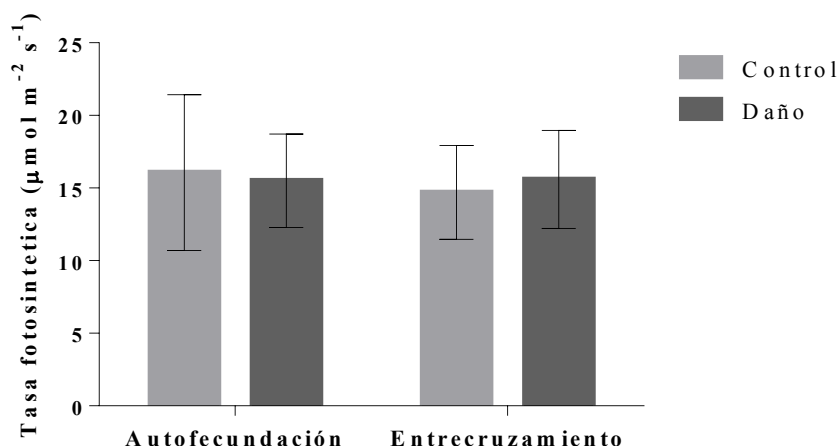


Figura 5. Tasa fotosintética promedio (\pm EE) en plantas de *D. stramonium* sometidas a diferente nivel de daño según su sistema de apareamiento.

COMPONENTES DE LA ADECUACIÓN

Encontramos que el daño foliar afectó significativamente la adecuación relativa de las plantas. También, hubo diferencias significativas entre plantas de las distintas familias, así como una interacción sistema de apareamiento \times daño para la adecuación relativa (Tabla 3). Las plantas derivadas de entrecruzamiento sin daño tuvieron mayor adecuación relativa que las plantas con daño (20% mayor), y que las plantas derivadas de autogamia.

En contraste las plantas derivadas de autogamia con o sin daño no difirieron en adecuación (Figura 6). Tanto la adecuación relativa como la masa promedio de las de las semillas producidas por ambos tipos de progenie poseen varianza genética (Figura 7). Por otra parte, la masa promedio de las semillas no fue afectada por el sistema de apareamiento que generó estas semillas o por el daño foliar a la planta madre (Tabla 3), esta variable presentó además una correlación positiva con la adecuación relativa en plantas de ambos sistemas de apareamiento (Autofecundación: $R^2 = 0.10$, $P = 0.0557$; Entrecruzamiento: $R^2 = 0.11$, $P = 0.0194$) y en plantas de diferente tratamiento (Control: $R^2 = 0.11$, $P = 0.0166$, Daño: $R^2 = 0.10$, $P = 0.0402$). No hubo diferencias significativas en el número de ramas y frutos debidas al tratamiento de daño, el sistema de apareamiento, la familia o la interacción.

Tabla 3. Análisis de varianza de la adecuación relativa y de la masa promedio de las semillas en progenies de *Datura stramonium* derivadas de entre- e intra-cruzamiento, con y sin daño foliar. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo.

Carácter	Fuente de variación	R^2	G.L.	F	P
Adecuación relativa (w)	Sistema de apareamiento		1	0.7588	0.3872
	Tratamiento		1	8.1727	0.0059
	Sistema de apareamiento \times Tratamiento	0.29	1	8.1575	0.0059
	Familia		20	1.9181	0.0279
Peso promedio semillas	Sistema de apareamiento		1	0.0078	0.9300
	Tratamiento	0.23	1	0.0717	0.7898
	Familia		20	2.3241	0.0063

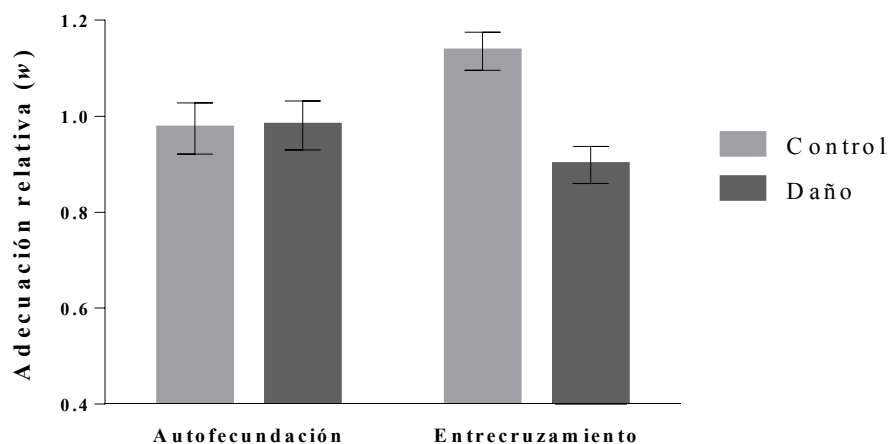


Figura 6. Valores promedio (\pm EE) de adecuación relativa (w) para la interacción Sistema de apareamiento \times Tratamiento de daño en *D. stramonium*.

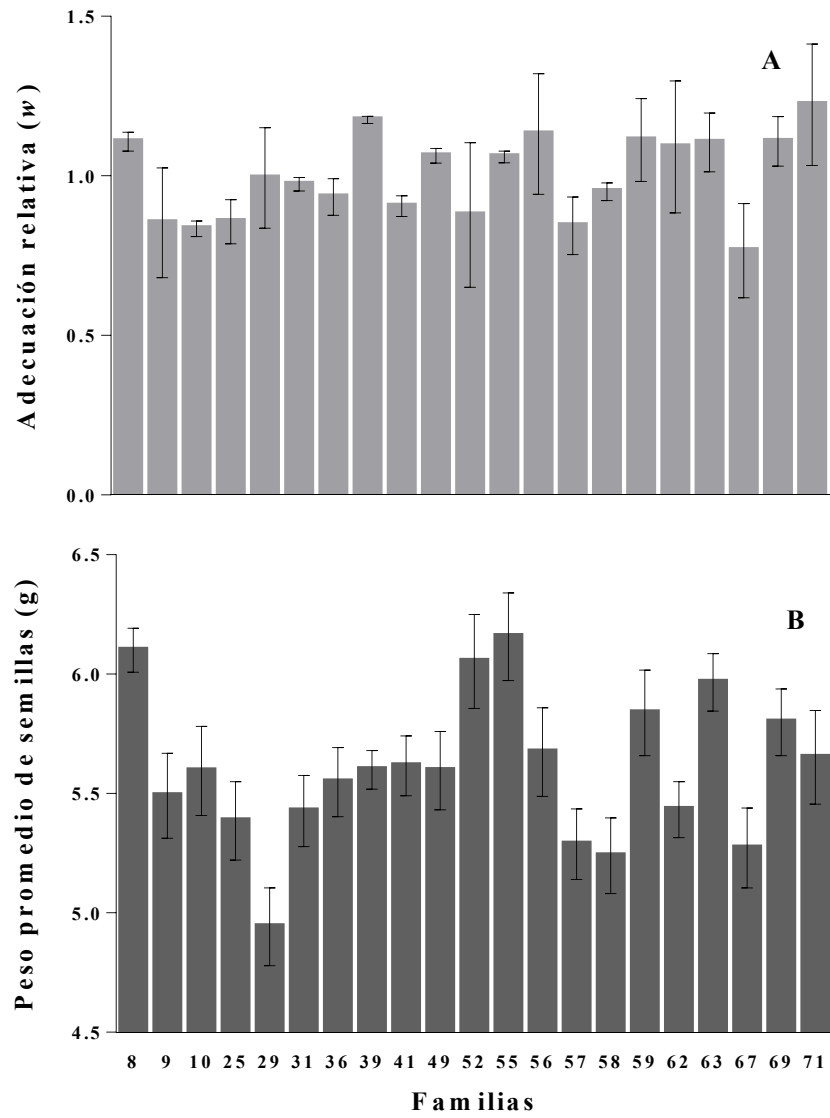


Figura 7. Valores familiares promedio (\pm DS) de adecuación relativa (A) y peso promedio de las semillas (B) de *D. stramonium*.

CARACTERES DE DEFENSA

Encontramos que, en promedio, la tolerancia al daño fue casi 10 veces mayor en las progenies de plantas autógamas, pues presentaron tolerancia completa e incluso sobrecompensación con respecto a las progenies exógamas que, por el contrario, tendieron a subcompensar (Figura 8). Por otra parte, no detectamos varianza genética en este carácter (Tabla 4), esto probablemente ocurrió porque esta variable se basa en promedios familiares, lo que limita el número de réplicas y el poder estadístico del análisis. En contraste, la densidad promedio de tricomas foliares si presentó varianza genética (Figura 9), pero no fue afectado significativamente por el tratamiento, ni por el sistema de apareamiento. Lo anterior indica que no hubo un efecto de inducción en la producción de tricomas foliares a raíz del daño, ni una producción diferencial de tricomas entre las progenies autógamas y exógamas.

Por otra parte, encontramos que la concentración promedio (mg/g de hoja) de escopolamina ($\bar{x}=0.0199$, $\pm EE: 0.00159$) fue aproximadamente 10 veces mayor que la concentración de atropina ($\bar{x}= 0.00129$, $\pm EE: 0.00015$) en todas las plantas. También detectamos varianza genética para la concentración de ambos alcaloides, y notamos que en algunas familias ambos alcaloides presentan altas concentraciones, mientras que en otras ambos alcaloides se presentan en baja concentración (Figura 10). No encontramos efectos significativos del tratamiento ni del sistema de apareamiento para ninguno de los dos alcaloides.

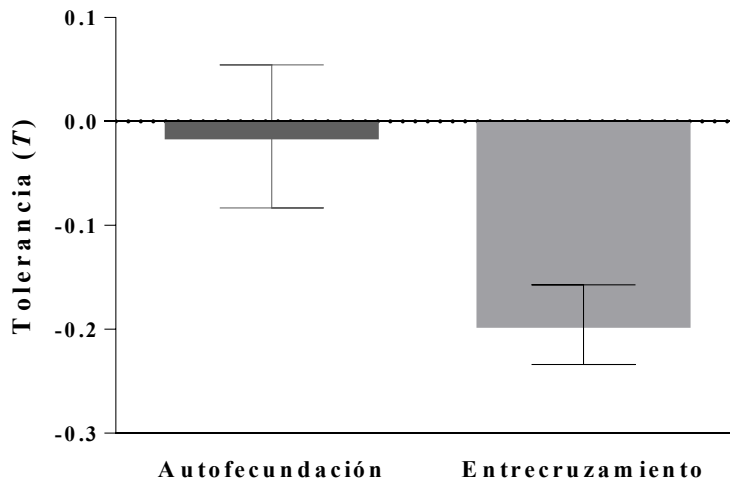


Figura 8. Valores familiares promedio ($\pm EE$) de tolerancia (\bar{T}) para plantas con diferente sistema de apareamiento de *D. stramonium*. Valores $\bar{T} < 0$ indican subcompensación, $\bar{T} = 0$ indican tolerancia completa, y $\bar{T} > 0$ indican sobrecompensación

Tabla 4. Análisis de varianza de los valores reproductivos ("breeding values" o promedio familiares) de caracteres defensivos de *D. stramonium*. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo.

Carácter	Fuente de variación	R^2	g.l.	F	P
Tolerancia	Sistema de apareamiento	0.1	1	5.4357	0.0250
	Familia	0.0	20	0.7955	0.6931
Densidad promedio de tricomas foliares por planta	Sistema de apareamiento		1	3.762	0.0571
	Tratamiento	0.4	1	0.5637	0.4557
	Familia		20	3.6313	< 0.0001
Log Concentración de Escopolamina (mg/g hoja)	Sistema de apareamiento		1	0.2769	0.6007
	Tratamiento	0.14	1	3.8528	0.0543
	Familia		20	2.4077	0.0046
Log Concentración de Atropina (mg/g hoja)	Sistema de apareamiento		1	0.0495	0.8247
	Tratamiento	0.36	1	0.1202	0.7300
	Familia		20	3.2856	0.0002

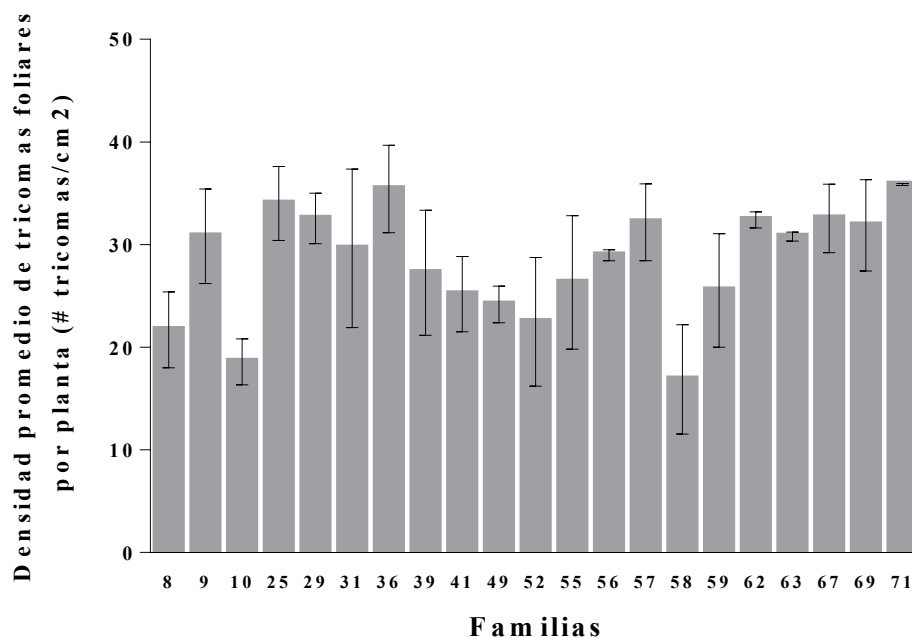


Figura 9. Valores familiares promedio (\pm DS) de densidad de tricomas foliares por planta de *D. stramonium*.

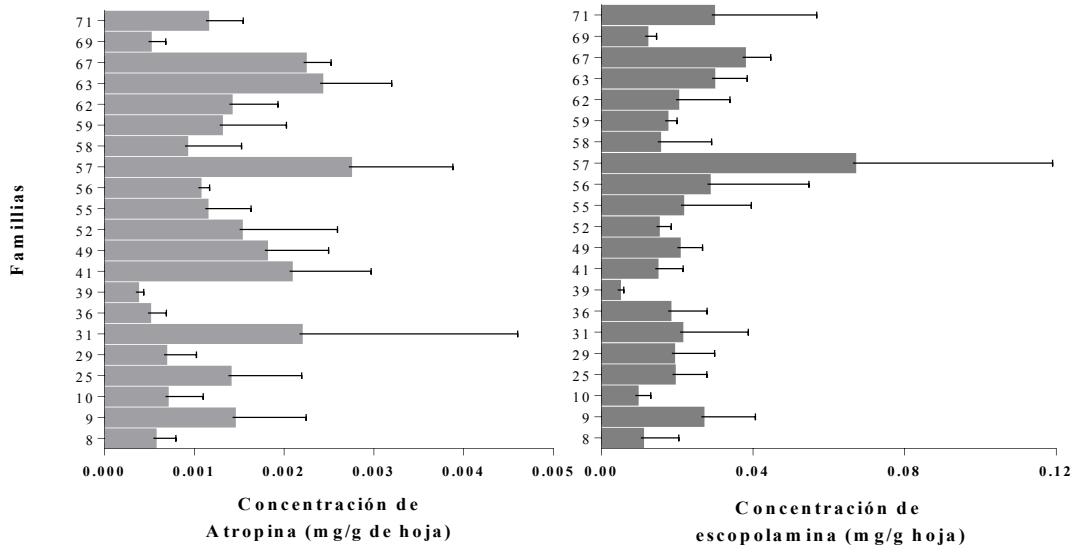


Figura 10. Concentración de Atropina y Escopolamina (\pm DS) en diferentes familias de *D. stramonium*.

En cuanto a la relación entre las diferentes alternativas defensivas, encontramos una relación positiva entre la densidad de tricomas foliares y los tropano alcaloides que fue distinta de acuerdo al tratamiento. Las progenies autóгамas con daño, presentaron una correlación positiva entre atropina y tricomas, mientras que, en las plantas que no fueron dañadas, los tricomas tuvieron una correlación positiva con la escopolamina (Figura 11). Por otra parte, encontramos una relación positiva entre atropina y escopolamina tanto para las progenies de plantas autóгамas como para las exóгамas (Figura 12).

Detectamos también una correlación negativa entre la tolerancia y la densidad promedio de tricomas foliares en las plantas generadas por autofecundación (Figura 13), sin embargo dicha correlación no fue significativa en las plantas generadas por entrecruzamiento. Los alcaloides también presentaron una relación negativa significativa con la tolerancia, pero únicamente en progenies exóгамas (Figura 14). Lo anterior indica que existen correlaciones genéticas negativas entre la tolerancia y caracteres específicos de la resistencia, que dependen del sistema de apareamiento.

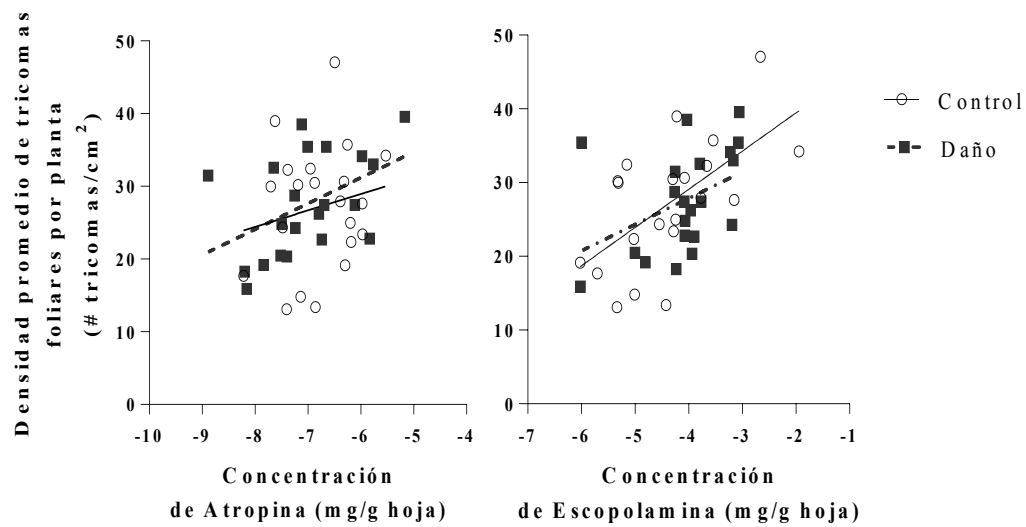


Figura 11. Relación entre la densidad promedio de tricomas foliares y la concentración de tropano alcaloides en plantas de *D.stramonium* generadas por autofecundación de acuerdo al tratamiento. (Atropina: Control $R^2 = 0.036$, $P = 0.2073$, Daño $R^2 = 0.18$, $P = 0.0334$; Escopolamina: Control $R^2 = 0.34$, $P = 0.0034$, Daño $R^2 = 0.13$, $P = 0.0563$).

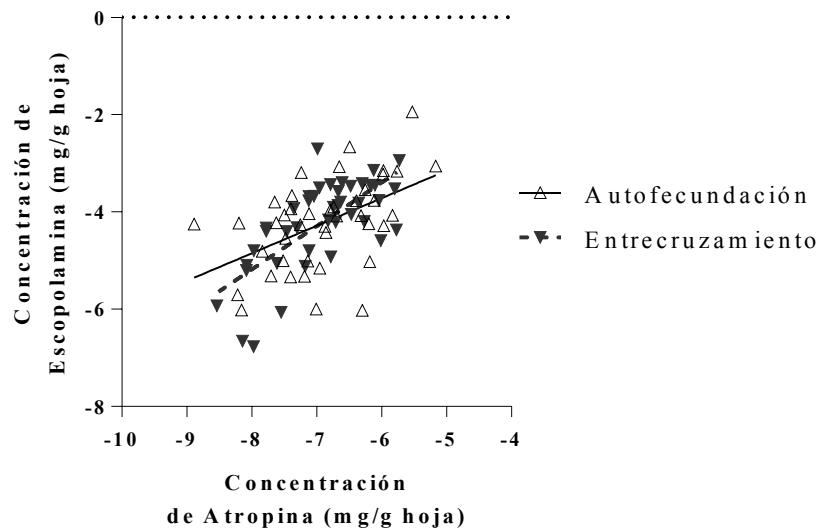


Figura 12. Relación entre la concentración de Atropina y Escopolamina en plantas generadas a partir de diferentes sistemas de apareamiento en *D. stramonium* (Autofecundación: $R^2 = 0.233$, $P = 0.008$; Entrecruzamiento: $R^2 = 0.410$, $P < 0.0001$).

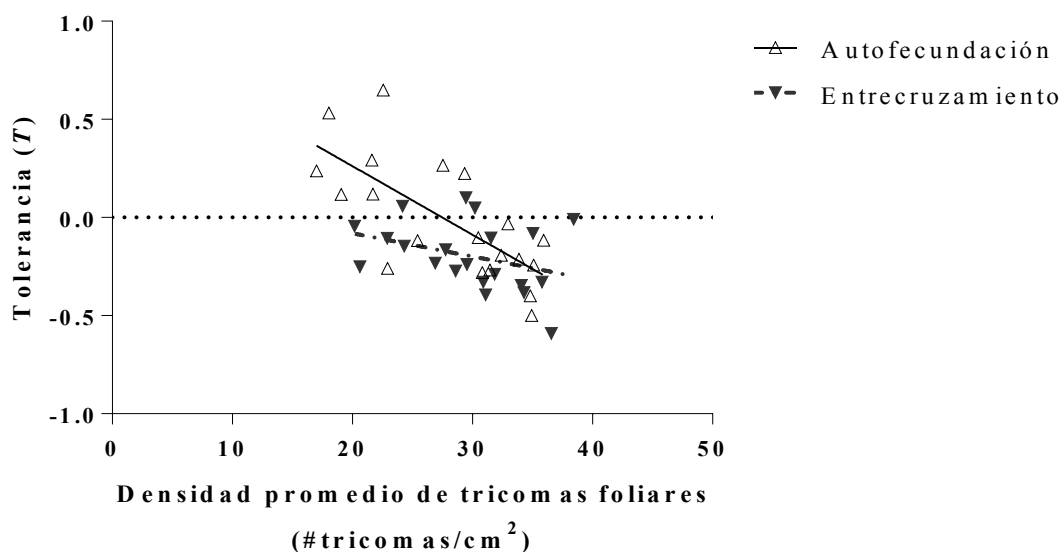


Figura 13. Correlación entre valores familiares promedio de densidad promedio de tricomas foliares y tolerancia en *D. stramonium*. (Autofecundación $R^2 = 0.485$, $P = 0.004$; Entrecruzamiento $R^2 = 0.076$, $P = 0.1210$)

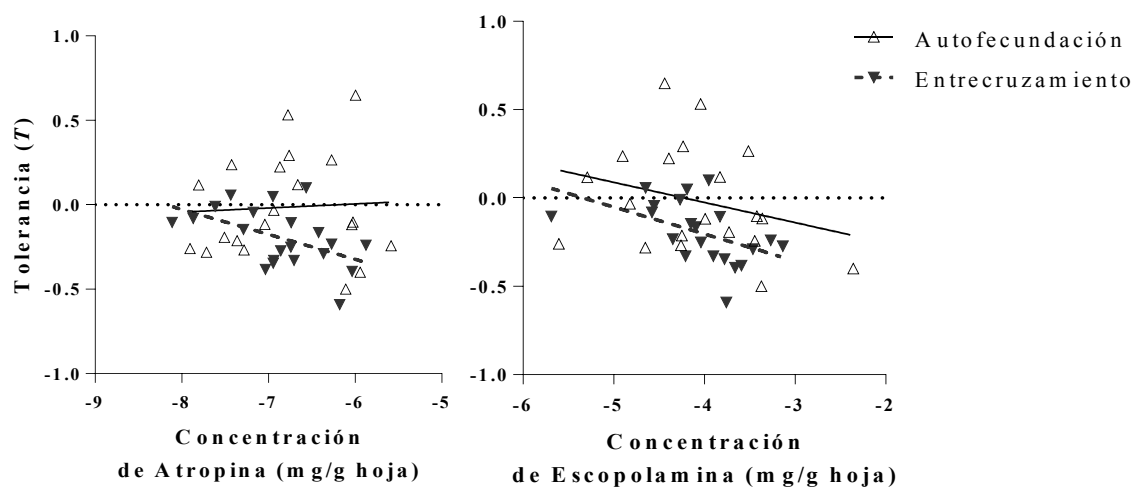


Figura 14. Relación entre la tolerancia y la concentración de tropano alcaloides en *D. stramonium* para progenies de plantas generadas por diferentes sistemas de apareamiento (Atropina: Autofecundación $R^2 = 0.05$, $P = 0.82$, Entrecruzamiento $R^2 = 0.20$, $P = 0.0233$; Escopolamina: Autofecundación $R^2 = 0.028$, $P = 0.2291$, Entrecruzamiento $R^2 = 0.19$, $P = 0.0264$).

DEPRESIÓN ENDOGÁMICA

Encontramos que las plantas control presentan depresión endogámica para el área foliar promedio, la densidad promedio de tricomas foliares, y la adecuación relativa. En contraste, para las plantas dañadas no hubo depresión endogámica para ningún carácter. Por otro lado, encontramos alta depresión exogámica para la tolerancia (Tabla 5). Notamos valores medios positivos de depresión endogámica para la tasa relativa de crecimiento y los alcaloides, sin embargo la variación en estos caracteres fue muy alta, haciendo que la depresión endogámica no fuera significativamente distinta de cero (Figura 15). Esto pudo ocurrir por las limitaciones experimentales en la cuantificación de los tropano alcaloides, ya que no fue posible contar con replicas individuales.

Tabla 5. Promedios de la depresión endogámica errores estándar ($S_{\bar{\delta}}$) y valores de t y P para diferentes caracteres de crecimiento, adecuación y defensas en plantas dañadas y no dañadas de *D. stramonium*. En negrita se resaltan los valores medios que son significativamente distintos de cero.

Estadístico	Tratamiento	Área Foliar promedio	Densidad promedio de tricomas foliares	Adecuación relativa	Tasa relativa de crecimiento	Peso Promedio semillas	Concentración de Atropina	Concentración de Escopolamina	Concentración Alcaloides totales	Tolerancia
$\bar{\delta}$	Control	0.0932	0.1323	0.1391	0.0613	0.0062	0.1620	0.2785	0.2724	-0.9286
$S_{\bar{\delta}}$		0.0323	0.0560	0.0483	0.0660	0.0221	0.1855	0.4159	0.3955	0.3550
t		2.8823	2.3318	2.8125	0.9279	0.2077	0.8732	0.6696	0.6887	-2.6159
P		0.0095	0.0309	0.0111	0.3651	0.8377	0.3929	0.5108	0.4990	0.017
$\bar{\delta}$	Daño	-0.0003	0.0294	-0.0990	0.0738	-0.0036	0.0187	-0.0705	-0.0646	
$S_{\bar{\delta}}$		0.0393	0.0583	0.0698	0.0529	0.0271	0.2633	0.1754	0.1736	
t		-0.0089	0.5007	-1.3493	1.3964	-0.1322	0.0712	-0.4021	-0.3720	
P		0.9930	0.6223	0.1931	0.1787	0.8962	0.9439	0.6918	0.7138	

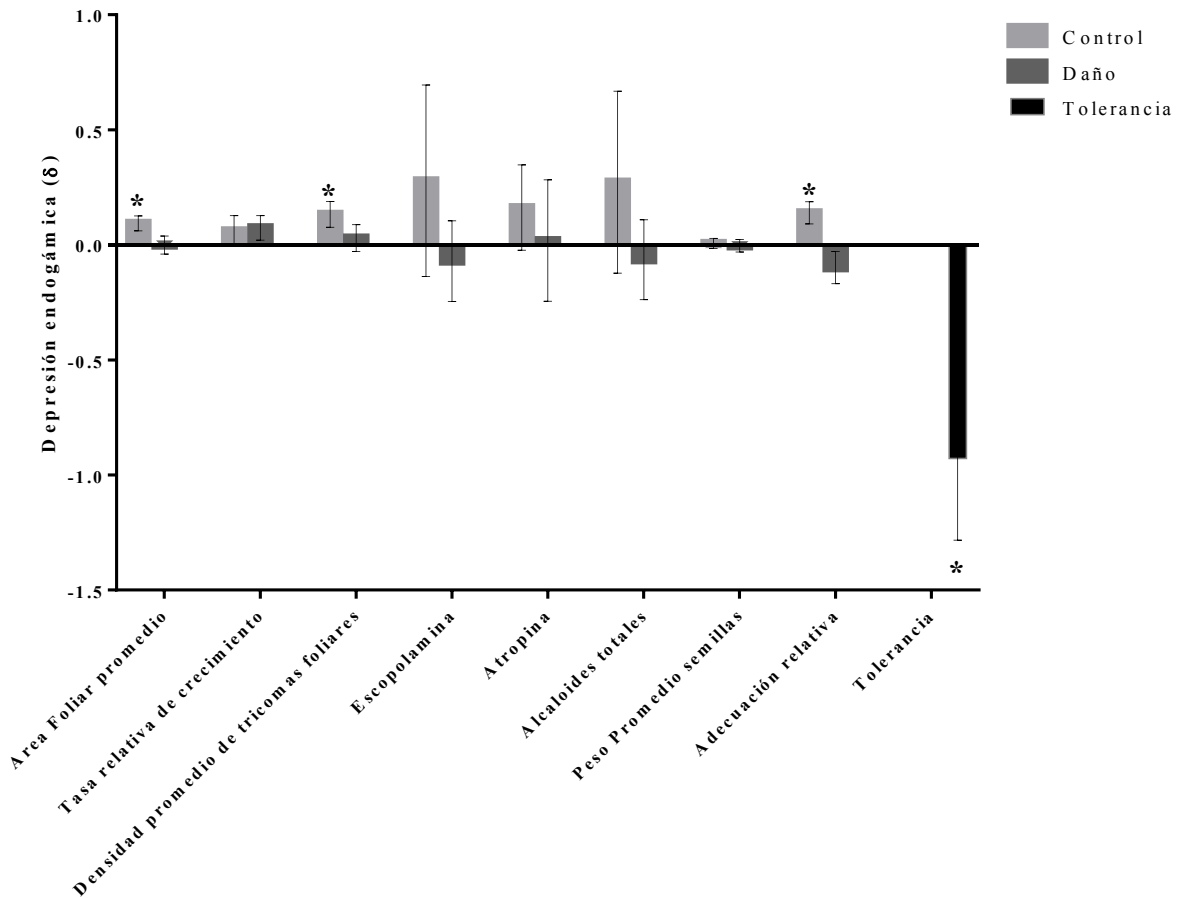


Figura 15. Depresión endogámica en caracteres vegetativos, defensivos y de adecuación en *D. stramonium* según el tratamiento. Se resaltan con asterisco las variables cuyos valores medios fueron significativamente distintos de cero.

SELECCIÓN NATURAL Y COSTOS ADAPTATIVOS

Los análisis de regresión múltiple de la adecuación relativa sólo fueron significativos para los valores fenotípicos de los caracteres, por lo tanto los análisis de selección que se presentan a continuación se refieren únicamente a dichos valores.

Encontramos un efecto positivo de los tricomas foliares sobre la adecuación en las progenies sin daño foliar de ambos sistemas de apareamiento, y para las de entrecruzamiento con daño, lo que indica que dichas progenies no presentaron costos asociados a la producción de tricomas foliares (Tabla 6, Tabla 7). En las plantas no dañadas de autofecundación la relación entre la adecuación y los tricomas no fue lineal, sino ligeramente curva, por tal razón es significativa tanto en el análisis lineal como en el cuadrático (Figura 16).

Por otra parte, hubo un efecto positivo del área foliar promedio sobre la adecuación en las plantas sin daño de entrecruzamiento; en contraste, la eficiencia en el uso del agua (EUA) y la tasa de crecimiento presentaron pendientes negativas. Además, encontramos selección direccional positiva

para la tasa fotosintética en plantas dañadas de entrecruzamiento, por lo tanto, aquellas plantas que sufrieron daño y tuvieron altas tasas fotosintéticas, tuvieron también mayor adecuación.

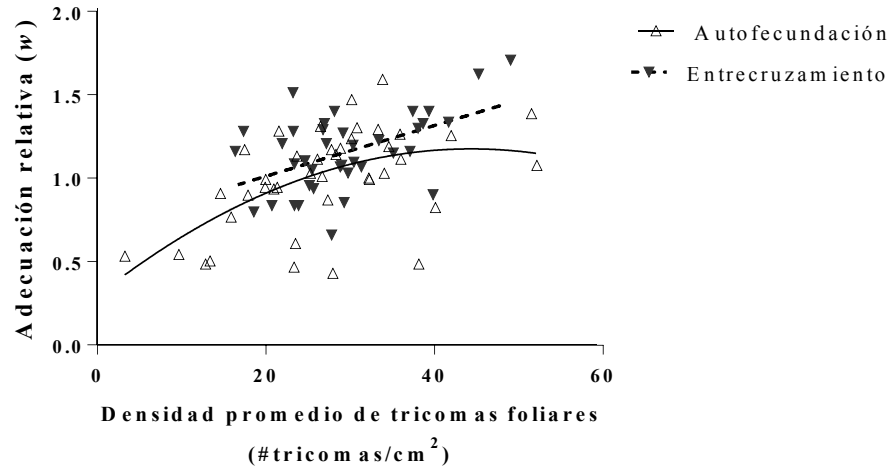


Figura 16. Análisis de costos en la adecuación relativa (w) por la producción de tricomas foliares (Autofecundación $R^2 = 0.2972$, $P = 0.00146$; Entrecruzamiento $R^2 = 0.2499$, $P = 0.0025$) en plantas sin daño de *D. stramonium*.

Tabla 6. Análisis de regresión lineal múltiple de los gradientes de selección direccional (β) sobre los valores genéticos y fenotípicos de los caracteres vegetativos y de resistencia en *D. stramonium* en progenies generadas por diferentes sistemas de apareamiento y con diferente tratamiento. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo de regresión lineal, junto a ella se muestran los valores de P y F del modelo de ANOVA de la regresión múltiple lineal.

	Carácter	AUTOFECUNDACIÓN				ENTRECRUZAMIENTO				
		β	Error estándar	t	P	β	Error estándar	t	P	
Valores fenotípicos	Control	Área foliar promedio	0.0316	0.0276	1.1	0.263	0.0643	0.0171	3.8	0.0008
		Tasa relativa de crecimiento	-0.149	0.1267	-1	0.2497	-0.185	0.0818	-2	0.0315
		Tasa fotosintética	0.0187	0.2806	0.1	0.9474	-0.177	0.2816	-1	0.5339
		Eficiencia en el uso del agua	0.0081	0.3323	0	0.9808	-0.297	0.1408	-2	0.0443
		Densidad promedio de Tricomas foliares	0.0171	0.0052	3.3	0.0028*	0.0124	0.004	3.1	0.0044
		Escopolamina	-0.04	0.0547	-1	0.4684	-0.036	0.0379	-1	0.3516
		Atropina	-0.058	0.0497	-1	0.2559	-0.012	0.044	-0	0.7819
			$R^2 = 0.27, P = 0.0242, F=2.8214$				$R^2 = 0.48, P = 0.0004, F=5.6344$			
	Daño	Área foliar promedio	0.0249	0.0396	0.6	0.534	-0.009	0.0317	-0	0.7734
		Tasa relativa de crecimiento	-0.102	0.207	-1	0.6264	0.2139	0.1497	1.4	0.1622
		Tasa fotosintética	0.2213	0.5175	0.4	0.6719	0.7246	0.2834	2.6	0.0152*
		Eficiencia en el uso del agua	0.0148	0.2763	0.1	0.9576	0.0246	0.1493	0.2	0.8703
		Densidad promedio de Tricomas foliares	-0.011	0.0087	-1	0.2234	0.0082	0.0038	2.2	0.0371*
		Escopolamina	-0.025	0.0699	-0	0.7234	-0.059	0.0417	-1	0.163
Atropina		0.012	0.0586	0.2	0.8388	0.0036	0.0694	0.1	0.9587	
		$R^2 = 0.00, P = 0.8247, F=0.5034$				$R^2 = 0.25, P = 0.0155, F=2.9627$				
Valores genéticos	Control	Área foliar promedio	0.0433	0.0765	0.6	0.592	0.0382	0.0496	0.8	0.4596
		Tasa relativa de crecimiento	-0.653	0.6313	-1	0.3407	-0.516	0.3869	-1	0.2118
		Tasa fotosintética	-0.021	0.2645	-0	0.9398	0.334	0.2052	1.6	0.1346
		Eficiencia en el uso del agua	-0.212	0.4053	-1	0.6202	0.1965	0.117	1.7	0.1241
		Densidad promedio de Tricomas foliares	0.0342	0.0136	2.5	0.0457*	0.0017	0.0063	0.3	0.7921
		Escopolamina	-0.075	0.1114	-1	0.5273	-0.041	0.085	-1	0.6431
		Atropina	-0.105	0.1321	-1	0.4561	0.126	0.0861	1.5	0.174
			$R^2 = 0.23, P = 0.3009, F=1.5645$				$R^2 = 0.19, P = 0.2439, F=1.5902$			
	Daño	Área foliar promedio	-0.072	0.0504	-1	0.1786	-0.045	0.0639	-1	0.4959
		Tasa relativa de crecimiento	0.3838	0.5317	0.7	0.4832	0.3571	0.5351	0.7	0.5183
		Tasa fotosintética	-0.346	0.2855	-1	0.2471	-0.134	0.3332	-0	0.6959
		Eficiencia en el uso del agua	0.0527	0.1891	0.3	0.7851	0.0576	0.1234	0.5	0.6499
		Densidad promedio de Tricomas foliares	-0.016	0.0088	-2	0.0942	-0.007	0.0124	-1	0.5902
		Escopolamina	-0.115	0.0841	-1	0.1949	-0.095	0.0809	-1	0.2643
Atropina		0.0882	0.0862	1	0.3246	-0.004	0.1131	0	0.9728	
		$R^2 = 0.11, P = 0.3003, F=1.3585$				$R^2 = 0.00, P = 0.7053, F=0.6547$				

Tabla 7. Análisis de regresión cuadrática múltiple de los gradientes de selección natural no lineal (γ) sobre los valores genéticos y fenotípicos de los caracteres vegetativos y de resistencia en *D. stramonium* en progenies generadas por diferentes sistemas de apareamiento y con diferente tratamiento. En negrita se resaltan los valores significativos ($P < 0.05$). La R^2 corresponde a la varianza explicada ajustada del modelo de regresión. junto a ella se muestran los valores de P y F del modelo de ANOVA de la regresión múltiple lineal. En el caso de los valores genéticos no fue posible incluir en el modelo los factores cuadráticos de los alcaloides debido a sesgos estadísticos

	Carácter	AUTOFECUNDACIÓN				ENTRECRUZAMIENTO			
		γ	Error estándar	t	P	γ	Error estándar	t	P
		Valores fenotípicos							
Control	(Área foliar promedio) ²	0.0108	0.0128	0.85	0.408	-0.008	0.0075	-1.1	0.3
	(Tasa relativa de crecimiento) ²	-0.0413	0.1844	-0.2	0.825	0.0082	0.1676	0.05	1
	(Tasa fotosintética) ²	-4.7149	3.9764	-1.2	0.25	0.4153	2.3682	0.18	0.9
	(Eficiencia en el uso del agua) ²	-0.2594	2.2847	-0.1	0.911	0.0274	0.5802	0.05	1
	(Densidad promedio de Tricomas foliares) ²	-0.0007	0.0003	-2.2	0.037	0.0007	0.0004	1.56	0.1
	(Escopolamina) ²	0.0247	0.0259	0.95	0.352	0.0087	0.0304	0.28	0.8
	(Atropina) ²	0.0031	0.0413	0.07	0.941	-0.062	0.0444	-1.4	0.2
		$R^2= 0.26, P= 0.0981, F=1.8691$				$R^2= 0.50, P= 0.0044, F=3.5556$			
Daño	(Área foliar promedio) ²	-0.0324	0.0163	-2	0.059	0.0125	0.0167	0.75	0.5
	(Tasa relativa de crecimiento) ²	-0.4094	0.5904	-0.7	0.495	-0.074	0.3695	-0.2	0.8
	(Tasa fotosintética) ²	-3.9623	3.5129	-1.1	0.271	1.3442	2.1891	0.61	0.5
	(Eficiencia en el uso del agua) ²	0.9395	1.0386	0.9	0.375	-0.632	0.5143	-1.2	0.2
	(Densidad promedio de Tricomas foliares) ²	0.0005	0.0009	0.56	0.582	-3E-04	0.0003	-1.1	0.3
	(Escopolamina) ²	0.0115	0.0557	0.21	0.838	-0.007	0.0324	-0.2	0.8
	(Atropina) ²	0.0245	0.0502	0.49	0.63	-0.027	0.0867	-0.3	0.8
		$R^2= 0.0, P= 0.7188, F=0.7378$				$R^2= 0.19, P= 0.1124, F=1.73103$			
Valores genéticos									
	Carácter	AUTOFECUNDACIÓN				ENTRECRUZAMIENTO			
		γ	Error estándar	t	P	γ	Error estándar	t	P
Control	(Área foliar promedio) ²	0.1534	0.0655	2.34	0.257	-0.016	0.0313	-0.5	0.6
	(Tasa relativa de crecimiento) ²	15.021	8.7491	1.72	0.336	2.2109	3.1017	0.71	0.5
	(Tasa fotosintética) ²	2.975	1.1544	2.58	0.236	-1.469	0.7467	-2	0.1
	(Eficiencia en el uso del agua) ²	5.9704	0.8417	7.09	0.089	0.4537	0.1623	2.8	0.0382
	(Densidad promedio de Tricomas foliares) ²	0.007	0.0011	6.1	0.104	0.0018	0.0014	1.23	0.3
		$R^2= 0.97, P= 0.1268, F=37.5920$				$R^2= 0.45, P= 0.2030, F=2.1629$			
Daño	(Área foliar promedio) ²	0.0118	0.0217	0.54	0.601	0.0221	0.0454	0.49	0.6
	(Tasa relativa de crecimiento) ²	-0.1164	3.8873	0	0.977	-4.006	4.6179	-0.9	0.4
	(Tasa fotosintética) ²	-1.0913	1.4063	-0.8	0.46	1.0043	1.0818	0.93	0.4
	(Eficiencia en el uso del agua) ²	0.1675	0.8175	0.2	0.843	-0.263	0.24	-1.1	0.3
(Densidad promedio de Tricomas foliares) ²	-0.0011	0.002	-0.5	0.609	-0.002	0.0016	-1.4	0.2	
		$R^2= 0.0, P= 0.7015, F=0.7273$				$R^2= 0.08, P= 0.4629, F=1.1351$			

DISCUSIÓN

El sistema de apareamiento de las plantas afecta parámetros poblacionales como la diversidad y estructura genética (Hamrick & Godt, 1996). La endogamia local afecta componentes de la adecuación (Charlesworth & Willis, 2009) así como la interacción con enemigos naturales como herbívoros, patógenos y virus. La evidencia indica que las progenies derivadas de endogamia, en contraste con las derivadas de entrecruzamiento, sufren reducciones en resistencia a sus enemigos naturales (ver revisión en Núñez-Farfán et al. 2007; Campbell, 2015). No obstante, con pocas excepciones, se desconocen los caracteres defensivos que son afectados por la endogamia (Campbell et al., 2014). Con base en evidencia derivada de estudios agronómicos, Núñez-Farfán et al. (1996) hipotetizaron que la endogamia reduce la defensa contra herbívoros, exacerbando la depresión endogámica sobre la defensa a través de reducir la heterocigosis individual. Por tanto, es relevante el estudio de los caracteres defensivos que la endogamia podría afectar.

Los resultados del presente estudio sugieren un escenario complejo. En primera instancia, los sistemas de apareamiento tuvieron efectos diferenciales, tanto sobre los caracteres relacionados con el crecimiento, como con la adecuación relativa y la correlación entre las diferentes estrategias de defensa. Las progenies exógamas presentaron una alta tasa de crecimiento, y las que no fueron dañadas presentaron además mayor área foliar y adecuación relativa con respecto a las progenies autógamas. A pesar de tales diferencias en varios caracteres, la tasa fotosintética no difirió significativamente entre plantas de ambos sistemas de apareamiento y tratamiento. Adicionalmente, para plantas de ambos sistemas de apareamiento hubo una correlación negativa entre la tolerancia y caracteres específicos de la resistencia.

Encontramos depresión endogámica para la densidad de tricomas foliares, la adecuación relativa y el área foliar en plantas sin daño. Asimismo, aunque no fue significativamente distinta de cero, la depresión endogámica promedio fue positiva para la tasa relativa de crecimiento y los tropano alcaloides. Dada la limitada cantidad de muestra disponible para la extracción y cuantificación de alcaloides, no nos fue posible realizar replicas a nivel individual para la concentración de atropina y escopolamina, lo que probablemente limitó nuestro poder estadístico. Por lo anterior, y a pesar de que los análisis de varianza no mostraron diferencias significativas en la variación de los caracteres de resistencia debidas al sistema de apareamiento, no descartamos que las plantas exogamas puedan presentar una mayor expresión de tropano alcaloides que las autogamas. Si esto ocurriera, explicaría parcialmente las observaciones de Bello-Bedoy y Núñez-Farfán (2010) quienes encontraron que, en condiciones naturales, progenies endogámicas de *D. stramonium* fueron más consumidas por herbívoros que las exogámicas, pues varios estudios sobre esta especie sugieren que los alcaloides son caracteres adaptativos que disminuyen el daño por herbívoros y que estos últimos imponen una presión selectiva sobre los caracteres de resistencia (Castillo et al., 2013; Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015; Shonle & Bergelson, 2000; Valverde et al., 2001).

La depresión endogámica en componentes de adecuación podría limitar la evolución hacia la autofecundación como única estrategia reproductiva (Núñez-Farfán et al., 1996; Núñez-Farfán & Dirzo, 1994), en conjunto con otros factores muy complejos como la interacción con diferentes tipos de herbívoros y la intensidad del ataque de los mismos (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011).

Sosenski-Correa (2004) encontró depresión endogámica tanto para la masa de las semillas como para el número de semillas en plantas provenientes de la misma población que las nuestras (Teotihuacán). Los valores de depresión endogámica en ese estudio fueron menores a 0.5, lo que, en conjunto con los valores reportados anteriormente por Núñez-Farfán (1991) y Bello-Bedoy & Núñez-Farfán (2010) para el número de semillas, sugiere que la población podría estar evolucionando hacia la autofecundación (Schemske & Lande, 1985).

Debe tenerse en cuenta que, dado que nuestras plantas crecieron en condiciones de invernadero, la depresión endogámica que encontramos en nuestro estudio puede ser más baja para los caracteres de resistencia que la que podría esperarse en plantas en condiciones naturales (Kariyat et al., 2011). Además, también debe tenerse en cuenta la historia poblacional, pues esta puede repercutir en la magnitud de la depresión endogámica. Las progenies que usamos en este experimento son producto de una generación de cruas controladas, por lo que se esperaría que la endogamia fuera de aproximadamente 0.5. Sin embargo es muy probable que, siendo *D. stramonium* una especie con autofecundación frecuente, el nivel de endogamia sea más alto, incluso para plantas con entrecruzamiento, debido a endogamia en generaciones anteriores. Por lo tanto sugerimos que, para la realización de nuevos experimentos que aborden los sistemas de apareamiento y los posibles efectos de la depresión endogámica, se repliquen los tratamientos en condiciones naturales y de invernadero, y se incluyan plantas con un mayor coeficiente de endogamia.

Otro factor importante a considerar es que todas las semillas de nuestras progenies de diferente sistema de apareamiento fueron producidas por autofecundación. De esta manera aseguramos una comparación sencilla entre todos los individuos, pero hacemos que toda la generación F2 tanto de plantas autogamas como de exogamas, tenga endogamia. Muy probablemente, de haber realizado cruas controladas en nuestras flores, hubiéramos obtenido un mayor número de semillas mediante el entrecruzamiento. Sin embargo, algunas limitaciones experimentales como el número de flores nos hubieran impedido hacer tal tipo de diseño, pues las plantas en condiciones de invernadero no son tan vigorosas ni tienen tantas flores como las plantas en condiciones naturales (observación personal). Para estudios futuros, recomendamos hacer varias generaciones de cruas controladas, ya que esto permitiría tener varios niveles de endogamia dentro de un experimento.

Nuestros hallazgos son contrarios a los de otros estudios realizados en plantas de la misma población (Teotihuacán) que afirman que el daño exacerba los efectos de la depresión endogámica (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010, 2011), pues solo detectamos depresión endogámica en plantas no dañadas. Puede que esto ocurra porque, en ausencia de daño, las plantas de entrecruzamiento tuvieron altos valores promedio para casi todos los caracteres medidos, sin embargo el daño hizo que sus valores "cayeran al mismo nivel" que las plantas con autofecundación. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que nuestro experimento sólo exploró la defoliación por daño artificial en condiciones de invernadero, mientras que, en los estudios referidos, el daño fue causado por herbívoros en condiciones naturales. Probablemente los efectos del daño sobre la depresión endogámica no sólo estén dados por el daño mismo, sino por interacciones complejas inherentes al consumo de tejido por herbívoros (i.e. elicitors), por lo tanto el herbivorismo puede ser mucho más

estresante que el daño abiótico. La depresión endogámica puede depender entonces de la cantidad de daño recibido, así como del tipo de daño (Leimu et al., 2008).

Dado que las defensas repercuten directamente sobre la adecuación y sobre la interacción planta-herbívoro, la depresión endogámica sobre las defensas puede ser también determinante en la evolución del sistema de apareamiento. De acuerdo con Campbell et al. (2013), tanto la expresión del sistema de apareamiento, como de rasgos reproductivos y la magnitud de la depresión endogámica pueden estar determinadas por la interacción planta-herbívoro, por lo que, la selección sobre la estrategia de apareamiento afectará la selección sobre las defensas. La evolución de la depresión endogámica dependerá entonces tanto de la evolución del sistema de apareamiento (Núñez-Farfán et al., 1996) como de la correlación entre caracteres afectados por la depresión endogámica (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011; Leimu et al., 2008).

En nuestro estudio, demostramos que existe variación en la respuesta de las plantas a la defoliación entre sistemas de apareamiento. Los caracteres de resistencia muestran depresión endogámica, mientras que lo contrario ocurre para la tolerancia. Estos hallazgos indican que, aunque en las plantas de autofecundación tienen desventajas respecto a las de entrecruzamiento, también poseen una alta capacidad para tolerar, lo que podría limitar el mantenimiento del entrecruzamiento como único sistema de apareamiento. Si bien se cree que en *D. stramonium* ocurrió una transición del entrecruzamiento obligado a la autofecundación (Campbell & Kessler, 2013), los síndromes florales sugieren que esta transición no es completa y por ello se ha propuesto que para estas plantas un sistema de apareamiento mixto podría representar una estrategia evolutiva estable (Motten & Antonovics, 1992), lo que depende además de la presión selectiva que ejerce el herbivorismo sobre las estrategias reproductivas de las plantas.

Numerosos estudios reportan un mayor daño por herbívoros en progenies generadas por autofecundación respecto a las generadas por entrecruzamiento (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010, 2011; Du et al., 2008; Kariyat et al., 2011; Leimu et al., 2008; Muola et al., 2011), lo que sugiere que el herbivorismo es una presión selectiva que puede determinar el mantenimiento o no de un sistema de apareamiento mixto (Muola, et al. 2010; Núñez-Farfán et al., 2007). Varios estudios han planteado que la tolerancia puede ser una estrategia defensiva efectiva, particularmente en ambientes heterogéneos donde el ataque de herbívoros es impredecible y las respuestas compensatorias implican menos costos que una inversión constitutiva en resistencia (Campbell & Kessler, 2013; Kessler & Baldwin, 2002).

Sin embargo, la tolerancia también puede implicar costos por la capacidad de mantenimiento de la inducibilidad de la respuesta, por la reasignación de recursos que dejan de invertirse en procesos como la supervivencia, y la reproducción (Fornoni et al., 2003). Se ha planteado que la tolerancia puede ser también perjudicial, ya que si las plantas que compensan son más atractivas para los herbívoros, tendrán a su disposición más tejido vegetal para consumir que en plantas poco tolerantes. Esto supondría que la tolerancia podría imponer selección sobre los herbívoros al afectar sus preferencias alimenticias (Fornoni, 2010). Sin embargo, esta suposición ha sido cuestionada porque, a diferencia de los caracteres de resistencia, la tolerancia no afecta directamente a los herbívoros ni su desempeño, además no necesariamente está directamente relacionada con la calidad nutricional de la planta (Garrido-Espinosa & Fornoni, 2006). Entonces,

probablemente las preferencias de consumo por parte de los herbívoros están más determinadas por los niveles de resistencia de las plantas que por sus niveles de tolerancia.

En un estudio macroevolutivo realizado con varias especies de la familia Solanaceae, Campbell y Kessler (2013) afirman que las plantas como *D. stramonium*, que crecen en ambientes cambiantes en donde la probabilidad de ataque es impredecible, tendrán una respuesta plástica al herbivorismo. En contraste, las respuestas constitutivas, al expresarse en todo momento, sólo serían ventajosas en ambientes con muchos herbívoros, sin embargo serían muy costosas en ausencia de ellos. Estos autores aseguran que la endogamia favorece la expresión de defensas plásticas, ya que la pérdida de la auto-incompatibilidad genética permitió a las plantas colonizar muchos ambientes en que la probabilidad e intensidad de la herbivoría fueron bajas, y esto vino acompañado de un aumento en la endogamia. Por lo anterior, Campbell y Kessler (2013) afirman que tanto los sistemas de apareamiento, como las interacciones con herbívoros tienen un papel importante en la evolución de la plasticidad. Nuestros resultado apoyan parcialmente estas hipótesis, ya que detectamos que la tolerancia, que es una respuesta plástica, fue mayor en progenies de plantas autógamas que en progenies exógamas. Estas últimas presentaron valores bajos de tolerancia además de un *trade-off* entre la tolerancia y los caracteres constitutivos de resistencia.

Un punto interesante para abordar en estudios futuros es la relación de la depresión endogámica y la expresión de la tolerancia y la resistencia con la denso-dependencia. Probablemente los efectos de la depresión endogámica no serán los mismos en poblaciones con pocas plantas que en poblaciones con muchos individuos, ya que la resistencia y/o tolerancia de los vecinos, así como su cercanía podría determinar la probabilidad de ataque a cada individuo. En otras palabras, la depresión endogámica podría exacerbarse por efectos de denso-dependencia, y no únicamente por factores externos a la población (Ver el trabajo de Yun & Agrawal, 2014). Por otra parte, es también importante la densidad poblacional de los herbívoros y la intensidad y severidad con la que ataquen, ya que de esto pueden depender los costos asociados a la expresión de caracteres de defensa.

En nuestra población experimental no detectamos que la endogamia redujera la expresión de la tolerancia; por el contrario, demostramos que la endogamia incrementó la tolerancia, lo que se hizo evidente en la depresión por exogamia para ese carácter. Algunas hipótesis sobre la defensa en las plantas, como el balance entre nutrientes y carbono (Bryant et al., 1983), y la disponibilidad de recursos (o la tasa crecimiento, de Coley et al., 1985) predicen que, cuando los niveles de recursos son bajos, habrá una baja tasa de crecimiento y se favorecerá una alta producción de defensas constitutivas en lugar de la expresión de respuestas compensatorias plásticas (Stamp, 2003); sin embargo, nuestros resultados son contrastantes con estas predicciones. En primer lugar, aunque crecieron en un medio "igualmente pobre en recursos", nuestras plantas presentaron diferentes tasas de crecimiento, según el sistema de apareamiento, a pesar de que sus tasas fotosintéticas no fueron significativamente distintas. Las plantas de autofecundación presentaron bajas tasas de crecimiento respecto a las de entrecruzamiento, sin embargo presentaron más tolerancia, tal como predice el modelo de Hilbert et al, 1981. Además, hubo depresión endogámica para los caracteres de resistencia, y estos solo se expresaron de forma constitutiva. Debido a que la tasa fotosintética y la disponibilidad de nutrientes no difirieron entre plantas de ambos sistemas de apareamiento y tratamientos, las diferencias en crecimiento y plasticidad entre plantas de diferente sistema de

apareamiento debieron estar determinadas por factores intrínsecos en el balance interno de recursos y el metabolismo.

La tasa de crecimiento tuvo una relación positiva con el área foliar, y fue mayor en las plantas de entrecruzamiento, por esa razón, cuando no recibieron daño, tuvieron valores más altos para los caracteres vegetativos y reproductivos. La remoción de tejido foliar limitó la disponibilidad de recursos para compensar, redujo la tasa de crecimiento y eliminó las diferencias en producción de semillas y área foliar entre plantas de diferente sistema de apareamiento. Las bajas tasas de crecimiento en las plantas de autofecundación que no fueron dañadas indican que su potencial de crecimiento en comparación con las de entrecruzamiento era muy bajo. Esto probablemente pueda atribuirse a que de por sí se encontraban por debajo de un umbral de crecimiento que difícilmente podrían haber superado en peores condiciones, y que podría depender de efectos deletéreos de la endogamia sobre la regulación de procesos relacionados con la absorción de nutrientes. Probablemente la cantidad de daño recibido fue tal, que llevó bajo ese mismo umbral de crecimiento a las plantas de entrecruzamiento, por lo que difícilmente habrían podido llegar a equiparar a las plantas que no fueron dañadas.

Aunque las plantas de autofecundación presentaron menor tasa de crecimiento, al parecer fueron más plásticas que las de entrecruzamiento en cuanto a la reasignación los recursos existentes a las hojas y semillas. Tales diferencias en plasticidad probablemente estén determinadas por el rompimiento de complejos de genes coadaptados que sólo sean mantenidos bajo endogamia. También es posible que las diferencias en tolerancia se deban a procesos previos de purga de alelos deletéreos recesivos en las plantas endogámicas que se han mantenido en la población por el entrecruzamiento (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010), pues, como mencionamos anteriormente, hay evidencia de que la endogamia es frecuente en *D. stramonium*. Debe tenerse en cuenta que nuestra medida del crecimiento se basó en la longitud del tallo y no en el incremento de biomasa, tampoco hicimos un análisis de nutrientes, por lo que sugerimos que estudios posteriores incorporen dichas variables.

Otra explicación posible para las diferencias entre sistemas de apareamiento es que la forma de la función de producción de área foliar y semillas respecto a la cantidad de daño tenga una forma distinta para las plantas exogamas y autogamas. Según varios estudios (Avila-Sakar & Laarakker, 2011; del-Val & Crawley, 2004; Núñez-Farfán et al., 2007; Tiffin & Rausher, 1999) las curvas de producción de biomasa y de tolerancia respecto al daño podrían tener una forma convexa en vez de lineal, por lo que, después de cierto valor umbral de daño, ya no habrían consecuencias drásticas en la adecuación en caso de que las tasas de crecimiento cambien de manera proporcional al nivel de daño. Este podría ser el caso de las plantas de autofecundación, mientras que en las plantas de entrecruzamiento la relación daño-compensación puede ser más lineal o presentar un valor de daño "umbral" más pequeño que el de las plantas de autofecundación, por encima del cual no habrá compensación. Entonces, probablemente en este estudio el nivel de daño determinó las respuestas de las plantas de ambos sistemas de apareamiento, que podrían además tener diferentes umbrales de cantidad de daño para la expresión de respuestas plásticas, por lo que recomendamos que estudios posteriores evalúen diferentes niveles de daño.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que los caracteres de resistencia de *D. stramonium* son constitutivos ya que no presentaron inducción por daño foliar, lo que apoya los

resultados de otros trabajos previos (Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015; Shonle & Bergelson, 2000). Al igual que Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán (2015), sólo encontramos selección direccional positiva sobre los tricomas foliares en plantas que no sufrieron daño, y en plantas de entrecruzamiento con daño, esto evidencia que no se presentaron costos por la producción de tricomas (Simms & Rausher, 1987). El único grupo que no presentó una correlación positiva entre la adecuación y los tricomas fue el de las progenies autógamas con daño, esto supondría una desventaja, si los tricomas son importantes para otras funciones diferentes de la defensa que esten relacionadas con el mantenimiento de la adecuación (Stowe, 2013), como la regulación térmica o hídrica (Kariñho-Betancourt et al., 2015). Por lo tanto, es importante recalcar que las diferencias de consumo por parte de herbívoros en progenies de plantas provenientes de diferentes sistemas de apareamiento pueden estar determinadas por otros caracteres que influyen, por ejemplo, en el crecimiento, o en la calidad nutricional.

En nuestro estudio evaluamos la expresión fenotípica de caracteres de defensa quitando por completo las ventajas de la resistencia al imponer la pérdida de la mitad del área foliar de la planta por daño mecánico, justo antes de iniciarse la etapa reproductiva. El daño artificial impuesto supondría un doble costo para las plantas con altos niveles de resistencia, ya que generaron o mantuvieron defensas (i.e. alcaloides o tricomas) que no evitaron el daño mecánico. La producción de dichas defensas implicó una alta inversión energética que además no estuvo determinada por la presencia ni la cantidad de daño. El daño en sí mismo representó entonces otro costo dado por la pérdida de área foliar, de biomasa y de recursos para la reproducción. Probablemente esto ocurrió en las plantas de entrecruzamiento, pues tendieron a ser más resistentes que tolerantes, y explicaría además la reducción abrupta en los caracteres vegetativos y reproductivos cuando son dañadas.

Cuando los tricomas foliares no son una defensa efectiva contra el daño, los recursos de la planta deben invertirse, no sólo en el mantenimiento de las funciones metabólicas y en la reproducción, sino también en la cicatrización, reposición y/o reparación de estructuras dañadas. Lo anterior podría explicar la correlación negativa entre la tolerancia y los caracteres de resistencia, pues, en la medida en que se evite el daño, menos será necesario compensar (Fineblum & Rausher, 1995). La presencia de una correlación negativa entre tolerancia y resistencia depende de los costos asociados a cada estrategia (Fornoni et al., 2004) y puede involucrar cambios en las presiones selectivas sobre los herbívoros, ya que podría determinar cambios en la cantidad y calidad de tejido disponible para consumir, y esto a su vez influiría en el desempeño de los herbívoros (Fornoni, 2010). Dado que la resistencia y la tolerancia se han considerado funcionalmente redundantes, la correlación negativa entre ellas podría causar que la evolución por selección lleve al establecimiento de una u otra estrategia de defensa dependiendo de los factores que afecten los patrones de variación de ambas (i.e. disponibilidad de recursos, crecimiento, tipo e intensidad de herbivorismo), en lugar de que se favorezcan altos niveles de ambas (Leimu & Koricheva, 2006; Mauricio et al., 1997).

En el presente trabajo demostramos que el sistema de apareamiento por el cual se generan las plantas puede determinar la variación de las defensas y por lo tanto su evolución. Dañamos un 50% del área foliar y encontramos una correlación negativa entre la resistencia y la tolerancia, sin embargo no detectamos varianza genética para este último rasgo. Nuestras observaciones apoyan parcialmente las observaciones de Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán (2015), quienes realizaron

un experimento de campo con *D. stramonium* en el que las plantas sufrieron alrededor de un 10% de daño de área foliar. Estos autores tampoco encontraron varianza genética en la tolerancia ni una correlación entre este rasgo y la resistencia, lo que atribuyeron a la baja cantidad de daño que las hojas reciben.

Según Fornoni y colaboradores (2003) y Valverde y colaboradores (2003) la magnitud del daño foliar puede restringir la detección de varianza genética de la tolerancia, así como de una correlación significativa entre la tolerancia y la resistencia. Encontramos correlaciones negativas entre caracteres de resistencia y tolerancia a pesar de que no detectamos varianza genética para este carácter. Creemos que hay un sesgo debido al poder estadístico inherente a la forma en que calculamos la tolerancia a partir de promedios familiares; esto dificulta la detección de varianza genética para este carácter, por lo que no descartamos que ésta exista.

En nuestro experimento, tal como se ha sugerido en algunos estudios (Leimu & Koricheva, 2006; Stowe, 1998), la tolerancia puede correlacionarse con caracteres específicos de resistencia. En este sentido, nosotros encontramos que además dichas correlaciones son diferentes para las progenies de cada sistema de apareamiento. En las plantas de entrecruzamiento, la tolerancia tuvo una correlación negativa con los tropano alcaloides, mientras que en las plantas de autofecundación, dicha correlación se dio con los tricomas foliares. Lo anterior concuerda con la depresión endogámica que encontramos para los tricomas y los alcaloides, y con los bajos niveles de tolerancia en las plantas de entrecruzamiento; esto podría además explicarse por la adopción de estrategias alternativas de defensa de acuerdo al sistema de apareamiento en esta población.

En las plantas de entrecruzamiento que no sufrieron daño, la adecuación se correlacionó positivamente con el área foliar, pero negativamente con la eficiencia en el uso del agua y con la tasa de crecimiento. Esto puede explicarse por la elevada tasa de crecimiento de las plantas exógamas respecto a las autógamas. Si bien estas plantas fueron eficientes para generar área foliar en ausencia de daño, probablemente su elevada tasa de crecimiento implicó un costo entre crear más hojas y asignar recursos al resto de la planta (i.e. tallos) cuando fueron dañadas.

Nuestro trabajo intentó dar luz sobre la expresión diferencial de las defensas anti-herbívoros en relación al sistema de apareamiento, sin embargo debe considerarse que la endogamia no sólo repercute en la expresión de defensas, sino también en otros caracteres de la planta que pueden estar correlacionados como el crecimiento. Por lo tanto, la depresión endogámica puede afectar de forma similar a caracteres que estén correlacionados, aún cuando el efecto se exprese en diferentes etapas ontogenéticas (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011). Varios estudios sugieren que las correlaciones entre tolerancia y resistencia a herbívoros pueden variar durante la ontogenia, pues las presiones ambientales y las interacciones entre plantas y herbívoros cambian para los individuos durante el desarrollo, y por lo tanto se espera que eso mismo ocurra con las defensas. Boege et al., (2007) encontraron que los niveles de resistencia de *Brassica rapa* en estados juveniles pueden determinar los niveles de tolerancia en la etapa adulta, y sugieren que tales cambios en la correlación entre defensas puede deberse a la variación de sus costos a lo largo del desarrollo. Hoque y Avila-Sakar (2015) encontraron que la correlación negativa entre tolerancia y resistencia fue particularmente fuerte en la etapa pre-reproductiva de *Arabidopsis thaliana* y que se debilitó a medida que las plantas entraban en la etapa reproductiva. Por otra parte, Kariñho-Betancourt y colaboradores (2015) afirman que las correlaciones entre caracteres físicos y químicos de resistencia cambian

cuando las plantas alcanzan su madurez; y además varían de acuerdo al tipo de daño recibido por la planta. Dada la gran complejidad de las interacciones entre defensas que evidencian estas investigaciones, proponemos que en estudios futuros se evalúe si las diferencias en las correlaciones entre caracteres específicos de resistencia y tolerancia varían de forma distinta durante la ontogenia en progenies de diferentes sistemas de apareamiento. Otra alternativa interesante para próximos estudios es evaluar en condiciones naturales si la cantidad de daño por parte de herbívoros especialistas difiere de la cantidad de daño por parte de generalistas en plantas de diferente sistema de apareamiento, lo que podría esperarse teniendo en cuenta las diferencias en la expresión de defensas y la variación en sus correlaciones entre estrategias reproductivas.

CONCLUSIONES

La evolución entre el sistema de apareamiento puede determinar la evolución de las estrategias de defensa en las plantas; así mismo, los herbívoros podrían ejercer una presión selectiva para el mantenimiento de un sistema de apareamiento u otro, ya que la respuesta al daño foliar entre progenies de plantas autogamas y exogamas es diferencial. Encontramos que las plantas endogámicas presentan menor tasa de crecimiento, área foliar y adecuación que las exogámicas; además, detectamos depresión endogámica para los tricomas foliares y una tendencia a la depresión endogámica para los tropano alcaloides. La autofecundación, a diferencia del entrecruzamiento, no reduce necesariamente la expresión de todas las defensas, sino que puede incluso aumentarlas como ocurrió con la tolerancia. Las diferencias en la expresión fenotípica de defensas entre los sistemas de apareamiento no sólo están determinadas por el grado de expresión de los rasgos, sino también por correlaciones entre rasgos específicos, pues, como vimos, la tolerancia puede correlacionarse con diferentes caracteres de resistencia. Además, los efectos del sistema de apareamiento sobre la respuesta de las plantas al daño están determinados tanto por la expresión diferencial de defensas, como de caracteres intrínsecos de las plantas como la tasa de crecimiento que pueden variar por factores externos como la cantidad de daño.

Creemos que en el futuro deben abordarse los efectos del sistema de apareamiento tanto en condiciones naturales como de invernadero y deben evaluarse de forma más detallada factores como la tasa de crecimiento, y el contenido de nutrientes de la planta en diferentes niveles de daño y/o etapas ontogenéticas para detectar posibles diferencias entre estrategias reproductivas dadas por estas variables. También recomendamos evaluar el impacto de la densidad de plantas y herbívoros sobre la depresión endogámica, y el efecto que tienen diferentes tipos de herbívoro sobre progenies derivadas de diferentes sistemas de apareamiento, para entender mejor la variación que ocurre en poblaciones naturales y la forma en que las comunidades de herbívoros pueden modificar las dinámicas reproductivas.

LITERATURA CITADA

- Agrawal, A. A. (2011). Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology*, 25(2), 420–432. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x>
- Agrawal, A. A., & Karban, R. (1999). Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants, p. In *The ecology and evolution of inducible defenses*. R. Tollrian and C. D. Harvell (eds.). Princeton University Press, Princeton. (pp. 45–61).
- Avila-sakar, G., & Laarakker, A. S. (2011). The Shape of the Curve of Tolerance to Herbivory. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5(2).
- Barrett, S. C. H. (2003). Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1434), 991–1004. <http://doi.org/10.1098/rstb.2003.1301>
- Bello-Bedoy, R., Cruz, L. L., & Núñez-Farfán, J. (2010). Inbreeding alters a plant-predispersal seed predator interaction. *Evolutionary Ecology*, 25(4), 815–829. <http://doi.org/10.1007/s10682-010-9448-4>
- Bello-Bedoy, R., & Núñez-Farfán, J. (2010). Cost of inbreeding in resistance to herbivores in datura stramonium. *Annals of Botany*, 105(5), 747–753. <http://doi.org/10.1093/aob/mcq038>
- Bello-Bedoy, R., & Núñez-Farfán, J. (2011). The effect of inbreeding on defence against multiple enemies in Datura stramonium. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(3), 518–530. <http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02185.x>
- Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617–633. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Boege, K., Dirzo, R., Siemens, D., & Brown, P. (2007). Ontogenetic switches from plant resistance to tolerance: Minimizing costs with age? *Ecology Letters*, 10(3), 177–187. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.01012.x>
- Bryant, J. P., Chapin, F. S., & Klein, D. R. (1983). Carbon / Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos*, 40(3), 357–368.
- Campbell, S. A. (2015). Ecological mechanisms for the coevolution of mating systems and defence. *New Phytologist*, 205, 1047–1053.
- Campbell, S. A., Halitschke, R., Thaler, J. S., & Kessler, A. (2014). Plant mating systems affect adaptive plasticity in response to herbivory. *Plant Journal*, 78(3), 481–490. <http://doi.org/10.1111/tbj.12492>
- Campbell, S. A., & Kessler, A. (2013). Plant mating system transitions drive the macroevolution of defense strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(10), 3973–3978. <http://doi.org/10.1073/pnas.1213867110>

- Campbell, S. A., Thaler, J. S., & Kessler, A. (2013). Plant chemistry underlies herbivore-mediated inbreeding depression in nature. *Ecology Letters*, *16*(2), 252–260. <http://doi.org/10.1111/ele.12036>
- Carr, D. E., & Eubanks, M. D. (2014). Interactions between insect herbivores and plant mating systems. *Annual Review of Entomology*, *59*, 185–203. <http://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162049>
- Castillo, G., Cruz, L. L., Hernández-Cumplido, J., Oyama, K., Flores-Ortiz, C. M., Fornoni, J., Núñez-Farfán, J. (2013). Geographic association and temporal variation of chemical and physical defense and leaf damage in *Datura stramonium*. *Ecological Research*, *28*(4), 663–672. <http://doi.org/10.1007/s11284-013-1059-4>
- Castillo, G., Cruz, L. L., Tapia-López, R., Olmedo-Vicente, E., Carmona, D., Anaya-Lang, A. L., Núñez-Farfán, J. (2014). Selection mosaic exerted by specialist and generalist herbivores on chemical and physical defense of *Datura stramonium*. *PLoS ONE*, *9*(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102478>
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*(1), 237–268. <http://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001321>
- Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, *10*(11), 783–96. <http://doi.org/10.1038/nrg2664>
- Coley, P. D., Bryant, J. P., & Chapin, F. S. (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense.
- Cueva-García, E. 1996. Tasa de entrecruzamiento, vecindario genético y tamaño efectivo de la población en *Datura stramonium* L. (Solanaceae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. D.F.
- del Val(2012). Herbivoría. pp43-47. En: Del Val E, Boege K (coords.). 2012. Ecología y evolución de las interacciones bióticas. Ediciones Científicas Universitarias. Fondo de Cultura Económica. México
- del-Val, E., & Crawley, M. J. (2004). Interspecific competition and tolerance to defoliation in four grassland species. *Canadian Journal of Botany*, *82*(7), 871–877. <http://doi.org/10.1139/b04-066>
- Delphia, C. M. (2009). Inbreeding in horsenettle influences herbivore. *Ecological Entomology*, *34*, 513–519.
- Du, D., Winsor, J. a., Smith, M., DeNicco, A., & Stephenson, A. G. (2008). Resistance and tolerance to herbivory changes with inbreeding and ontogeny in a wild gourd (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, *95*(1), 84–92. <http://doi.org/10.3732/ajb.95.1.84>
- Falconer, D. S. & MacKay, T. F. C. 1995. Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman, London.

- Fineblum, W. L., & Rausher, M. D. (1995). Tradeoff between resistance and tolerance to herbivore damage in a morning glory. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/377517a0>
- Fornoni, J. (2010). Ecological and evolutionary implications of plant tolerance to herbivory. *Functional Ecology*, *25*(2), 399–407. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01805.x>
- 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. <http://doi.org/10.1080/08948550390234703>
- Fornoni, J., Núñez-Farfán, J., Valverde, P. L., & Rausher, M. D. (2004). Evolution of mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *58*(8), 1685–1695. <http://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00454.x>
- Fornoni, J., Valverde, P. L., & Núñez-Farfán, J. (2003). Quantitative genetics of plant tolerance and resistance against natural enemies of two natural populations of *Datura stramonium*. *Evolutionary Ecology Research*, *5*(7), 1049–1065.
- Garrido-Espinosa, E., & Fornoni, J. (2006). Host tolerance does not impose selection on natural enemies. *New Phytologist*, *170*(3), 609–614. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01681.x>
- Hamrick, J. L., & Godt, M. J. W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *351*, 1291–1298.
- Hilbert, D. W., Swift, D. M., Detling, J. K., & Dyer, M. I. (1981). Relative growth rates and the grazing optimization hypothesis. *Oecologia*, *51*, 14–18. <http://doi.org/10.1007/BF00344645>
- Hoque, S., & Avila-Sakar, G. (2015). Trade-Offs and Ontogenetic Changes in Resistance and Tolerance to Insect Herbivory in Arabidopsis. *International Journal of Plant Sciences*, *176*(2), 76–82. <http://doi.org/10.1086/679478>
- Hull-sanders, A. H. M., & Eubanks, M. D. (2008). Plant Defense Theory Provides Insight into Interactions Involving Inbred Plants and Insect Herbivores Published by : Ecological Society of America, *86*(4), 897–904.
- Kariñho-Betancourt, E., Agrawal, A. A., Halitschke, R., & Núñez-Farfán, J. (2015). Phylogenetic correlations among chemical and physical plant defenses change with ontogeny. *New Phytologist*. <http://doi.org/10.1111/nph.13300> Key
- Kariñho-Betancourt, E., & Núñez-Farfán, J. (2015). Evolution of resistance and tolerance to herbivores: testing the trade-off hypothesis. *PeerJ*, *3*, e789. <http://doi.org/10.7717/peerj.789>
- Kariyat, R. R., Scanlon, S. R., Mescher, M. C., de Moraes, C. M., & Stephenson, A. G. (2011). Inbreeding depression in *Solanum carolinense* (solanaceae) under field conditions and implications for mating system evolution. *PLoS ONE*, *6*(12), 20–24. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028459>

- Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 299–328. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135207>
- Lande, R., & Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37(6), 1210–1226. <http://doi.org/10.2307/2408842>
- Lande, R., & Schemske, D. W. . (1985). The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants . I. Genetic models. *Evolution*, 39(1), 41–52.
- Leimu, R., Kloss, L., & Fischer, M. (2008). Effects of experimental inbreeding on herbivore resistance and plant fitness: The role of history of inbreeding, herbivory and abiotic factors. *Ecology Letters*, 11(10), 1101–1110. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01222.x>
- Leimu, R., & Koricheva, J. (2006). A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to herbivores: Combining the evidence from ecological and agricultural studies. *Oikos*, 112(1), 1–9. <http://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2006.41023.x>
- Mauricio, R., Rausher, M. D., & Burdick, D. S. (1997). Variation in the Defense Strategies of Plants: Are Resistance and Tolerance Mutually Exclusive? *Ecology*, 78(5), 1301–1311. <http://doi.org/10.2307/2266125>
- McConnaughay, K. D. M., & Coleman, J. S. (1999). Biomass allocation in plants: Ontogeny or optimality? A test along three resource gradients. *Ecology*, 80(8), 2581–2593. [http://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[2581:BAIPOO\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[2581:BAIPOO]2.0.CO;2)
- Moore, B. D., Andrew, R. L., Carsten, K., & Foley, W. J. (2013). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 10, 1–18. <http://doi.org/10.1111/nph.12526>
- Motten, A. F., & Antonovics, J. (1992). Determinants of outcrossing rate in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany*. <http://doi.org/10.2307/2445154>
- Motten, A. F., & Stone, J. L. (2000). Heritability of Stigma Position and the Effect of Stigma-Anther Separation on Outcrossing in a Predominantly Self-Fertilizing Weed , *Datura stramonium* (Solanaceae) Author (s): Alexander F . Motten and Judy L . Stone Source : American Journal of Botany, 87(3), 339–347.
- Müller, C. (2006). Plant – Insect interactions on cuticular surfaces. In M. Riederer & C. Müller (Eds.), *Biology of the plant cuticle*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Muola, A., Mutikainen, P., Laukkanen, L., Lilley, M., & Leimu, R. (2010). Genetic variation in herbivore resistance and tolerance: The role of plant life-history stage and type of damage. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(10), 2185–2196. <http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02077.x>
- Muola, A., Mutikainen, P., Laukkanen, L., Lilley, M., & Leimu, R. (2011). The role of inbreeding and outbreeding in herbivore resistance and tolerance in *Vincetoxicum hirundinaria*. *Annals of Botany*, 108(3), 547–555. <http://doi.org/10.1093/aob/mcr174>

- Núñez-Farfán, J. & Dirzo R. 1991. Biología evolutiva de *Datura stramonium* L. en el centro de México: Selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruzamiento y variación genética intra e inter-poblacional. Tesis Doctoral. Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.
- Núñez-Farfán, J., Cabrales-Vargas, R. A., & Dirzo, R. (1996). Mating system consequences on resistance to herbivory and life history traits in *Datura stramonium*. *American Journal of Botany*, 83(8), 1041–1049. <http://doi.org/10.2307/2445993>
- Núñez-Farfán, J., & Dirzo, R. (1994). Evolutionary Ecology of *Datura stramonium* L. In Central Mexico : Natural Selection for Resistance to Herbivorous Insects. *Evolution*, 48(2), 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*, 38(1), 541–566. <http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095822>
- Rausher, M. D. (1992). the Measurement of Selection on Quantitative Covariances Between Traits of Fitness. *Evolution*. <http://doi.org/10.2307/2409632>
- Schemske, D. W., & Lande, R. (1985). The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants . II . Empirical Observations Author (s): Douglas W . Schemske and Russell Lande, 39(1), 41–52.
- Schlichting, C. D., & Levin, D. a. (1986). Effects of inbreeding on phenotypic plasticity in cultivated Phlox. *Theoretical and Applied Genetics*, 72(1), 114–119. <http://doi.org/10.1007/BF00261465>
- Shonle, I., & Bergelson, J. (2000). Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 54(3), 778–788.
- Simmonds, M. S. J. (2001). Importance of flavonoids in insect-plant interactions: Feeding and oviposition. *Phytochemistry*, 56(3), 245–252. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00453-2](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00453-2)
- Simmonds, M. S. J. (2003). Flavonoid-insect interactions: Recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, 64(1), 21–30. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00293-0](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00293-0)
- Simms, E. L., & Rausher, M. D. (1987). Costs and benefits of plant resistance of herbivory. *The American Naturalist*, 130(4), 570–581.
- Simms, E. L., & Triplett, J. (1994). Costs and benefits of plant responses to disease: Resistance and tolerance. *Evolution*, 48(6), 1973–1985. <http://doi.org/10.2307/2410521>
- Sosenski-Correa, P. (2004). Variación geográfica del sistema de apareamiento en *Datura stramonium*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Stamp, N. (2003). Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, 78(1), 23–55. <http://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>

- Steets, J. A., Hamrick, J. L., & Ashman, T.-L. (2006). Consequences of Vegetative Herbivory for Maintenance of Intermediate Outcrossing in an Annual Plant. *Ecology*, 87(11), 2717–2727.
- Steets, J. A., Wolf, D. E., Auld, J. R., & Ashman, T.-L. (2007). The role of natural enemies in the expression and evolution of mixed mating in hermaphroditic plants and animals. *Evolution*, 61(9), 2043–2055. <http://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00184.x>
- Stowe, K. A. (1998). Experimental Evolution of Resistance in *Brassica rapa*: Correlated Response of Tolerance in Lines Selected for Glucosinolate Content. *Evolution*, 52(3), 703–712. <http://doi.org/10.2307/2411265>
- Stowe, K. A. (2013). Defense and Tolerance: Is the Distinction between these Two Plant Strategies Useful? *International Journal of Modern Botany*, 3(2A), 1–4. <http://doi.org/10.5923/s.ijmb.201310.01>
- Stowe, K. A., Marquis, R. J., Hochwender, C. G., & Simms, E. L. (2000). The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage.
- Strauss, S. Y. (1997). Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. *Ecology*, 78(6), 1640–1645. [http://doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[1640:FCLHPA\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[1640:FCLHPA]2.0.CO;2)
- Strauss, S. Y., & Agrawal, A. A. (1999). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(5), 179–185. [http://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01576-6](http://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01576-6)
- Tiffin, P., & Rausher, M. (1999). Genetic Constraints and Selection Acting on Tolerance to Herbivory in the Common Morning Glory *Ipomoea purpurea*. *The American Naturalist*, 154(6), 700–716. <http://doi.org/10.1086/303271>
- Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591. <http://doi.org/10.1055/s-2005-873009>
- Valverde, P. L., Fornoni, J., & Núñez-Farfán, J. (2001). Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(3), 424–432. <http://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00295.x>
- Valverde, P. L., 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(1), 127–137. <http://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00482.x>
- Weaver, S. E., & Warwick, S. L. (1984). The biology of the canadian weeds. 64. *Datura stramonium* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 64(June), 979–991.
- Yun, L., & Agrawal, A. F. (2014). Variation in the strength of inbreeding depression across environments: Effects of stress and density dependence. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 3599–3606. <http://doi.org/10.1111/evo.12527>