



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Evolución de la defensa química contra insectos herbívoros de
poblaciones mexicanas y españolas de *Datura stramonium*.**

TESIS

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

PRESENTA:

BIÓL. SANDRA JOCELYN GARRIDO MIJANGOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
Y SUSTENTABILIDAD, UNAM-MORELIA

DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

MÉXICO, CD. MX. JUNIO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Evolución de la defensa química contra insectos herbívoros de
poblaciones mexicanas y españolas de *Datura stramonium*.**

TESIS

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

PRESENTA:

BIÓL. SANDRA JOCELYN GARRIDO MIJANGOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
Y SUSTENTABILIDAD, UNAM-MORELIA

DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

MÉXICO, CD. MX. JUNIO, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA

OFICIO CPCB/430/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted, que el Comité Académico, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del día 6 de marzo de 2023, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** de la alumna **GARRIDO MIJANGOS SANDRA JOCELYN**, con número de cuenta: **521000947** con la tesis titulada: **“EVOLUCIÓN DE LA DEFENSA QUÍMICA CONTRA INSECTOS HERBÍVOROS DE POBLACIONES MEXICANAS Y ESPAÑOLAS DE *Datura stramonium*”**, bajo la dirección del **DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**, Tutora Principal, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Vocal: DRA. KARINA BOEGE PARÉ
Vocal: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI
Vocal: DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA
Secretario: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 24 de mayo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de maestría con la beca número 778861.

Al proyecto PAPIIT IN216620, "Evolución de la defensa química de las plantas cuando sus herbívoros están ausentes", que financió esta investigación.

A mi tutor principal, Dr. Juan Núñez Farfán por guirme en la realización de este proyecto.

A los integrantes de mi comité tutor, Dra. Ek del Val de Gortari y Dr. Pedro Luis Valverde Padilla por sus valiosas aportaciones y sugerencias durante la realización de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A mi madre, por su amor incondicional y confianza.

Gracias, mamá, por ser mi lugar seguro aún a la distancia.

A mi padre, por enseñarme desde niña el amor por el conocimiento.

Gracias, papá, por apoyar cada una de mis decisiones.

Y, ¡Gracias, papás, por impulsarme a salir de casa para descubrir el mundo!

Dr. Juan Núñez Farfán, muchas gracias por brindarme un espacio en el laboratorio. El conocimiento que compartió conmigo y la ayuda brindada para lograr la realización de este trabajo es invaluable para mí.

A los miembros de mi Comité Jurado: Dr. Ken Oyama, Dr. Juan Fornoni, Dr. Francisco Espinosa, Dra. Ek del Val y Dra. Karina Boege, por sus valiosos consejos y aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Pedro Luis Valverde Padilla y al Laboratorio de Ecología de la UAM-I, por iniciarme en el fascinante mundo de la Ecología.

Al Dr. Juan Vázquez Martínez y Dr. John Velez Haro, por la ayuda brindada para el análisis de mis muestras, su labor fue esencial para la realización de este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM. Dra. Sabina, Adriana y Rafael, muchas gracias por ayudarme y aconsejarme en la realización de mis experimentos en campo, invernadero y laboratorio.

A Rosalinda Tapia, gracias por compartir tu conocimiento y regalar siempre una sonrisa al mundo.

A mis amigos del Posgrado, Daniel, Laura, Franco, Ana Lucia, Paola, Armando y Pablo; chicos, haberlos conocido es de las cosas más bonitas que me ha dado la UNAM. ¡Muchas gracias por su solidaridad, amistad y alegría! Y, gracias también, por toda la ayuda en mis experimentos.

Marco A. Pérez Hernández, gracias por todo el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de maestría, gracias por los consejos y por todas las incontables veces que me acompañaste a regar mis toloaches en tiempos pandémicos.

A Fernando Salgado, Edna Rodríguez y Pablo Lavaniegos, por compartir sus conocimientos estadísticos conmigo.

Al Dr. José Alejandro Zavala Hurtado, por impulsarme en la búsqueda de mis estudios de Posgrado.

A toda la familia Mijangos, mi ejemplo de perseverancia y amor al trabajo.

Y, a mis mejores amigas, Vanesa, Adilene y Cecilia por echarme porras en todo lo que me propongo.

Evolución de la defensa química contra insectos herbívoros de poblaciones mexicanas y españolas de *Datura stramonium*.

*“Hay más cosas en el cielo y en la tierra, Horacio,
de las que han sido soñadas en tu filosofía”*

Hamlet, William Shakespeare

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	I
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
Compuestos orgánicos volátiles en plantas: función y clasificación	5
II. SISTEMA DE ESTUDIO	6
IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	9
V. OBJETIVOS	9
VI. METODOLOGÍA	9
Selección de las poblaciones y diseño de experimento	9
Trabajo en invernadero	10
<i>Germinación de semillas de Datura stramonium</i>	10
<i>Lavado y germinación</i>	10
<i>Siembra, trasplante y riego</i>	11
<i>Fertilización</i>	13
<i>Seguimiento en el tiempo de las plantas y elección de genotipos</i>	13
<i>Daño foliar</i>	14
Análisis estadísticos	22
<i>Análisis comparativo del perfil de COVs emitido antes y después del daño foliar en poblaciones nativas y no nativas.</i>	22
<i>Análisis de diversidad alfa entre plantas con daño y sin daño de poblaciones nativas y no nativas de D. stramonium</i>	22
<i>Análisis semicuantitativo del perfil de COVs entre plantas de D. stramonium de México y España</i>	23
VII. RESULTADOS	23
Identificación y caracterización de principales COVs diferenciales encontrados en poblaciones nativas y no nativas de <i>D. stramonium</i>	23
Análisis comparativo del número de COVs emitidos en plantas con y sin daño foliar en poblaciones nativas y no nativas	25
Análisis semicuantitativo de VOCs presentes en poblaciones nativas y no nativas de <i>D. stramonium</i>	30
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIONES	47
X. ANEXOS	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica y características climáticas de las seis poblaciones de <i>D. stramonium</i> utilizadas para la determinación de COVs. *Datos tomados de Valverde <i>et al.</i> (2015), Liñan (2021) y Villanueva (2022). PP = precipitación media anual (mm); T = Temperatura media anual (°C).....	12
Tabla 2. Compuestos presentes en <i>D. stramonium</i> y su clasificación. *TR: Tiempo de retención. **No todos los compuestos están clasificados.....	24
Tabla 3. Modelo linear generalizado donde la variable de respuesta es el número de compuestos a nivel de origen.....	25
Tabla 4. ANCOVA del número de COVs en <i>Datura stramonium</i> , utilizando como covariable el área foliar total.	26
Tabla 5. Índices de diversidad alfa de COVs para las poblaciones nativas y no nativas de <i>D. stramonium</i>	26
Tabla 6. Valores de <i>H'</i> y su análisis con el estadígrafo <i>t</i> de Hutchenson al comparar la diversidad de COVs entre combinaciones de grupos (NCD-NCD, NNSD-NNCD, NSD-NNSD-NCD y NCD-NNCD).	30
Tabla 7. Semi cuantificación de los 10 compuestos orgánicos volátiles de <i>D. stramonium</i> en los 4 escenarios: Plantas no nativas con daño (NNCD), plantas no nativas sin daño (NNSD), plantas nativas con daño, plantas nativas sin daño (NSD). Valores transformados con la función logaritmo natural.....	31
Tabla 8. ANOVAs para el área relativa bajo la curva (en unidades arbitrarias) de cada compuesto en función del origen y tratamiento.....	32
Tabla 9. Técnicas de colecta de COVs utilizadas en este estudio: ventajas y desventajas...	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Semillas escarificadas de las distintas poblaciones de <i>D. stramonium</i> . b) Plántulas de <i>D. stramonium</i> en almácigos.....	11
Figura 2. Plantas de <i>D. stramonium</i> en invernadero. b) La tela tul se usó para evitar la proliferación de plagas dentro del invernadero (a y b).....	14
Figura 3. Plantas nativas de <i>D. stramonium</i> en etapa de floración. b) Plantas no nativas de <i>D. stramonium</i> en etapa de floración. Fotos tomadas previo a la colecta de COVs.....	16
Figura 4. Cada hoja fue medida y etiquetada con el número de hoyos a realizar correspondiente al 30% de daño. b) Daño mecánico con sacabocados metálico #3. c) Planta con daño mecánico.	17
Figura 5. Colecta de COVs en invernadero de plantas control. b) Hoja colectada y colocada en frasco de vidrio estéril. c) Frasco de vidrio con tapa de aluminio para evitar el uso de plástico. d) Frasco tapado y sellado con cinta teflón.	18

Figura 6. a) Frasco de vidrio con muestra homogeneizada manualmente. b) Cámara de incubación “handmade”.....	20
Figura 7. Para el caso de las poblaciones nativas sin daño, nativas con daño y no nativas con daño se alcanzó el número de COVs esperados con el número de plantas muestreadas. Para el caso de las poblaciones no nativas sin daño, no se logró cubrir el número de COVs esperados, lo que supone que estas poblaciones presentan una riqueza mayor de COVs.....	28
Figura 8. Las curvas de abundancia relativa muestran que en las poblaciones NSD, NCD, NNSD y NNCD el compuesto que mostró las emisiones más altas fue el 2-Hexenal, por el contrario los compuestos emitidos en cantidades bajas fue el Tridecanal, el Pentadecanal y el Decanal. En cantidades intermedias se encuentran el nonanal, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, Phenylethyl Alcohol, β -farnesene y el 2,6-Nonadienal, (E,E)-. Se aprecia también la dominancia de COVs siendo baja para poblaciones nativas y alta en poblaciones no nativas.....	29
Figura 9. Semi cuantificación de compuestos orgánicos volátiles presentes en las poblaciones nativas y no nativas de <i>D. stramonium</i> . Las unidades de area bajo la curva fueron transformadas con la función logaritmo natural, siendo ahora consideradas “unidades arbitrarias”. Tratamientos: Plantas no nativas con daño (NNCD), plantas no nativas sin daño (NNSD), plantas nativas con daño (NCD), plantas nativas sin daño (NSD).	31
Figura 10. Semi cuantificación de los 10 compuestos orgánicos volátiles de <i>D. stramonium</i> en los 4 escenarios: Plantas no nativas con daño (NNCD), plantas no nativas sin daño (NNSD), plantas nativas con daño, plantas nativas sin daño (NSD). Valores transformados con la función logaritmo natural.....	31
Figura 11. Prueba de Tukey sobre boxplot de la abundancia relativa (concentración) de los COVs encontrados en i) poblaciones no nativas con daño. El grupo verde oscuro (a) está conformado por el 2,6-Nonadienal; el grupo naranja (ab) por el Decanal y Pentadecanal; el grupo morado (abc) por el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol y β -farnesene; el grupo rosa (bc) por el Nonanal, el grupo verde claro (c) por el Phenylethyl Alcohol y el grupo amarillo (d) por el 2-Hexenal; ii) poblaciones no nativas sin daño: el grupo verde oscuro (a) está constituido por el E)-, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, Nonanal, 2,6-Nonadienal, Phenylethyl Alcohol y el Pentadecanal; el grupo naranja (ab) por el Decanal, β -farnesene y Tridecanal; el último grupo, color morado (b) está conformado por el 2-Hexenal; iii) poblaciones nativas con daño: el grupo verde oscuro(a) está conformado por el Decanal; el grupo verde claro (bc) por el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol; el grupo naranja (abc) por el β -farnesene y el 2,6-Nonadienal, (E,E)-; el grupo café (d) por el 2-Hexenal; el grupo amarillo (bd) por el 3-Hexen-1-ol, (Z); el grupo rosa (ac) por el Nonanal y pentadecanal; por último, el grupo morado (abcd) está constituido por el Phenylethyl Alcohol y iiii) poblaciones nativas sin daño: el grupo verde oscuro (a) está integrado por el Decanal y Pentadecanal; el grupo morado (b) por el (E)-, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol; el grupo naranja (ab) por el β -farnesene, Nonanal, 2,6-Nonadienal, (E,E)- y Phenylethyl Alcohol; por último, el grupo rosa (c) contiene al 2-Hexenal y 3-Hexen-1-ol, (Z).....	33

RESUMEN

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por plantas superiores son productos del metabolismo secundario, los cuales desempeñan un papel importante en distintos procesos ecológicos como la comunicación planta-planta, la comunicación planta-polinizador, la comunicación planta-insecto y la señalización tri-trófica. Además, se ha reportado que actúan en la defensa química, la cual puede ser constitutiva o inducirse ante el ataque por insectos herbívoros (HIPVs). En algunas plantas que colonizan áreas fuera de su ambiente nativo, los caracteres defensivos se ven atenuados, ya que la presión de selección por insectos herbívoros es nula o se ve disminuida. *Datura stramonium*, además de alcaloides como compuestos de defensa que han sido ampliamente estudiados, presenta compuestos orgánicos volátiles, por lo que, con el uso de metabolómica no dirigida, el objetivo de este estudio fue identificar y evaluar semicuantitativamente a los compuestos orgánicos volátiles presentes en poblaciones nativas (México: Ticumán, Teotihuacán y Valsequillo) y no nativas (España: Pedroso, Pinilla y Zubia) en plantas con daño y sin daño mecánico. Se encontraron diez COVs en *D. stramonium*; la variación en el número de COVs emitidos entre poblaciones está explicado por el origen. El análisis de diversidad alfa mostró que la riqueza fue mayor en poblaciones nativas sin daño foliar y menor en poblaciones no nativas, la dominancia de compuestos es baja en poblaciones nativas y alta en poblaciones no nativas, siendo el compuesto 2-Hexenal el compuesto emitido en mayor cantidad en comparación a los demás para este ambiente. El 2-Hexenal fue el compuesto presente en mayor cantidad en ambos orígenes en plantas con y sin daño foliar. No se detectó un cambio significativo entre las cantidades emitidas de compuestos volátiles en *D. stramonium* entre poblaciones nativas y no nativas.

ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) produced by higher plants are secondary metabolism products, which play an important role in different ecological processes such as plant-plant communication, plant-pollinator communication, plant-insect communication and tri-trophic signaling. In addition, they have been reported to act in chemical defense, which can be constitutive or induced after herbivorous insect attack. In plants that colonize a non-native range the defensive characters are attenuated, due to the selection pressure by herbivorous insects is null or decreased in the new range. For *Datura stramonium*, alkaloids have been widely studied as a type of chemical defense in native (Mexican) and Spanish (non-native) populations. Therefore, with the use of non-targeted metabolomics, this study aimed to identify and evaluate semi-quantitatively volatile organic compounds, as another type of chemical defense, present in undamaged and damage plants from the native range (Mexico: Ticumán, Teotihuacán and Valsequillo) and non-native range (Spain: Pedroso, Pinilla and Zubia). Ten VOCs were found in *D. stramonium*; the variation in the number of VOCs emitted among populations is explained by the origin. The alpha diversity analysis showed that the richness was higher in undamaged native populations and lower in non-native populations, the dominance of compounds is low in native populations and high in non-native populations, being the compound 2-Hexenal the compound emitted in greater quantity compared to others for this environment. 2-Hexenal was the compound most present in both origins in plants with and without leaf damage. No significant change was detected between the amounts emitted of volatile compounds in *D. stramonium* between native and non-native populations.

I. Introducción

En plantas que colonizan nuevos ambientes se ha reportado que, los insectos herbívoros con los que han coevolucionado están ausentes o atenuados (Castillo *et al.*, 2019), además de encontrarse con herbívoros novedosos y no adaptados. Tales cambios en las asociaciones de insectos ejercen presiones de selección distintas que pueden conducir a cambios evolutivos en los patrones de asignación para los caracteres de defensa y crecimiento. (Lin *et al.*, 2021). Los caracteres de defensa pueden ser mecánicos, como los tricomas, o caracteres químicos, sustancias del metabolismo secundario (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Miranda-Pérez *et al.*, 2016) como terpenos, glucósidos, taninos, flavonoides, aminoácidos no proteicos o alcaloides. Hasta ahora, se han descrito más de 200,000 compuestos relacionados con la defensa de las plantas, siendo los más abundantes los terpenos, alcaloides y fenoles (Mithöfer y Boland, 2012). El tipo o magnitud de estos caracteres evita el daño provocado por herbívoros al impactar negativamente su preferencia y desempeño (antibiosis). Asimismo, las defensas químicas y físicas de las plantas pueden ser *constitutivas* (presentes sin necesidad de ataque de antagonistas), como el grosor de la cutícula y metabolitos secundarios como los tropano alcaloides, o *inducibles* y expresarse después de recibir daño por herbívoros o patógenos (Karban y Baldwin, 1997), como es el caso de los compuestos volátiles inducidos por herbívoros, HIPVs (por sus siglas en inglés “herbivore-induced plant volatiles”; Dicke y Baldwin, 2010) los cuales sirven como señales específicas para niveles tróficos más altos, tales como depredadores y parasitoides de insectos herbívoros que usan a los HIPVs para localizar a su huésped o presa (Chengcheng *et al.*, 2023); para los insectos herbívoros se ha reportado el uso de HIPVs para evitar acudir a las plantas que ya están ocupadas por herbívoros (Danner *et al.*, 2016). La defensa inducida implica la síntesis de nuevos metabolitos secundarios, o el aumento en la concentración de los existentes. La activación específica de estas respuestas inducidas está regulada por una red de cascadas de señalización, que incluye la señalización de péptidos, fitohormonas como las señales de ácido salicílico y etileno y señales de oxilipina derivadas de lípidos (Halitschke *et al.*, 2006).; por lo que el fenotipo químico constitutivo se transforma en un fenotipo inducido específico producido por cada tipo de ataque (García- Rodríguez *et al.*, 2012).

Para explicar estos cambios evolutivos, existen diversas teorías; la hipótesis de la *liberación del enemigo* (ERH, Enemy Release Hypothesis; Elton, 1958; Crawley, 1986;

Keane y Crawley, 2002) plantea que, durante la introducción de una especie a un nuevo ambiente, las poblaciones de plantas experimentan una reducción en la regulación por sus herbívoros especialistas y patógenos (Keane y Crawley, 2002; Callaway y Ridenour, 2004), menores niveles de herbivoría comparada con las especies nativas (Keane y Crawley, 2002; Agrawal *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2006), y por tanto, un incremento en tamaño, fecundidad y en aquellos caracteres que favorezcan la adecuación así como una disminución de los caracteres de defensa (por ejemplo, menor cantidad de tricomas foliares). Como respuesta al cambio, las plantas introducidas en el ambiente nuevo podrían mostrar un *incremento en su habilidad competitiva* (EICA, Evolution of increased competitive ability; Blossey y Nötzold, 1995), ya que los recursos ahorrados en defensa serían reasignados a aquellos caracteres que incrementen su adecuación. Bajo este contexto, la selección debería favorecer y mantener aquellos genotipos con altas capacidades competitivas pero baja asignación de recursos para defensa contra insectos herbívoros y/o patógenos (Müller, 2018). O, para el caso de las plantas introducidas que no puedan reducir los recursos asignados a la defensa podrían mostrar *un cambio en los caracteres de defensa* (SDH, Shifting defence hypothesis; Müller-Schärer y Steinger, 2004). La hipótesis de SDH está basada en los principios de EICA, pero considera, además, el conflicto de insectos herbívoros especialistas-generalistas, los cuales ejercen presiones de selección contrarias sobre las concentraciones de metabolitos para la defensa. De acuerdo con la hipótesis se espera que, en el área nativa, las plantas presenten concentraciones medias de estos metabolitos “prefabricados” o de fácil producción, que además actúen a bajas concentraciones. Mientras que en el área no nativa, se espera que las plantas sean capaces de incrementar las concentraciones de metabolitos contra insectos generalistas (Müller, 2018).

Posterior a EICA y SDH surge la teoría de las *armas novedosas* (NWH, Novel weapons hypothesis (Callaway y Ridenour, 2004), la cual sostiene que algunas plantas exóticas pasan de ser competidores débiles nativos a competidores “agresivos” en el ambiente no nativo, esto, a través de exudados bioquímicos que son altamente inhibidores (alelopáticos) para plantas o microorganismos en el ambiente no nativo, pero relativamente ineficaces contra vecinos naturales que se han adaptado con el tiempo. García- Rodríguez (2012) sugiere que la aparición de nuevos metabolitos secundarios tóxicos excluiría a los enemigos de las plantas, pero estos a su vez desarrollarían mecanismos bioquímicos y comportamentales que los anularían. De acuerdo con esta perspectiva, la mayoría de los

metabolitos que se encuentran en una planta son o han sido adaptativos y son producto de la coevolución (difusa o directa) con sus enemigos naturales y sus mutualistas (Espinosa-García, 2001). Así, la invasión de plantas a nuevos ambientes se consideran experimentos a gran escala con grandes cambios en las presiones de selección por herbívoros y enemigos naturales (Lin et al., 2021), siendo una oportunidad para estudiar y entender los cambios evolutivos posteriores a la introducción de especies a nuevos hábitats (Liñán, 2021).

Durante los últimos años, se ha utilizado a la metabolómica como una herramienta para investigar las defensas volátiles inducibles y/o constitutivas contra insectos herbívoros comparando plantas atacadas y no atacadas del mismo fenotipo inicial bajo condiciones idénticas usando insectos herbívoros especialistas, generalistas (Halitschke *et al.*, 2006, Ataíde *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2021), o daño mecánico (Ameye *et al.*, 2018, Villanueva, 2022). Los resultados obtenidos indican que, en hojas no dañadas la liberación de volátiles constitutivos es baja y, en hojas dañadas por insectos herbívoros la liberación de volátiles inducidos se incrementa, atrayendo así parasitoides que atacan a los insectos herbívoros. La mezcla volátil liberada también varía en función de la especie de planta, al tipo de alimentación del herbívoro que produce el ataque, e incluso de la etapa de desarrollo del insecto (Boege *et al.*, 2019) o la planta. Para las plantas, el poseer un mecanismo de defensa inducida en el nuevo ambiente, proporcionaría mayores beneficios en su adecuación, que una defensa constitutiva debido a que la primera no requiere de una constante inversión de recursos, lo cual es importante si las defensas son costosas (Bautista-Lozada *et al.*, 2012).

Compuestos orgánicos volátiles en plantas: función y clasificación

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por plantas superiores son productos o subproductos de rutas metabólicas primarias (Bautista-Lozada *et al.*, 2012), consisten en una cadena principal basada en carbono, se evaporan fácilmente bajo condiciones de presión y temperatura ambiente (Faiola y Taipale, 2020). Además, son producidos y liberados en diferentes cantidades, momentos y tejidos; se ha reportado que su regulación es contexto-dependiente (Rosenkranz y Schnitzler, 2010), es decir, depende del espacio, tiempo y desarrollo fenológico de la planta y de factores abióticos como la sequía, temperatura y luz (Ameye *et al.*, 2016)

Los COVs desempeñan un papel importante en los procesos ecológicos como la comunicación planta-planta (Arimura *et al.*, 2009; Baldwin *et al.*, 2006), la comunicación planta-polinizador (Schiestl y Johnson, 2013), la comunicación planta-insecto (Li y Blande, 2017), y la señalización tri-trófica (Dicke, 2009); participan en procesos ambientales tales como las respuestas a corto y largo plazo a la luz y desempeñan un papel importante en la química atmosférica (Bautista-Lozada *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, se han identificado más de 1,700 COVs diferentes en las emisiones de las plantas (Dudareva *et al.*, 2006), los cuales se clasifican en tres grandes grupos: 1) terpenos, (2) fenilpropanoides/benzenoides, y 3) derivados de ácidos grasos; aunque también hay grupos menores como los indoles y los isotiocianatos (Bautista-Lozada *et al.*, 2012).

Dentro de los COVs más estudiados se encuentran los *volátiles inducidos por herbivoría* (HIPVS) (Hu, 2021; Dicke y Baldwin, 2010) divididos en tres clases generales: terpenoides, que incluyen monoterpenos, sesquiterpenos y derivados de terpenos (Franks *et al.*, 2012; Ataide *et al.*, 2016; Effah *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020), hormonas vegetales, como el salicilato de metilo y *volátiles de hoja verde* (GLVs por sus siglas en inglés, “green leaf volatiles”) que incluye al grupo de los aldehídos, alcoholes y acetatos (Matsui, 2006, Yamauchi *et al.*, 2015).

Con el uso de metabolómica no dirigida (aquella que no está enfocada en el estudio de ciertos metabolitos específicos previamente conocidos) es posible estudiar el impacto de la interacción planta-herbívoro con el fin de obtener y conocer el perfil de metabolitos emitidos (Sardans *et al.*, 2021), específicamente de aquellos compuestos volátiles que participan en esta interacción.

II. Sistema de estudio

Datura stramonium L. (Solanaceae), mejor conocida como “toloache”, es una hierba anual arvense o ruderal, nativa de México (Jiao *et al.*, 2002) donde se encuentra ampliamente distribuida (Núñez-Farfán, 1991).

En su ambiente nativo, las poblaciones de *D. stramonium* son atacadas por una amplia variedad de herbívoros (Núñez-Farfán, 1991), entre los que destacan dos coleópteros especialistas pertenecientes a la familia Chrysomelidae que se alimentan exclusivamente de *Datura* o bien de otras especies de solanáceas: *Lema daturaphila* (Kogan y Goeden, 1970a, b; Peterson y Dively, 1981) y *Epitrix parvula* (Essig, 1958). También destacan el

herbívoro generalista *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphoidea) (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994) y el depredador de semillas *Trichobaris soror* (Coleóptera: Curculionidae). El daño foliar provocado por herbívoros reduce significativamente la sobrevivencia y reproducción de los individuos (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Forni et al., 2003; Valverde et al., 2003). Además, para el caso de México, estudios recientes (Villanueva, 2019) han reportado la presencia de parasitoides que atacan al herbívoro especialista de *D. stramonium*, *L. daturaphila*. En la fase de huevo es atacado por *Emersonella lemae*, una avispa perteneciente a la familia de las Eulophidae. Para el estado larval se reportan tres especies de moscas koinobiontes (*Patelloa* sp., *Winthemia* sp., *Heliodoros* sp. y *Pseudochaeta* sp.) de la familia Tachinidae (Villanueva, 2019). Para el depredador de semillas, *T. soror*, también se ha reportado la presencia de la avispa parasitoide *Nealiolus* sp., en poblaciones nativas de *D. stramonium* (Hernández, 2009).

Datura stramonium también se encuentra distribuida ampliamente alrededor del mundo en regiones con climas cálidos (van Kleunen et al., 2007). Originaria de México, fue introducida en Europa aproximadamente hace 500 años. En España ha sido catalogada como especie invasora (Valverde et al., 2015) y se ha reportado que, en esta área, las plantas son significativamente menos dañadas por herbívoros, alcanzan mayor talla y poseen baja concentración de alcaloides, en comparación con las poblaciones nativas (Valverde et al., 2015; Castillo et al., 2019). Al estudiar distintas poblaciones de *D. stramonium* en España, Valverde et al. (2015), reportan que hay una baja riqueza de invertebrados fitófagos; siendo la polilla generalista *Helicoverpa armigera* el principal herbívoro en todas las poblaciones. Además de las hojas, las larvas de *H. armigera* también perforan los frutos para consumir semillas inmaduras hasta la pupación. Para el caso de *D. stramonium* en España, aún se desconoce la presencia de parasitoides para esta interacción tritrófica. Sin embargo, para *H. armigera* si se han reportado parasitoides, siendo *Archytas incertus* (Tachinidae: Diptera) uno de sus principales depredadores. En cultivos de soya, Weber et al. (2021) han reportado la presencia de gran diversidad de parasitoides que están asociados a *H. armigera*, como *Lespesia* sp. (Diptera:Tachinidae), *Chetogena* sp. (Diptera:Tachinidae), *Atactosturmia* sp. (Diptera:Tachinidae), *Belvosia* sp. (Diptera:Tachinidae), *Gonia sequax* (Diptera:Tachinidae) y *Archytas marmoratux* (Diptera:Tachinidae).

Las características defensivas de *D. stramonium* contra insectos herbívoros han sido ampliamente estudiadas. Las poblaciones no nativas de esta especie no tienen la presencia de insectos herbívoros especialistas y son menos atacadas en el área de introducción que

en su área nativa (Torchin y Mitchell ,2004; Blaisdell y Roy, 2014). Castillo *et al.* (2019) reporta que para poblaciones nativas de *D. stramonium*, donde es consumida principalmente por dos herbívoros especialistas (*Lema trilineata* y *Epitrix parvula*), hay una asociación geográfica entre los caracteres de defensa, factores ambientales y el daño foliar.

Por otro lado, para el caso de las poblaciones de toloache localizadas en el sur de España, Valverde *et al.* (2015) reportan que el daño foliar fue 20 veces menor que en México. Esta diferencia en el daño en las hojas coincide con lo esperado bajo la hipótesis de la liberación del enemigo (ERH). La disminución del daño foliar de las poblaciones no nativas podría deberse a dos posibles factores, el primero es que los dos herbívoros especialistas de *D. stramonium* que se encuentran en el área nativa están ausentes en las poblaciones del sur de España; en segundo lugar, los herbívoros generalistas registrados durante los estudios de campo en España consumen una cantidad muy pequeña de tejido foliar de *D. stramonium* y, por tanto, es poco probable que ejerzan una fuerte presión selectiva para la resistencia de las plantas en el nuevo entorno. Estudios recientes que ponen a prueba la hipótesis de EICA a nivel metabolómico predicen que las concentraciones de metabolitos de defensa constitutivos en plantas deberán ser más bajos en plantas invasoras (Müller, 2018). En este contexto, el presente trabajo propone un análisis metabolómico en invernadero con poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium*, bajo condiciones controladas, con el fin de evaluar y comparar los perfiles de COVs en plantas con y sin daño foliar.

III. Hipótesis

Al comparar la emisión constitutiva e inducible de compuestos orgánicos volátiles en plantas nativas y no nativas frente al daño por herbivoría, se espera que las plantas no nativas liberen mayores niveles de volátiles constitutivos que disuadan a los insectos herbívoros generalistas y menor cantidad de volátiles inducibles (Lin *et al.*, 2021). Asumiendo que la evolución de los volátiles foliares podría estar mediada por su papel en la defensa directa o indirecta contra insectos herbívoros y con base en estudios preliminares con *D. stramonium* que sugieren una respuesta sistémica de COVs después de recibir daño mecánico y por insectos herbívoros (Villanueva, 2022) se espera que: i) Las poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium* expresarán perfiles de compuestos químicos volátiles distintos. ii) La liberación de volátiles inducibles será favorecida en las

poblaciones nativas con el fin de atraer parasitoides; la liberación constitutiva de volátiles se verá disminuida para evitar la detección por insectos herbívoros especialistas y iii) En el ambiente no nativo la liberación de volátiles constitutivos se verá favorecida para disuadir a los herbívoros generalistas.

IV. Pregunta de investigación

Si, como se sugiere en estudios previos, la evolución de las emisiones de los volátiles de hoja ha sido conducida por desempeñar un papel en la defensa directa y/o indirecta contra insectos herbívoros (Lin *et al.*, 2021) y, si esta variación cualitativa y cuantitativa responde también a factores como el genotipo de la planta e identidad del herbívoro (especialista o generalista) (Rowen y Kaplan., 2015, Villanueva, 2019) y daño mecánico (Martins *et al.*, 2017; Bautista-Lozada y Espinosa-García, 2013; Villanueva, 2019) nos formulamos la siguiente pregunta: ¿La ausencia de herbívoros especialistas y sus enemigos naturales, en el ambiente no nativo de *Datura stramonium* ha producido un cambio en las emisiones constitutivas e inducibles de compuestos orgánicos volátiles en comparación con las poblaciones nativas?

V. Objetivos

Evaluar semicuantitativamente en poblaciones de *D. stramonium* de México (nativas) y España (no nativas) el perfil de compuestos volátiles (COVs) como tipo de defensa inducida y/o constitutiva ante el daño foliar.

VI. Metodología

Selección de las poblaciones y diseño de experimento

Las poblaciones de estudio se seleccionaron de entre aquellas estudiadas previamente (Valverde *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2019) considerando los siguientes atributos: producción de alcaloides (baja, media, alta concentración), tiempo de almacenamiento de las semillas y éxito en la germinación. Dado que la producción de alcaloides (atropina y escopolamina) ha sido considerada como un tipo de defensa química para *D. stramonium* (Valverde *et al.* 2001; Castillo *et al.* 2013), seleccionar poblaciones que difieran en la expresión de estos compuestos nos ofrece la posibilidad de planear futuros experimentos y

comprobar si a baja, alta o media producción de alcaloides la capacidad de producir y/o liberar COVs también se ve afectada. Por último, el tiempo de almacenamiento está relacionado con la viabilidad de la semilla y el éxito en la germinación; así, semillas con poco tiempo de almacenamiento tendrán un mayor éxito en la germinación.

Para cada origen (México y España) se seleccionaron 3 poblaciones. Para cada población, se seleccionaron dos familias genéticas distintas, y, para cada familia se tomaron 6 plantas con la finalidad de tener el número de réplicas mínimo requerido para análisis de cromatografía de gases; de las seis plantas, tres plantas fueron dañadas mecánicamente y tres plantas fueron control (sin daño), dando un total de 72 plantas (Figura 1). Las familias utilizadas en este experimento corresponden a las siguientes poblaciones; México: Teotihuacán, Ticumán y Valsequillo; España: Pedroso, Pinilla y Zubia (Tabla 1).

Trabajo en invernadero

Germinación de semillas de *Datura stramonium*

Las semillas utilizadas en los procedimientos descritos a continuación fueron obtenidas a partir de experimentos anteriores donde los frutos que contenían a estas semillas representan a la primera generación filial, F1. Las plantas madre crecieron en un periodo de tiempo comprendido entre septiembre a diciembre del 2019 y las más tardías hasta el mes de enero de 2020, por lo que los frutos de donde provienen estas semillas fueron recolectados a partir del mes de enero de 2020.

Lavado y germinación

Con el propósito de romper la latencia, las semillas fueron colocadas en bolsas de celofán y refrigeradas durante 24 horas y sometidas a ciclos de lavados. El primero de ellos con agua caliente a una temperatura de 60° C durante 10 segundos, después se realizaron 8 lavados con agua a temperatura de 37° C durante 10 minutos. Una vez lavadas, se dejaron remojar en agua a temperatura ambiente por 12 horas. Para ayudar en el proceso de germinación se removió la testa y las semillas fueron colocadas en cajas petri con papel filtro humedecido en cámaras de ambiente controlado (fotoperiodo de 12:12 horas de luz/oscuridad, temperatura media 25°/35° C) (Figura 1a). Se mantuvo un riego constante aplicando tres gotas de agua por caja durante 4 semanas.

Siembra, trasplante y riego

Una vez que los cotiledones estuvieron completamente extendidos, las plántulas fueron colocadas en almácigos con una mezcla de sustrato con 50% arena, 25% perlita (Agrolita®) y 25% vermiculita (Figura 1b). Las plántulas permanecieron 4 semanas en cámaras de ambiente controlado (fotoperiodo de 12:12 horas de luz/oscuridad, temperatura media 25°/35° C). Finalmente, cuando las plántulas desarrollaron entre de 2-3 hojas verdaderas fueron transplanteda a macetas de 1 litro con 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. Las plantas fueron llevadas al invernadero durante 2 meses y regadas diariamente con 20 mL de agua.

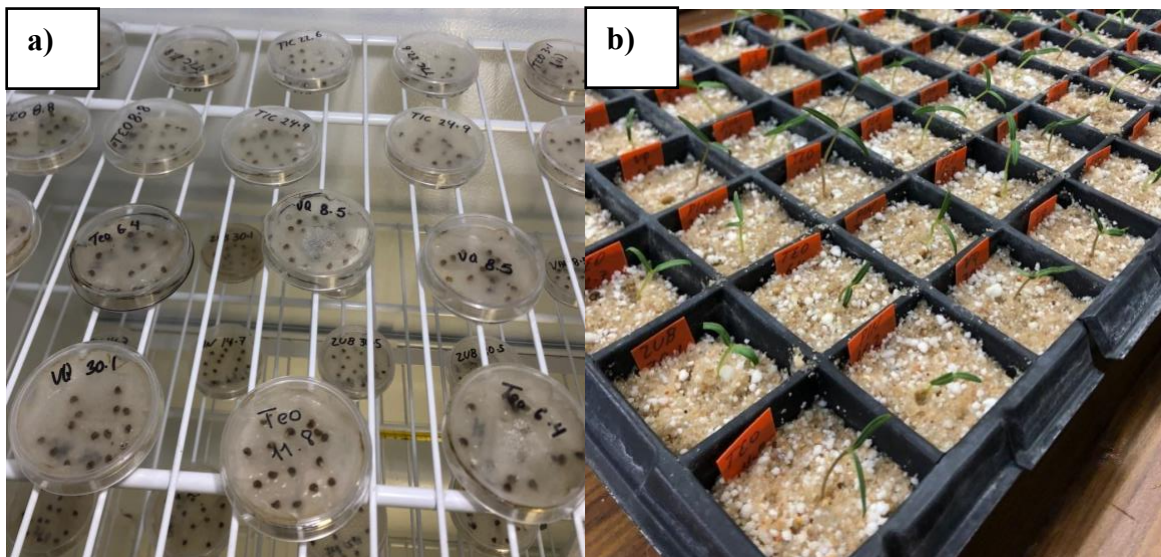


Figura 1. a) Semillas escarificadas de las distintas poblaciones de *D. stramonium*. b) Plántulas de *D. stramonium* en almácigos.

Tabla 1. Ubicación geográfica y características climáticas de las seis poblaciones de *D. stramonium* utilizadas para la determinación de COVs. *Datos tomados de Valverde *et al.* (2015), Liñan (2021) y Villanueva (2022). PP = precipitación media anual (mm); T = Temperatura media anual (°C).

Población	Estado, País	Coordenadas geográficas	Hábitat	Altitud (m.s.n.m)	PP mm	T (°C)
<i>Pedroso</i>	Sevilla, España	37° N, 5° O	Borde de carretera	383	501.6	17
<i>Pinilla</i>	Murcia, España	37° N, 3° O	Campo de cultivo	240	236.6	17
<i>Zubia</i>	Granada, España	37° N, 3° W	Campo de cultivo	692	598.2	17
<i>Teotihuacán</i>	Estado de México, México	19° N, 98° W	Matorral xerófilo	2050	616.6	15.9
<i>Ticumán</i>	Morelos, México	18° N, 99° W	Bosque tropical seco	961	802.1	23.1
<i>Valsequillo</i>	Puebla, México	18° N, 98 ° W	Selva baja caducifolia	2200	668.3	16.2

Fertilización

Las plántulas fueron fertilizadas al momento de extender completamente los cotiledones. Durante esta etapa se colocaron tres gotas de fertilizante (Peters20-20-20NPK: 3.9% NH₄-N, 5.8% NO₃-N, 10% urea-N, 20% P₂O₅, 20% K₂O-K) semanalmente a una concentración de 1.9gr/L. Al momento del trasplante en macetas de 1L, se agregaron al sustrato 20 mL de fertilizante con la misma concentración. La dosis de fertilizante fue de 20 mL cada 7 días hasta su utilización de la planta para la colecta de VOCs. Se suspendió la aplicación de fertilizante tres semanas antes previo a la colecta de COVs. Para evitar la contaminación por moscas blancas (*Bemisia tabaci*), las plántulas fueron cubiertas con tela tul (Fig. 2 a y b). Para estos experimentos no se usó insecticida o algún otro químico que pudiera interferir con el análisis de VOCs.

Seguimiento en el tiempo de las plantas y elección de genotipos

Las plantas crecieron durante los meses de enero y febrero de 2022 en invernadero bajo condiciones controladas de agua y nutrientes. En etapa de floración de las 180 plantas que crecieron en el invernadero, se seleccionaron 72 plantas al azar de cada una de las poblaciones antes mencionadas (Figura 3a y b).

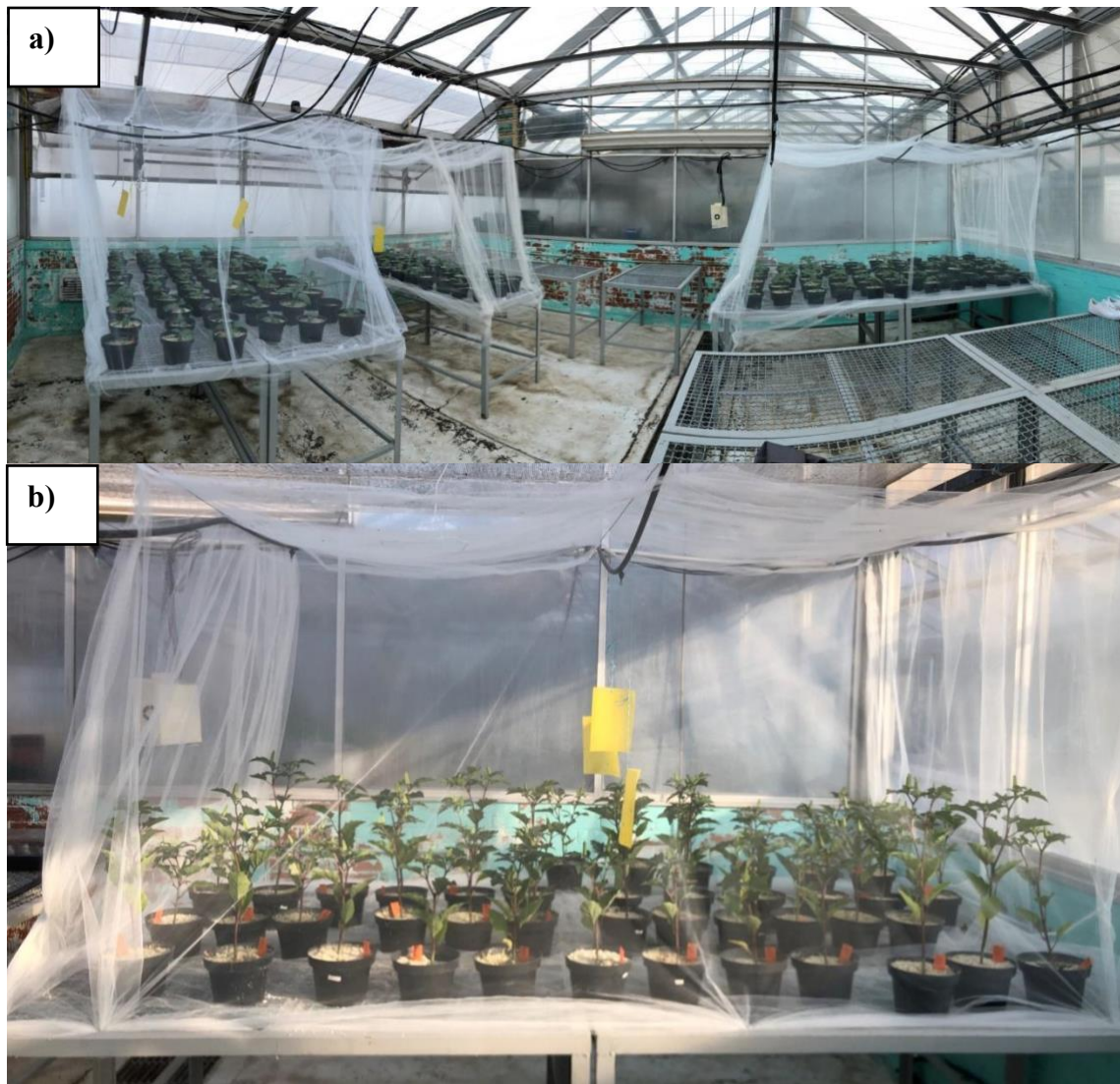


Figura 2. a) Plantas de *D. stramonium* en invernadero. b) La tela tul se usó para evitar la proliferación de plagas dentro del invernadero (a y b).

Daño foliar

Previo a realizar el daño mecánico, en cada planta se midió el largo de cada hoja completamente expandida para estimar el área foliar, utilizando la ecuación $\text{Área foliar} = [\text{Longitud de hoja}] * 2.47 + 0.34 * [\text{Longitud de hoja}]^2 - 12.37$ (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Valverde *et al.*, 2001). Una vez obtenida el área foliar de cada hoja, usamos la Ecuación

$$\text{Daño foliar (No. de hoyos)} = \frac{(\text{Área foliar})(0.3)}{(3.1416)(0.55)^2}$$

para calcular el 30% del área foliar a dañar y el número de hoyos a realizar por hoja según el diámetro del sacabocados. En etapa de floración, se seleccionaron 6 plantas al azar de cada población. Las plantas que recibirían daño mecánico fueron retiradas del invernadero 48hrs antes previo a la colecta y separadas a 1m de distancia (esto con la finalidad de evitar la comunicación planta-planta, entre plantas con daño y sin daño mecánico) y se dañaron mecánicamente sustrayendo el 30% del área de cada hoja con un sacabocados metálico #3 haciendo hoyos circulares de área conocida, para simular el daño que realizan algunos herbívoros (Fig. 4 a, b y c). El daño mecánico se realizó 16 hrs antes de la colecta de COVs.

Por cada población se seleccionaron también tres plantas al azar que servirían como plantas control, sin daño mecánico. Estas plantas permanecieron en el invernadero al momento de la colecta de VOCs. Posterior a la colecta de COVs las plantas fueron desechadas separando a los frutos de la parte vegetativa. Método de colecta, extracción e identificación de COVs

Se probaron tres métodos distintos de colecta de COVs para *D. stramonium*, por i) *headspace* (Anexo 1), ii) solvente (Anexo 2) y iii) SPME (solid phase micro-extraction) con el fin de saber cuál método era el más adecuado para las características de nuestra especie de estudio, recursos y objetivos. Al ser un estudio de metabolómica no dirigida, no se buscaba la colecta de algún COV específico, sino que el interés fue caracterizar la emisión total de este tipo de compuestos.

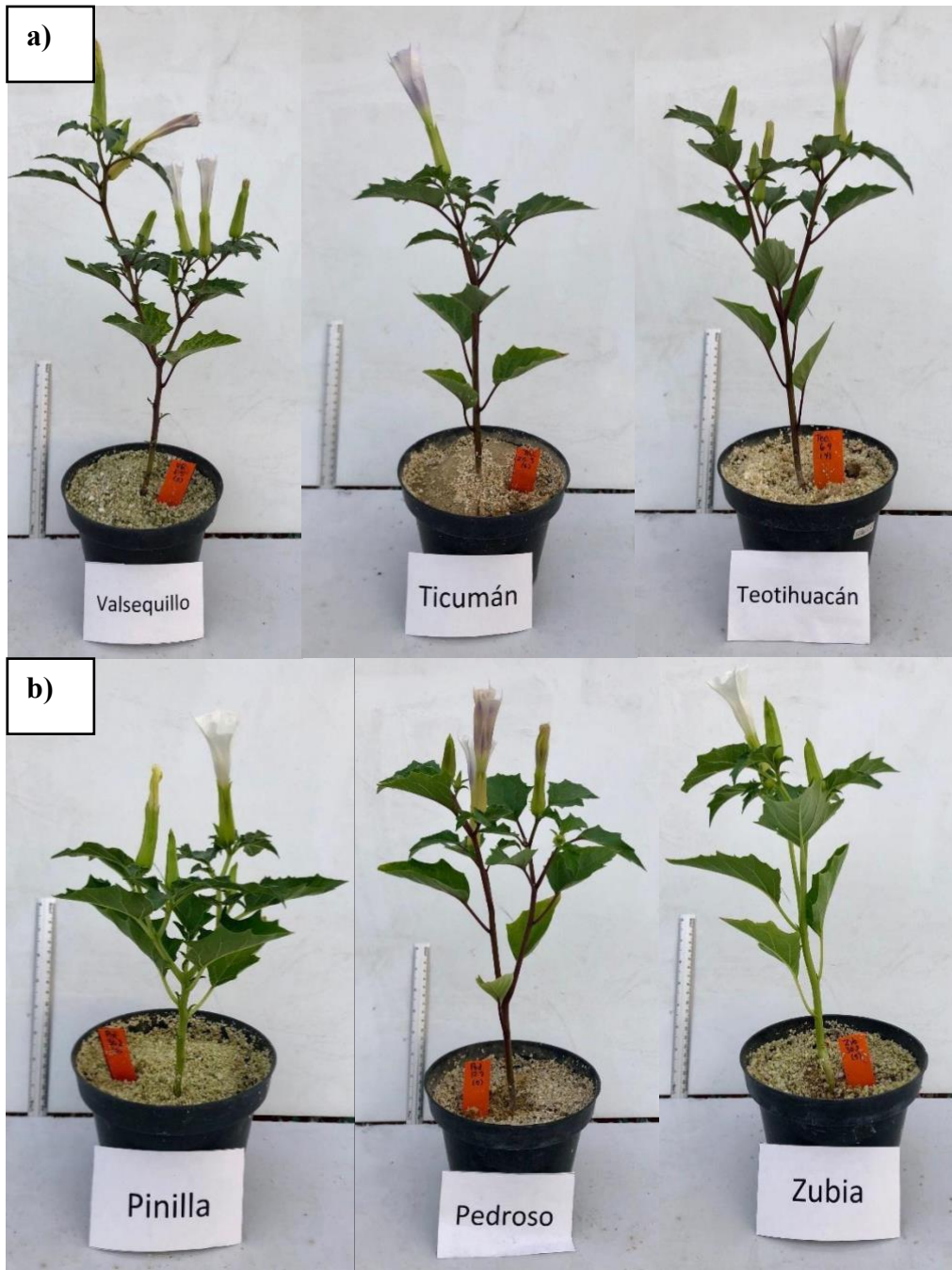


Figura 3. a) Plantas nativas de *D. stramonium* en etapa de floración. b) Plantas no nativas de *D. stramonium* en etapa de floración. Fotos tomadas previo a la colecta de COVs.

Método para la extracción de volátiles en fase sólida (SPME, solid phase micro-extraction)

Para este método de extracción se usaron seis plantas por cada línea o población en etapa de floración; tres plantas con tratamiento (30% de daño foliar) y tres plantas control (sin daño foliar).

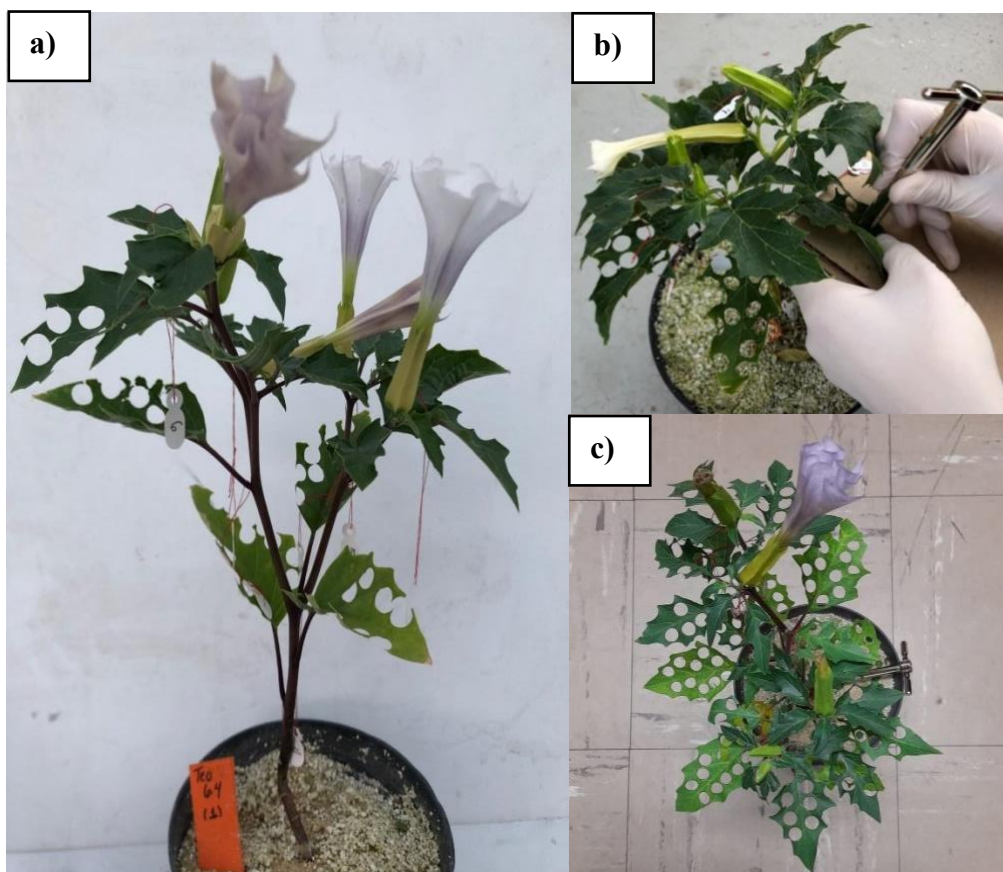


Figura 4. a) Cada hoja fue medida y etiquetada con el número de hoyos a realizar correspondiente al 30% de daño. b) Daño mecánico con sacabocados metálico #3. c) Planta con daño mecánico.

Colecta de compuestos orgánicos volátiles

Para cada tratamiento (con y sin daño mecánico) se cortó una hoja de cada planta con tijeras esterilizadas con alcohol al 70%. Cada hoja fue colocada dentro de un frasco de vidrio previamente lavado y esterilizado, con una tapa de hoja aluminio estéril. Después de la

colecta cada frasco se selló con cinta teflón para evitar contaminación (Fig. 5 a, b, c y d). Se tomaron tres réplicas por familia (con daño y sin daño), incluyendo dos muestras blanco de atmósfera fuera y en el invernadero dentro de frascos de vidrio vacíos para descartar cualquier posible contaminación de COVs. Estos fueron preparados y muestreados de forma idéntica, con la excepción de que no había hoja en el frasco.

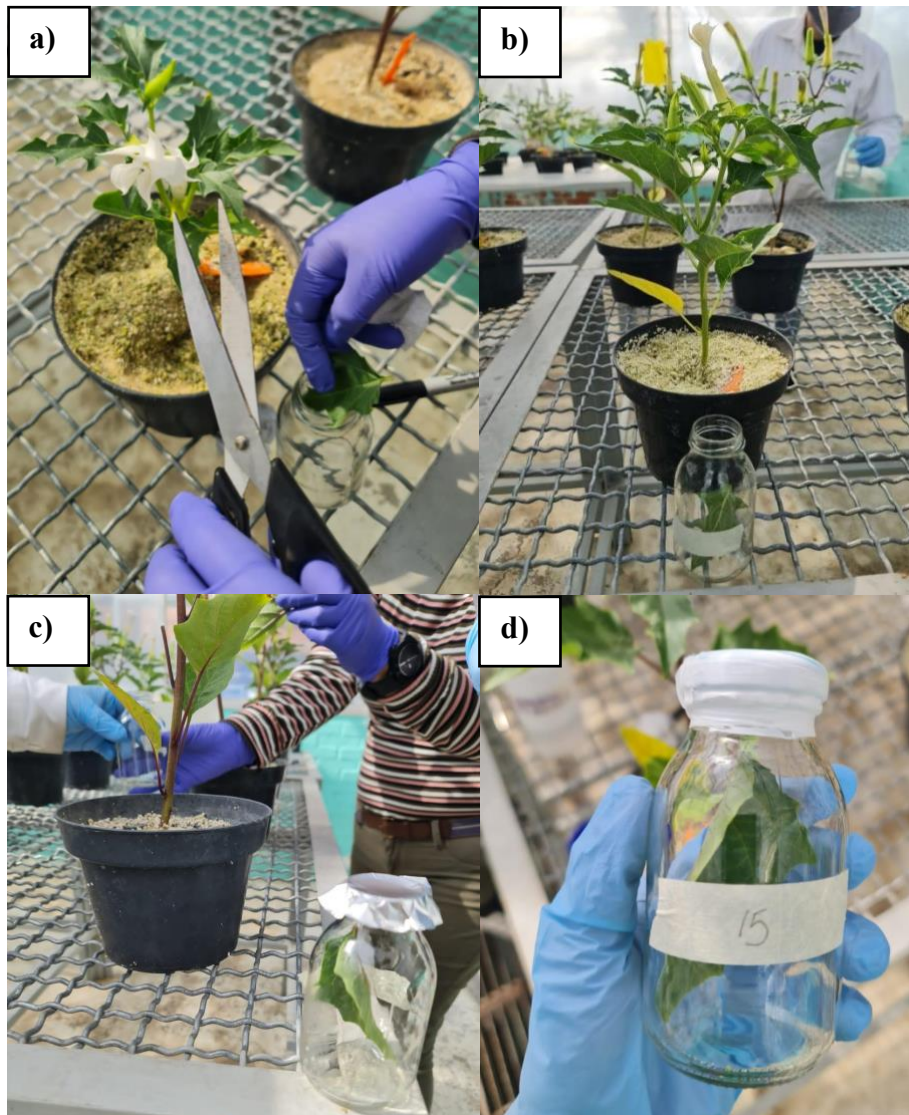


Figura 5. a) Colecta de COVs en invernadero de plantas control. b) Hoja colectada y colocada en frasco de vidrio estéril. c) Frasco de vidrio con tapa de aluminio para evitar el uso de plástico. d) Frasco tapado y sellado con cinta teflón.

Análisis de las muestras

La hoja colectada en cada frasco fue macerada manualmente durante 60 segundos utilizando un pistilo de vidrio previamente esterilizado. El frasco sellado se incubó a 40° C/10 min utilizando una cámara de incubación “handmade” de 35 x 16 x 15 cm, formada por una plancha de calentamiento con control automático de temperatura y una cubierta de acrílico. (Figura 6 a y b). Después de transcurrido el tiempo de incubación, se introdujo la fibra de SPME a través del aluminio utilizando una septa de teflón/silicón de 1.5 cm de diámetro como soporte para la fibra. Se expusieron 10 cm de la fibra al “headspace” colocándola aproximadamente a 1.5 cm sobre la superficie del tejido sin tocarlo. Después se incubó a 40° C durante 30 minutos para permitir la adsorción de los compuestos en la fibra expuesta. Finalmente, la fibra se guardó y se desorbió inmediatamente dentro del puerto de inyección del GC-ie-MS (Cromatógrafo de gases Clarus modelo 580 acoplado a un detector de masa de ionización por impacto de electrones Perkin Elmer modelo 560S, Estados Unidos).

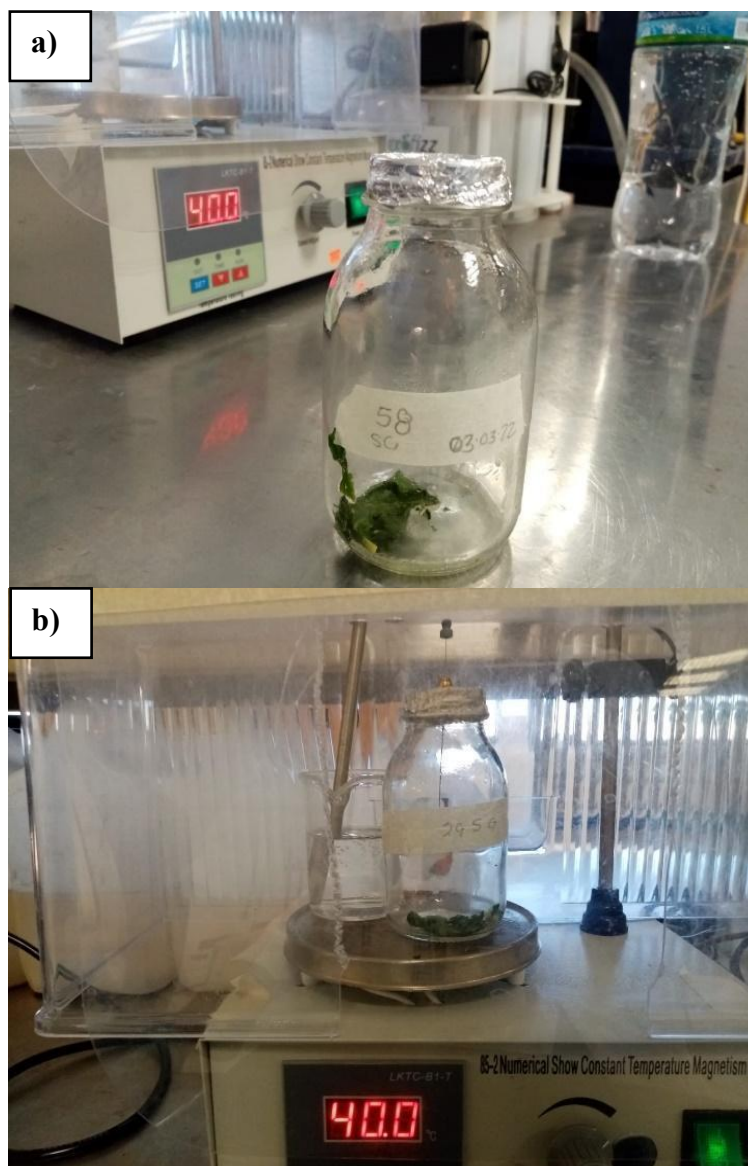


Figura 6. a) Frasco de vidrio con muestra homogeneizada manualmente. b) Cámara de incubación “handmade”.

Condiciones del GC-ie-MS

Para la lectura de las muestras también se utilizó el cromatógrafo de gases Clarus 580 con las siguientes condiciones: temperatura del inyector 250° C, temperatura del inyector 180° C, temperatura del detector 230° C, temperatura inicial 40° C. Posteriormente se aumentó a 6° C por minuto – 1 a 120° C, se mantuvo 1 minuto, luego aumentó a 12 °C min – 1 y se mantuvo durante 1 minuto, después, se aplicó una segunda rampa de 12°C min-1 para alcanzar los 290°C, la cual se mantuvo durante 0 min. La temperatura de la línea de

transferencia se estableció en 200° C. Los espectros de masa se obtuvieron a 70 eV de energía de electrones. Las mediciones se realizaron en modo SCAN con un ambiente de m/z establecido en 34-450. La temperatura de la fuente de iones se estableció en 230° C y se operó en 2.9 escaneos por segundo. La fase de cromatografía se realizó en una columna capilar elite-5 MS (Perkin Elmer, Inc.) (40cm x 250 µm x 0,25 µm) y se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. Se colectó y analizó el perfil de COVs de 4 frascos de vidrio vacíos, como control negativo, y poder analizar los COVs encontrados en el ambiente al momento del experimento (en el invernadero; donde fueron tratadas las plantas sin daño y fuera del invernadero; donde fueron tratadas las plantas con daño).

Identificación de principales COVs diferenciales

Para determinar las principales diferencias en los perfiles de COVs emitidos se hizo un análisis con las principales librerías de compuestos 'NIST MS Search Program v.2.0g' (National Institute of Standards and Technology, 2008) y el software AMDIS (<http://www.amdis.net/>) se utilizó para la determinación del tiempo de retención y la extracción del espectro de masa de cada componente de los cromatogramas. Para la semicuantificación del área relativa bajo la curva se utilizó el software TurboMass (Perkin Elmer, Inc.), la cual se toma como un indicador de las cantidades determinadas de cada compuesto volátil. La identificación de COVs se basa en el área de pico, el peso molecular del tiempo de retención (TR) y la fórmula molecular. Los criterios considerados fueron: pureza > 70 y match > 850. De las moléculas encontradas que cumplieron con los criterios de selección, se hizo un primer filtro para identificar las moléculas que ya han sido reportadas previamente en la bibliografía por estar presentes en plantas. Posteriormente, se aplicó un segundo filtro para aquellas moléculas que han sido reportadas en plantas y que, además, aparecían en dos de las tres réplicas realizadas.

Análisis estadísticos

Análisis comparativo del perfil de COVs emitido antes y después del daño foliar en poblaciones nativas y no nativas.

Para evaluar si existe una diferencia estadísticamente significativa en el número de compuestos emitidos en plantas con y sin daño mecánico en poblaciones de *D. stramonium* con distintos orígenes, se realizó un modelo lineal generalizado considerando una distribución de Poisson; se usó el software estadístico R (versión 4.0.2; R Core Team 2020), con la función GLM y el paquete “MSS” (Jackson, 2011) y “car” (Fox y Weiber, 2019). Para comprobar que las diferencias en el número de compuestos fuera por efecto del tratamiento y no por efecto del tamaño de las plantas (área foliar total) se realizó un ANCOVA usando el programa estadístico JMP versión 16.2.0 (SAS, 2020-2021) y considerando como covariable el área foliar por planta.

*Análisis de diversidad alfa entre plantas con daño y sin daño de poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium**

Para poder comparar la diversidad de las distintas especies químicas de COVs presentes en *D. stramonium*, se realizó un análisis de diversidad alfa usando los datos del área relativa bajo la curva para cada COV. El factor población no fue significativo en el GLM y para lograr una mayor robustez estadística en este análisis, se agruparon las 72 plantas en 4 grupos: a) nativas sin daño (NSD), b) nativas con daño (NCD), c) no nativas sin daño (NNSD) y d) no nativas con daño (NNCD). Primero, se analizó la riqueza de COVs con el índice de riqueza (S), se obtuvieron las gráficas de acumulación de especies químicas (COVs) para predecir el número de especies esperadas en función del número acumulativo de muestras. Luego, para conocer si un compuesto es más abundante que otro, se realizó el índice de dominancia de Simpson y Berger-Parker. Para evaluar la interacción entre la riqueza de especies químicas y su abundancia se realizó un análisis de diversidad tomando en cuenta los índices de Shannon-Wiener (H'), Shannon max, Pielou (equitatividad) y las curvas de abundancia relativa. Por último, para probar la hipótesis nula de que las diversidades provenientes de los 4 grupos (NSD, NCD, NNSD Y NNCD, medidas con el índice de Shannon-Wiener) son iguales se realizó una t modificada de Hutchenson (Hutchenson, 1970) haciendo combinaciones entre grupos: i) entre poblaciones nativas sin daño y con daño, ii) poblaciones no nativas sin daño y con daño, iii) entre poblaciones

nativas y no nativas sin daño y iii) poblaciones nativas y no nativas con daño. Los datos del área relativa bajo la curva fueron divididos entre 1,000,000 para un mejor manejo y apreciación de los datos y transformados a log₁₀ para la obtención de las curvas de composición relativa. Todos los análisis de diversidad fueron realizados con el programa Past (versión 4. 11)

*Análisis semicuantitativo del perfil de COVs entre plantas de *D. stramonium* de México y España*

Para analizar cambios en el área relativa bajo la curva de COVs entre grupos usando el software estadístico R (versión 4.0.2; R Core Team 2020), se realizó un ANOVA de un factor para: a) evaluar diferencias en la emisión de cada volátil entre grupos donde la variable explicativa fue cada COV emitido y la variable de respuesta el área relativa bajo la curva y b) evaluar diferencias en la cantidad emitida de volátiles dentro de cada grupo donde la variable explicativa fue el grupo y la variable dependiente el área relativa bajo la curva. Se realizó una prueba de Tukey en caso de encontrar diferencias significativas para contrastar la abundancia relativa de los diferentes COVs encontrados bajo diferentes condiciones. El resultado de dicha prueba se graficó con diagramas de caja. Para ambos análisis se transformó el área relativa bajo la curva con la función logaritmo natural para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las pruebas paramétricas.

VII. Resultados

*Identificación y caracterización de principales COVs diferenciales encontrados en poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium**

Se detectaron 66 moléculas por GC-ie-MS que cumplieron con los criterios de pureza y match, 36 de ellas están reportadas en la bibliografía como compuestos de plantas presentes en distintos tejidos como hojas, raíces, tallos, flores y semillas. La mayoría ya están reportados en la bibliografía como HIPVs (*Herbivore-Induced Plant Volatiles*) o GLVs (*Green leaf volatiles*) asociados a funciones de defensa contra herbívoros, patógenos, entre otras. De los 36 compuestos, sólo 10 cumplieron con los requisitos para ser considerados compuestos de *D. stramonium* (Tabla 2) ya que era indispensable que cada compuesto estuviera presente en 2 de las 3 réplicas realizadas. De los 66 compuestos obtenidos fueron eliminados 9 compuestos por estar presentes en las muestras control sin tejido vegetal.

De los 10 compuestos seleccionados, el grupo químico mejor representado fue el de los aldehídos. Este grupo es común dentro de los GLVs, siendo el 2-Hexenal, (E)- uno de los más estudiados. Los alcoholes (como el 3-Hexen-1-ol, (Z)- pertenecen al segundo grupo mejor representado entre las muestras.

Al evaluar cada COV de manera general entre todas las muestras, es decir, sin considerar los grupos, las plantas no nativas presentaron una frecuencia menor de compuestos que van de 0-3, con mayor frecuencia de un compuesto, mientras que las plantas nativas presentaron de 1-5 compuestos, con mayor frecuencia de compuestos.

Del total de compuestos volátiles seleccionados, se observó que algunos fueron encontrados únicamente en poblaciones nativas. Para el ambiente nativo los compuestos exclusivos fueron el Tridecanal y el 3-Hexen-1-ol, (Z). Los compuestos compartidos para ambos orígenes fueron el 2-Hexenal, (E)-, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, Decanal, Nonanal, 2,6-Nonadienal, (E,E)-, Phenylethyl Alcohol, Pentadecanal y el el sesquiterpeno β -farnesene. El compuesto más abundante en ambos ambientes ($n > 25$) fue el Nonanal.

Tabla 2. Compuestos presentes en *D. stramonium* y su clasificación. *TR: Tiempo de retención. **No todos los compuestos están clasificados

<i>TR</i> *	Compuesto	Tipo	Localización	VOCs**
11	2-Hexenal, (E)-	Aldehído alifático	Hojas	GLVs
11.4	3-Hexen-1-ol, (Z)-	Alcohol alifático	Hojas/Tallos	GLVS
20.6	Decanal	Aldehído graso	Hojas	HIPVs
18.3	Nonanal	Aldehído alifático	Hojas	HIPVs
26.4	Tridecanal	Aldehído alifático	Hojas	
27.5	Pentadecanal-	Alcohol graso	Hojas	
16.2	(S)-3-Ethyl-4-methylpentanol	Aldehído graso	Hojas, raíces, flor	
19.4	2,6-Nonadienal, (E,E)-	Derivado del nonanal	Hojas	
24.8	β -Farnesene	Terpeno (sesquiterpeno)	Hojas, frutos	
18.5	Phenylethyl Alcohol	Hidrocarbano alifático	Hojas	

Análisis comparativo del número de COVs emitidos en plantas con y sin daño foliar en poblaciones nativas y no nativas .

Al realizar el modelo lineal generalizado para evaluar si existen diferencias en el número de compuestos emitidos entre ambos orígenes y poblaciones en plantas con y sin daño foliar, se encontraron diferencias significativas con respecto al origen ($p < 0.0001$) y la interacción origen*daño ($p=0.0177$). Los factores población, daño foliar y la interacción población*daño no explicaron esta variación (Tabla 6). Así, las plantas nativas emitieron significativamente mayor número de compuestos en comparación con las no nativas.

Tabla 3. Modelo lineal generalizado donde la variable de respuesta es el número de compuestos a nivel de origen.

Fuente de variación	<i>g.l.</i>	L-R Chi²	<i>p</i>
Daño	1	1.67	0.10
Origen	1	16.84	< 0.0001
Población [Origen]	4	3.83	0.42
Origen*Daño	1	3.65	0.0177
Población [Origen]*Daño	5	10.39	0.06

Al realizar el ANCOVA (tabla 4) se confirma que la diferencia en el número de compuestos emitidos entre poblaciones nativas y no nativas es significativo por efecto del origen y no por el tamaño de la planta (área foliar total).

Tabla 4. ANCOVA del número de COVs en *Datura stramonium*, utilizando como covariable el área foliar total.

	Fuente de variación	g.l.	S.C	F	p
	Origen	1	19.69	19.54	<0.0001
TOTAL	Daño	1	0.68	0.67	0.41
	Daño*Origen	1	7.22	7.16	0.0094
	Area	1	1.61	1.60	0.21

Análisis de diversidad alfa entre plantas con daño y sin daño de poblaciones nativas y no nativas de D. stramonium

Al realizar los análisis de riqueza, abundancia y diversidad de COVs para ambos orígenes en plantas con y sin daño foliar, las poblaciones nativas sin daño foliar presentaron una riqueza de COVs mayor en comparación con los otros grupos (NCD, NNSD Y NNCD), los valores más bajos fueron para las poblaciones no nativas con y sin daño foliar (Tabla 3).

Tabla 5. Índices de diversidad alfa de COVs para las poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium*.

Índice	<u>Nativas</u>		<u>No Nativas</u>	
	sin daño	con daño	sin daño	con daño
Riqueza (S)	10	9	8	8
Simpson	0.28	0.37	0.79	0.75
Shannon- Wiener (H')	1.53	1.35	0.53	0.61
Shannon Max	1	0.95	0.90	0.90
Pielou	0.67	0.61	0.25	0.29
Berger-Parker	0.4	0.56	0.88	0.86

Los gráficos de acumulación de especies químicas de COVs muestran que para los grupos NCD, NSD Y NNCD se alcanzó el número de compuestos esperado con el número de muestras analizadas (dada por la unión de las 3 líneas graficadas: observado, máximo modelado y mínimo modelado por Mao Taus). En contraste, en el caso de las poblaciones

no nativas sin daño foliar, no se alcanzó el número de compuestos requerido, lo que sugiere que estas plantas presentan una riqueza mayor de volátiles constitutivos que no fue posible caracterizar en este estudio (Figura 7).

Al evaluar el índice de Simpson, Pielou y Berger- Parker, podemos ver que para el caso de las poblaciones nativas la dominancia de compuestos fue baja y la equitatividad es alta, lo que significa que la emisión de todos los compuestos es similar. Por contrario, para el caso de poblaciones no nativas con y sin daño la dominancia fue alta y la equitatividad es baja, lo que se traduce en que hay COVs que fueron predominantes, es decir, son más abundantes que otros. Una forma de visualizar gráficamente estos índices es con las curvas de abundancia relativa (Figura 8). En el análisis de diversidad, las poblaciones nativas sin daño foliar presentaron el valor más alto de H' y Shannon max, el valor más bajo de diversidad fue para las poblaciones no nativas sin daño foliar. Al comparar los valores de H' con el estadístico t de Hutchenson entre poblaciones nativas sin y con daño foliar, el valor del estadístico fue significativamente distinto ($t_{2643.8} = 4.70; p < 0.001$) lo que indica que la diversidad-abundancia de COVs es mayor en las poblaciones nativas sin daño foliar, asimismo al comparar poblaciones nativas y no nativas sin daño foliar ($t_{3286.7} = -1.28; p = 0.06$). ($t_{3036.2} = 25.96; p < 0.0001$) y poblaciones nativas y no nativas con daño foliar $t_{2951.1} = 17.71; < 0.0001$). Para el caso de las poblaciones no nativas sin y con daño no hubo diferencia significativa ($t_{3286.7} = -1.28; p = 0.06$). ($t_{3036.2} = 25.96; p < 0.0001$) (Tabla 4),

por lo tanto, se cumple la hipótesis nula donde la diversidad-abundancia de COVs es igual entre ambos grupos.

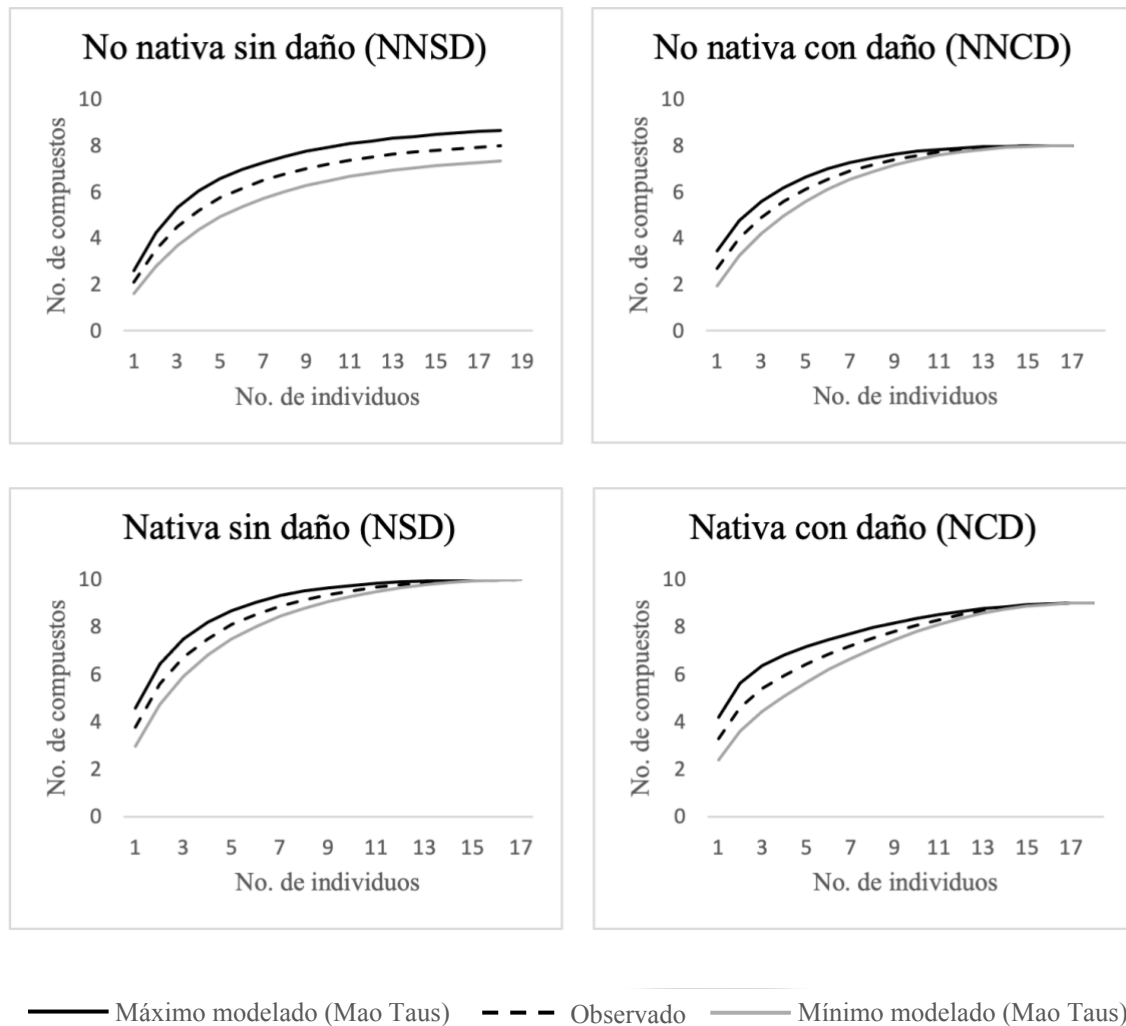


Figura 7. Para el caso de las poblaciones nativas sin daño, nativas con daño y no nativas con daño se alcanzó el número de COVs esperados con el número de plantas muestreadas. Para el caso de las poblaciones no nativas sin daño, no se logró cubrir el número de COVs esperados, lo que supone que estas poblaciones presentan una riqueza mayor de COVs.

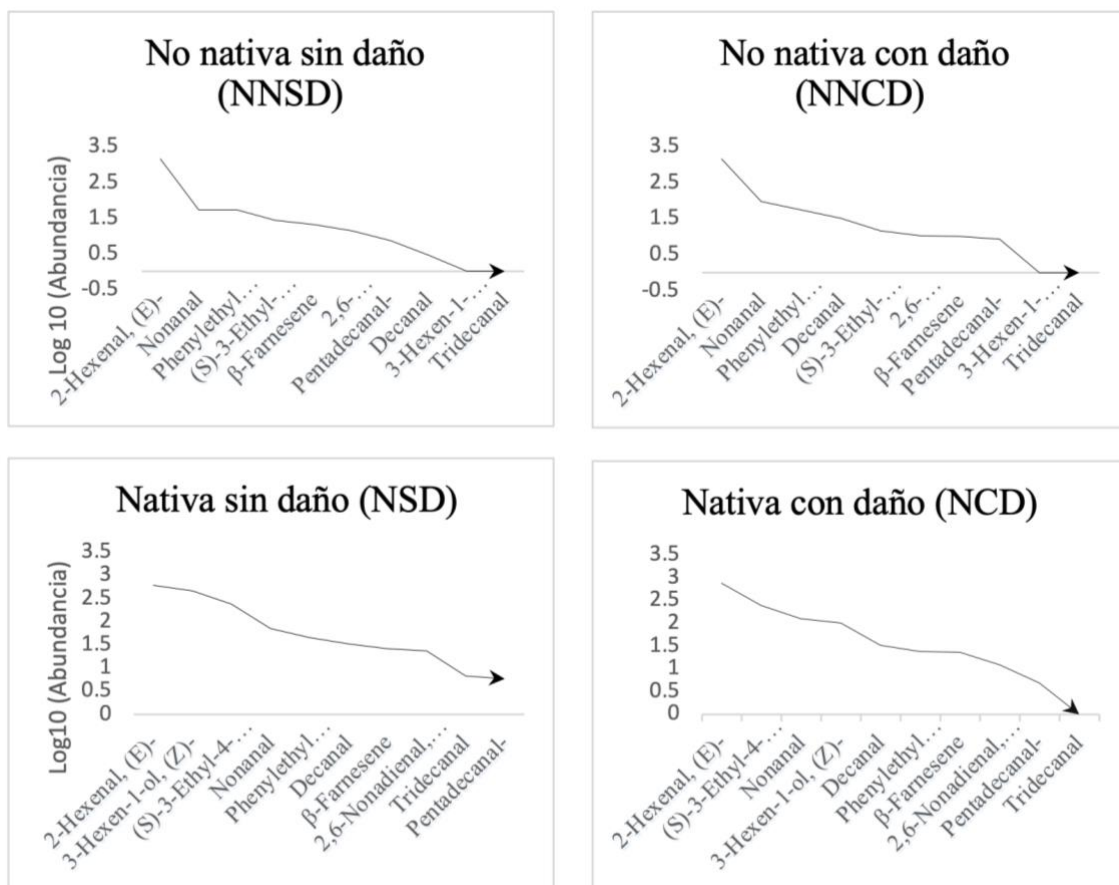


Figura 8. Las curvas de abundancia relativa muestran que en las poblaciones NSD, NCD, NNSD y NNCD el compuesto que mostró las emisiones más altas fue el 2-Hexenal, por el contrario los compuestos emitidos en cantidades bajas fue el Tridecanal, el Pentadecanal y el Decanal. En cantidades intermedias se encuentran el nonanal, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, Phenylethyl Alcohol, β -farnesene y el 2,6-Nonadienal, (E,E)-. Se aprecia también la dominancia de COVs siendo baja para poblaciones nativas y alta en poblaciones no nativas.

Tabla 6. Valores de H' y su análisis con el estadígrafo t de Hutchenson al comparar la diversidad de COVs entre combinaciones de grupos (NCD-NCD, NNSD-NNCD, NSD-NNSD-NCD y NCD-NNCD).

Tratamiento	H'	Varianza	t	$g.l.$	p
NSD	1.53	0.00058	4.70	2643.8	< 0.0001
NCD	1.35	0.00087			
NNSD	0.53	0.00088	-1.28	3286.7	0.06
NNCD	0.61	0.00087			
NSD	1.53	0.00058	25.96	3036.2	< 0.0001
NNSD	0.53	0.00088			
NCD	1.35	0.00087	17.71	2951.1	< 0.0001
NNCD	0.61	0.00087			

Análisis semicuantitativo de VOCs presentes en poblaciones nativas y no nativas de D. stramonium

Se contraron diferencias significativas al comparar el área relativa bajo la curva de todos los compuestos entre ambos tratamientos y orígeneslos cuando se consideró como variable explicativa cada COV (Figura 9; Tabla 8). Por tanto, cantidad emitida de volátiles difirió significativamente entre compuestos para cada grupo (Tabla 8). El 2-Hexenal y el 3-Hexen-1-ol fueron los volátiles que fueron emitidos en mayor cantidad. El β -farnesene, el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, Phenylethyl Alcohol, Nonanal y el 2,6-Nonadienal mostraron valores intermedios. El Decanal, Pentadecanal y el Tridecanal fueron los compuestos que fueron emitidos en menor cantidad (Figura 9).

Sin embargo, al evaluar individualmente la emisión de cada compuesto, considerando el grupo como variable explicativa (NNSD, NNCD, NSD y NCD) el análisis de varianza no detectó diferencias significativas (Anexo 3, Tabla 3). Es decir, la emisión de COVs no aumentó y/o disminuyó significativamente en plantas con daño foliar en comparación con las plantas control (Figura 10).

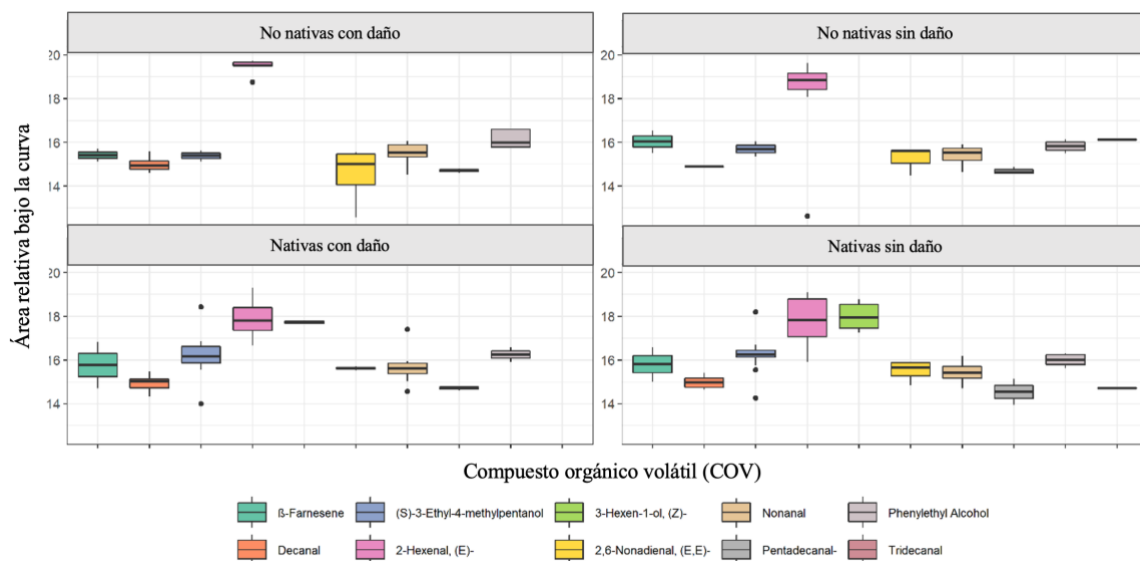


Figura 9. Semi cuantificación de compuestos orgánicos volátiles presentes en las poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium*. Las unidades de area bajo la curva fueron transformadas con la función logaritmo natural, siendo ahora consideradas “unidades arbitrarias”. Tratamientos: Plantas no nativas con daño (NNCD), plantas no nativas sin daño (NNSD), plantas nativas con daño (NCD), plantas nativas sin daño (NSD).

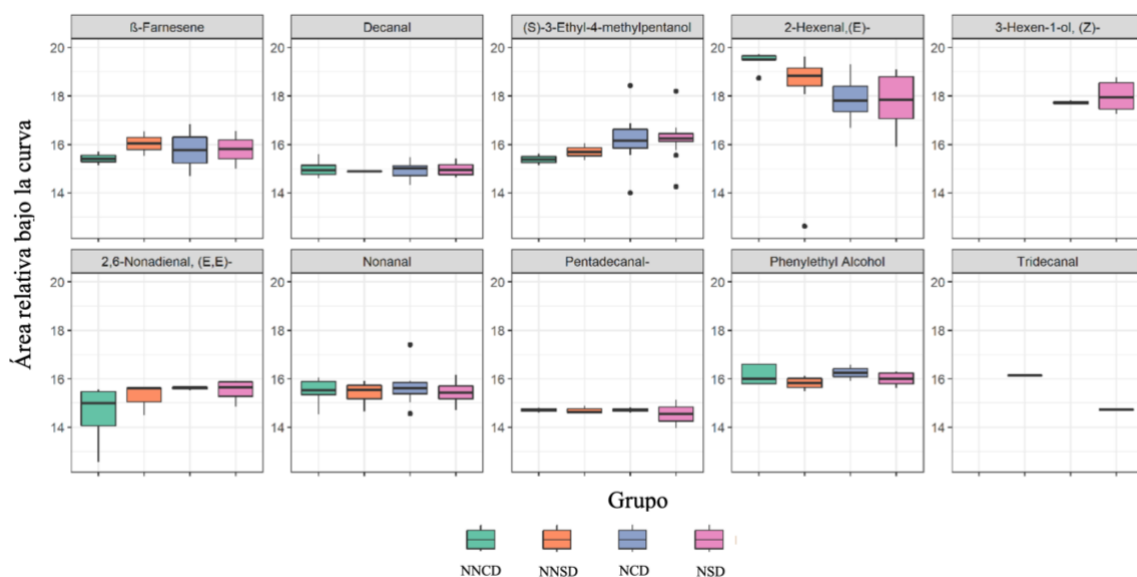


Figura 10. Semi cuantificación de los 10 compuestos orgánicos volátiles de *D. stramonium* en los 4 escenarios: Plantas no nativas con daño (NNCD), plantas no nativas sin daño (NNSD), plantas nativas con daño, plantas nativas sin daño (NSD). Valores transformados con la función logaritmo natural.

Tabla 7. ANOVAs para el área relativa bajo la curva (en unidades arbitrarias) de cada compuesto en función del origen y tratamiento.

Tratamiento	Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	p
Nativa sin daño	Abundancia por compuesto	9	68.62	7.625	17.18	0.001
	Residuales	57	25.3	0.444		
Nativa con daño	Abundancia por compuesto	7	85.26	12.18	46.81	0.001
	Residuales	40	10.41	0.26		
No nativa sin daño	Abundancia por compuesto	8	54.29	6.786	5.229	0.001
	Residuales	31	40.23	1.298		
No nativa con daño	Abundancia por compuesto	7	85.26	12.18	46.81	0.001
	Residuales	40	10.41	0.26		

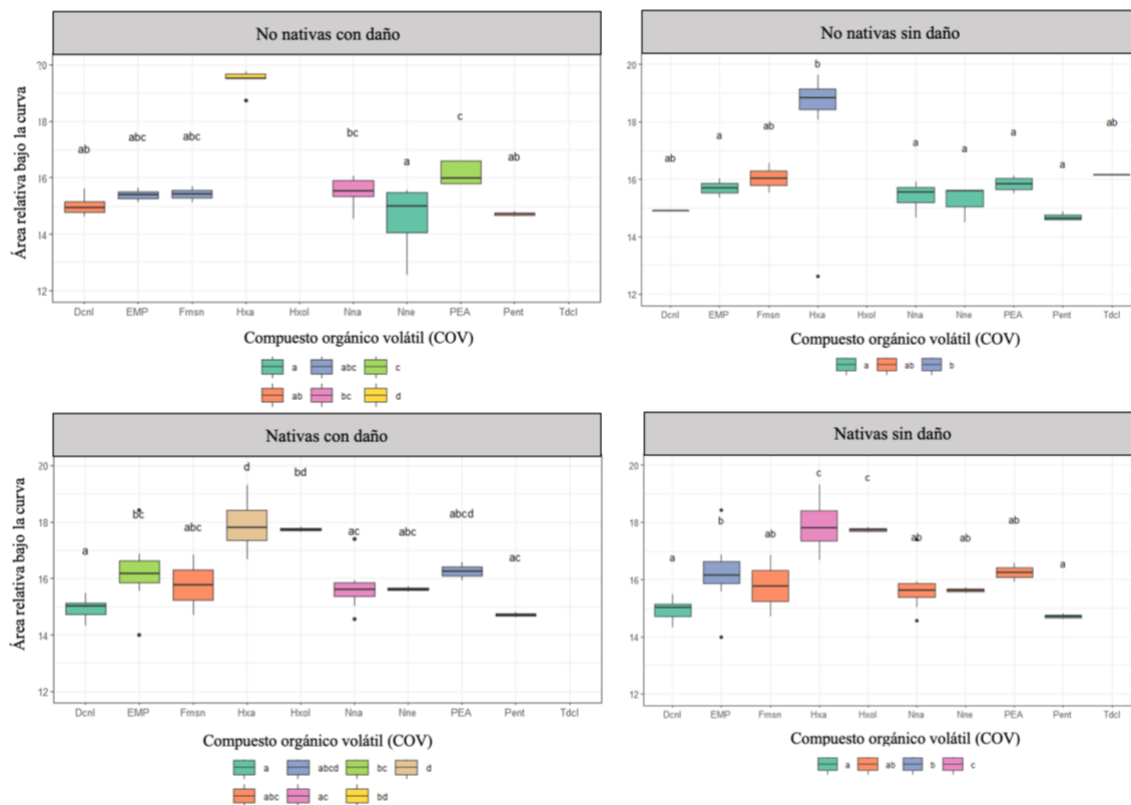


Figura 11. Prueba de Tukey sobre boxplot de la abundancia relativa (concentración) de los COVs encontrados en **i) poblaciones no nativas con daño.** El grupo verde oscuro (a) está conformado por el 2,6-Nonadienal; el grupo naranja (ab) por el Decanal y Pentadecanal; el grupo morado (abc) por el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol y β -farnesene; el grupo rosa (bc) por el Nonanal, el grupo verde claro (c) por el Phenylethyl Alcohol y el grupo amarillo (d) por el 2-Hexenal; **ii) poblaciones no nativas sin daño:** el grupo verde oscuro (a) está constituido por el E)-, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, Nonanal, 2,6-Nonadienal, Phenylethyl Alcohol y el Pentadecanal; el grupo naranja (ab) por el Decanal, β -farnesene y Tridecanal; el último grupo, color morado (b) está conformado por el 2-Hexenal; **iii) poblaciones nativas con daño:** el grupo verde oscuro (a) está conformado por el Decanal; el grupo verde claro (bc) por el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol; el grupo naranja (abc) por el β -farnesene y el 2,6-Nonadienal, (E,E)-; el grupo café (d) por el 2-Hexenal; el grupo amarillo (bd) por el 3-Hexen-1-ol, (Z); el grupo rosa (ac) por el Nonanal y pentadecanal; por último, el grupo morado (abcd) está constituido por el Phenylethyl Alcohol y **iiii) poblaciones nativas sin daño:** el grupo verde oscuro (a) está integrado por el Decanal y Pentadecanal; el grupo morado (b) por el (E)-, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol; el grupo naranja (ab) por el β -farnesene, Nonanal, 2,6-Nonadienal, (E,E)- y Phenylethyl Alcohol; por último, el grupo rosa (c) contiene al 2-Hexenal y 3-Hexen-1-ol, (Z).

Al evaluar la emisión de los COVs totales entre cada grupo (NSD, NCD, NNSD, y ECD), se obtuvieron resultados significativos en las pruebas de ANOVA, por tanto, se realizó la prueba de Tukey sobre gráficos de diagrama de caja (Fig. 10). A nivel general se observa que, en las plantas de poblaciones no nativas y nativas sin daño foliar los COVs se comportan de manera similar, ya que están agrupados en menor medida (alta homogeneidad en la cantidad de compuestos volátiles emitidos), pero, en plantas de poblaciones nativas y no nativas con daño foliar los grupos se diversifican (disminuye la homogeneidad y la cantidad emitida de compuestos volátiles se vuelve más heterogénea). Para los 4 grupos, el 2-Hexenal fue el compuesto que se diferencia sustancialmente de los demás COVs emitidos. Estos resultados sugieren que el daño foliar influye en el cambio de las cantidades emitidas de COVs en ambos orígenes.

Al analizar los COVs a nivel individual con la prueba de Tukey, para las poblaciones nativas sin daño se aprecia que no hay diferencias significativas entre el Decanal y el Pentadecanal; entre el β -farnesene, Nonanal, 2,6-Nonadienal y el Phenylethyl Alcohol (siendo este el grupo homogéneo más grande conformado por 4 COVs) y entre el 2-Hexenal y el 3-Hexen-1-ol. El compuesto que fue significativamente distinto a todos los demás COVs fue el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol (Figura 11). Para las poblaciones nativas con daño foliar los grupos se diversifican y aumentan a siete. No se encontraron diferencias significativas entre el β -farnesene y el 2,6-Nonadienal y entre el Nonanal y el Pentadecanal. El decanal y el 2-Hexenal son los COVs que no se comportan como algún otro compuesto en su emisión (Figura 12).

En el caso de las poblaciones no nativas sin daño foliar también mostraron una baja agrupación, al conformarse sólo tres grupos. No se observaron diferencias significativas entre el Decanal, el β -farnesene y el Tridecanal; el grupo más homogéneo fue el conformado por el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, el Nonanal, el 2,6-Nonadienal, el Phenylethyl Alcohol y el Pentadecanal donde tampoco se observaron diferencias significativas. El 2-Hexenal fue el único compuesto que se emitió en cantidades significativamente mayores al resto. Por último, para el caso de las poblaciones no nativas con daño foliar, también hubo un incremento en el número de grupos en comparación de las poblaciones sin daño foliar, conformándose seis. Siendo el 2-Hexenal (emitido en mayor cantidad) y el Phenylethyl Alcohol (emitido en cantidades medias) los únicos compuestos significativamente diferentes a los demás compuestos emitidos (Figura 14).çç

VIII. Discusión

Actualmente, la expansión de especies exóticas invasoras sugiere la existencia de mecanismos de adaptación que brindan una ventaja sobre las especies nativas y una mayor resistencia a presiones selectivas como la herbivoría. Algunos de estos mecanismos pueden implicar una flexibilidad bioquímica que permite una mejor adaptación a diferentes hábitats (Skubel *et al.*, 2020). Para el caso de *D. stramonium* las especies nativas han coevolucionado con patógenos naturales y herbívoros (tanto especialistas como generalistas), los cuales controlan su densidad y distribución (Núñez-Farfán, 1991); en este ambiente se ha reportado también la presencia de parasitoides asociados al especialista *L. daturaphila* y *T. soror* (Villanueva, 2019) que probablemente también controla sus poblaciones. El nivel de daño foliar causado por estos insectos herbívoros es diferente entre orígenes (México y España); las poblaciones no nativas experimentan en promedio menor nivel de daño en comparación a las poblaciones mexicanas siendo de 2.5 % y 50.3% respectivamente (Valverde *et al.* 2015). En *D. stramonium* los alcaloides han sido considerados defensas químicas que pueden actuar contra insectos herbívoros generalistas y/o especialistas; se ha reportado que la producción de alcaloides también varía entre orígenes; las poblaciones nativas producen alrededor de 20 a 40 veces más alcaloides que las poblaciones del rango no nativo, esto apoya la hipótesis de que una reducción de caracteres de defensa ante la ausencia o disminución de enemigos naturales es mediada por la selección natural (Castillo *et al.*, 2019). Por tanto, siguiendo uno de los aspectos centrales de la teoría de la invasión, la liberación de enemigos naturales en el ambiente no nativo debería cambiar las presiones de selección en los caracteres defensivos de las plantas no nativas, resultando en una divergencia fenotípica (Castillo *et al.*, 2019). Bajo este escenario nos planteamos la siguiente pregunta: Si como se reporta en Villanueva (2019), los COVs tienen un papel en la defensa indirecta atrayendo a los parasitoides de *L. daturaphila*, herbívoro nativo especialista de *D. stramonium*, ¿Cuáles son los COVs presentes en poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium*?, si dichos COVs están implicados en la defensa contra insectos herbívoros y la atracción de parasitoides, ¿Cambiaría la diversidad y cantidades emitidas en poblaciones nativas en comparación con las poblaciones no nativas donde las presiones de selección por herbivoría son débiles o inexistentes?

Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar otro tipo de defensa química para *D. stramonium*, como es el caso de los compuestos orgánicos volátiles (los cuales pueden ser constitutivos y/o inducibles por herbivoría) y analizar si existen diferencias entre la mezcla de COVs emitida entre las poblaciones nativas y no nativas al producir daño mecánico.

Los diez COVs encontrados en nuestro estudio para *D. stramonium* (Figura 15) han sido reportados previamente por sus funciones en la interacción planta-herbívoro-parasitoide en *D. stramonium* y otros sistemas de estudio. El (Z)-hex-3-en-1-ol está reportado por ser un GLV (Green-leaf volátiles) que participa en la defensa indirecta de las plantas. Para el caso de las solanáceas, en un estudio realizado por Schuman y colaboradores (2012), el (Z)-hex-3-en-1-ol incrementó la depredación de *Manduca* spp (Lepidoptera: Sphingidae). sobre *Geocoris* (Hemiptera: Geocoridae) lo que se tradujo en un aumento de la adecuación de *Nicotiana attenuata* en su ambiente nativo, demostrando que las plantas que emiten GLVs tienen mayor adecuación que las plantas que no los producen. En otro estudio, al exponer a *Brassica rapa* con herbívoros generalistas nativos y exóticos se indujo una mayor producción de (Z)-hex-3-en-1-ol con herbívoros nativos (Danner *et al.*, 2018). Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados, ya que, este compuesto fue encontrado únicamente en poblaciones nativas, lo que sugeriría que su emisión se ve favorecida bajo presiones constantes de herbivoría como las que ejercen los herbívoros generalistas y especialistas en ambientes nativos. La cantidad emitida fue similar entre plantas con y sin daño, no se reportó un incremento y/o disminución en la emisión de este compuesto en plantas con daño foliar.

El compuesto 2-Hexenal, (E)-, considerado un GLV, está reportado en la bibliografía como uno de los compuestos principales que son liberados por las plantas tras el daño foliar. Engelberth y colaboradores (2020) en un estudio realizado con 50 especies de plantas distintas sugieren que el 2-Hexenal, (E)-, es el principal GLV producido particularmente en aquellas plantas que son “altamente emisoras de volátiles” como son *Vigna radiata*, *Momordica charantia*, *Bryonia dioica*, *Cucumis sativa*, y *Ruellia simplex*. En nuestro estudio, este compuesto fue encontrado tanto en poblaciones nativas como no nativas con y sin daño foliar, lo que sugeriría que para *D. stramonium* se trata de un volátil constitutivo, además de ser el compuesto emitido en mayores cantidades para todas los grupos. Se ha reportado que los GLVs desempeñan un papel esencial en la respuesta contra la herbivoría, ya que las plantas y tejidos que han sido dañados liberan casi

instantáneamente GLVs en grandes cantidades, convirtiendo a los GLVs ideales mensajeros químicos para las plantas vecinas (Engelberth y Engelberth, 2020) o pueden producirse también de manera sistémica en respuesta al daño por herbivoría. Entonces, además de ser inductores de defensas, también preparan a la planta (“priming”) para que responda de forma acelerada y/o aumentada a un ataque por herbivoría (Scala *et al.*, 2013). Además, se sabe que los aldehídos son producidos principalmente por células dañadas, y los compuestos siguientes como alcoholes y ésteres son producidos por las células vecinas intactas (Engelberth y Engelberth, 2020).

Se detectó también la presencia del sesquiterpeno β -farnesene. Un gran número de terpenos actúan como toxinas contra insectos y patógenos, siendo los sesquiterpenos el grupo más abundante (Dudareva, 2007). Los sesquiterpenos volátiles están involucrados en la defensa de las plantas y son inducidos por herbivoría o infección por patógenos (Liu *et al.*, 2021; Kessler y Baldwin, 2001; Badra *et al.*, 2021), además de ser uno de los principales grupos reportados como defensa química en plantas invasoras como *Eupatorium adenophorum* (Liu *et al.*, 2021). En el caso particular de *D. stramonium*, este compuesto también está en ambos orígenes en plantas con y sin daño foliar y es emitido en cantidades intermedias. Los terpenoides ya han sido reportados en *D. stramonium*. En un estudio realizado por De la Cruz y colaboradores (2021) con poblaciones experimentales nativas de *D. stramonium* identificaron un compuesto triterpenoide implicado como defensa contra el herbívoro especialista que causa mayor cantidad de daño foliar a la especie, las larvas de *Lema daturaphila* (Chrysomelidae).

El decanal también fue detectado en este estudio y está reportado como HIPV por reforzar las interacciones tritróficas al mejorar la atracción de parasitoides y relacionado por participar en la respuesta a ataque por plagas, como áfidos (Ali *et al.*, 2022; Badra *et al.*, 2021). En un estudio realizado por Martins y colaboradores (2017), al comparar distintos tratamientos (control, daño mecánico y los herbívoros *Thelesia camina* y *Hedypathes betulinus*) en la especie *Ilex paraguarensis*, el decanal fue el compuesto mejor representado en plantas con daño mecánico y plantas control. Esto sugiere que el decanal pudiera estar implicado en la defensa constitutiva, ya que estuvo presente en plantas antes de recibir daño mecánico o por herbivoría. Sin embargo, en otras especies como *Trifolium pratense* se ha reportado que en condiciones de campo los niveles de decanal han aumentado después de la herbivoría (Kigathi *et al.*, 2009). En *D. stramonium*, el decanal fue de los compuestos más frecuentes encontrado en plantas con daño y sin daño mecánico

en poblaciones nativas y no nativas, pero sus emisiones no difirieron significativamente entre tratamientos. Otro aldehído identificado, el nonanal, ha sido asociado a la defensa y también es catalogado como HIPV (Badra *et al.*, 2021); además que se ha observado que es comúnmente liberado en conjunto con otros compuestos como el decanal; en este estudio, ambos compuestos se encontraron en todas las poblaciones en plantas con daño y sin daño foliar y estuvieron presentes en conjunto como han reportado estudios previos. En otro estudio bajo condiciones de campo, ha disminuido sus niveles después del daño foliar por herbivoría (Kigathi *et al.*, 2009), pero ha aumentado su expresión después de la infestación por áfidos (Badra *et al.*, 2021). También ha sido reportado por estar presente en plantas control y plantas infestadas, sin embargo, Anastasaki (2018) reporta que las hembras de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) no respondieron a la emisión de este compuesto (Anastasaki, 2018), pero sí a la emisión del (z)-3-hexen-1-ol, también encontrado en *D. stramonium*. Además, en otro estudio las altas concentraciones de nonanal estuvieron correlacionadas positivamente con una mayor presencia de avispas parasitoides y con bajas concentraciones de β -farnesene. Aquí, las emisiones de nonanal fueron mayores que las emisiones de decanal en todas las poblaciones y tratamientos. Por tanto, el decanal, nonanal y β -farnesene son compuestos clave que contribuyen al atractivo de la mezcla volátil total, como se ha observado en experimentos con plantas de algodón que atraen al parasitoide *Microplitis croceipes* al ser atacadas por orugas de *Heliothis virescens* (Morawo y Fadamiro, 2016). Por último, Danner y colaboradores (2018) reporta que el decanal y nonanal, fueron emitidos en cantidades significativamente mayores al exponer a plantas de *Brassica rapa* a herbívoros nativos en comparación con herbívoros exóticos.

El phenylethyl alcohol (feniletilo alcohol) es otro HIPVs ampliamente conocido por participar en la interacción tritrófica e influir en el comportamiento de la comunidad de artrópodos (Braasch y Kaplan 2012; Braasch *et al.*, 2012), en este trabajo, se sugiere que podría ser un volátil constitutivo ya que estuvo presente en cantidades intermedias en todas las poblaciones y tratamientos. Por otra parte, el compuesto 2,6-Nonadienal, (E,E), compuesto derivado del nonanal, ha sido reportado por atraer insectos herbívoros generalistas, como es el caso de las hembras adultas de *Aulacophora foveicollis* (Coleóptera: Chrysomelidae) una plaga que ataca a las plantas de *Solena amplexicaulis*; donde se ha reportado que las emisiones del 2,6-Nonadienal, (E,E) aumentan en frutos que han sido dañados (4 hrs posterior al daño) en comparación con los frutos sin daño

(Karmakar, 2020). Para *D. stramonium*, posiblemente se trate de un volátil constitutivo con concentraciones bajas en la mezcla total de volátiles.

El tridecanal y pentadecanal han sido menos estudiados. En un estudio con plantas de *Ipomoea batatas* al aplicar daño mecánico y daño por el herbívoro *Spodoptera littoralis* se detectó la emisión de 40 volátiles en las hojas, entre ellos el pentadecanal y tridecanal, por lo que se sugiere que ambos compuestos podrían ser HIPVs y estar asociados a funciones defensivas en plantas (Meents *et al.*, 2019). En nuestras poblaciones de *D. stramonium*, el pentadecanal fue emitido en bajas concentraciones en todas las poblaciones y tratamientos, y el tridecanal sólo estuvo presente en bajas concentraciones en plantas sin daño foliar de origen nativo.

Por último, el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol también se encontró en todas las poblaciones y tratamientos en cantidades intermedias, a este compuesto se le han atribuido distintos usos, pero en plantas de *Coffea arabica* se sugiere que la combinación del (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol con otros volátiles incrementa la atracción de herbívoros (Mendesil *et al.*, 2009). Los estudios descritos anteriormente también advierten que el papel de un compuesto se evalúa mejor en el contexto de otros compuestos, y las mezclas de volátiles se perciben mejor en conjunto que como componentes individuales.

Es importante mencionar que, la inducción de volátiles responde a distintos factores asociados al tipo de daño foliar, así, la producción y tipo de volátil varía según las características del herbívoro (nativos, exóticos, especialistas, generalistas, masticadores, consumidores de savia, entre otros) o cuando se infringe daño mecánico (Rowen y Kaplan, 2016; Baustista-Lozada y Espinoza-García, 2013; Villanueva, 2019, Lin *et al.*, 2021). Por tanto, los resultados mostrados a continuación son una primera aproximación a lo que ocurre en la emisión de COVs de poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium* simulando el daño por herbívoros con daño mecánico.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Villanueva (2022) donde, para el caso de poblaciones nativas de *D. stramonium* que fueron sometidas a distintos tratamientos por herbivoría (especialistas: Huevos, larvas y adultos de *L. daturaphila*; generalistas: Adultos de *Sphenarium purpurescens*; daño mecánico; herbívoros generalistas + especialistas y plantas control) se encontraron 5 COVs en común, los cuales son: nonanal, decanal, (Z)-hex-3-en-1-ol, 2-Hexenal, (E)- y el (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol. De estos compuestos, a excepción del decanal todos fueron detectados en plantas sin daño foliar lo que sugiere que estos compuestos podrían considerarse constitutivos para *D. stramonium*.

Además, el 2-Hexenal, (E)- fue también el compuesto emitido en mayores cantidades, seguido del (Z)-hex-3-en-1-ol.

Análisis de diversidad alfa entre plantas con daño y sin daño de poblaciones nativas y no nativas de D. stramonium

Al evaluar el índice de riqueza de especies químicas de COVs, las poblaciones nativas sin daño mostraron una mayor cantidad de COVs, seguidas de las poblaciones nativas con daño. Para el caso de las poblaciones no nativas con y sin daño foliar, la riqueza de COVs fue igual, así como los COVs encontrados. Con el índice de Shannon, contrario a lo esperado, se observó un patrón interesante, debido a que las poblaciones nativas mostraron los valores más altos de diversidad-abundancia, seguidas de las poblaciones no nativas con daño y, con el valor más bajo se encontraron las poblaciones no nativas sin daño; lo que contradice a lo predicho por expectativa de que plantas de poblaciones nativas liberarán menores cantidades de volátiles constitutivos para evitar la detección por herbívoros especialistas y liberarán mayores cantidades de HIPVs que atraigan a los parasitoides (Lin *et al*, 2019). Otro aspecto interesante, es que los índices de dominancia y equidad de COVs demuestran que para las poblaciones nativas (NSD Y NCD), la dominancia de compuestos fue baja, por tanto, los COVs presentes están siendo emitidos más equitativamente que en el resto de los grupos. Caso contrario ocurrió en poblaciones no nativas (NNSD Y NNCD), en las cuales la dominancia de compuestos fue alta, siendo el 2-Hexenal y el nonanal los compuestos emitidos en mayores cantidades con respecto a los demás; lo que se traduce en una mayor cantidad de compuestos (mayor riqueza) emitidos en cantidades similares para el rango nativo y una menor cantidad de compuestos (menor riqueza) donde algunos se emiten en cantidades mayores con respecto a los demás COVs para el rango no nativo; de ser así, una pregunta para futuros estudios sería probar si, ¿una mayor riqueza de COVs estará ligada a una baja dominancia y una riqueza menor favoreciendo la dominancia de algunos COVs?. No obstante, los gráficos de acumulación de especies químicas de COVs indican que para el caso de las poblaciones no nativas sin daño, el número de COVs presentes en estas poblaciones no fue detectado en su totalidad, si a esto le sumamos que estas poblaciones obtuvieron el valor más bajo en riqueza de especies químicas de COVs, quedaría la pregunta abierta para futuros estudios, ¿Realmente, las poblaciones provenientes de España, tendrían una riqueza mayor de COVs en comparación con las poblaciones nativas en plantas sin daño foliar que no pudo ser muestreada en este estudio?.

El índice de Shannon nos dio información sobre la riqueza-abundancia presente en los grupos; al evaluar si la diversidad de compuestos fue diferente entre grupos se encontró que el perfil de COVs emitidos es distinto entre a) poblaciones nativas sin daño y nativas con daño b) poblaciones nativas sin daño y poblaciones no nativas sin daño y c) poblaciones nativas con daño y no nativas. En contraste, no hubo una diferencia significativa entre poblaciones no nativas con y sin daño mecánico. Por otra parte, con el modelo linear generalizado se determinó que la cantidad de COVs emitidos de *D. stramonium* está explicado por la variable origen y origen*tratamiento de daño mecánico; el daño mecánico por sí solo y la población no explican esta variación; lo que nos daría evidencia que, la evolución de los volátiles en plantas está mediada por su papel en la defensa directa e indirecta contra insectos herbívoros.

Análisis semicuantitativo de COVs presentes en poblaciones nativas y no nativas de D. stramonium

Los compuestos volátiles fueron emitidos en cantidades significativamente distintas en la mezcla volátil total de cada planta, tanto para las poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium*. Al aplicar la prueba de Tukey, en plantas nativas y no nativas sin daño mecánico los compuestos se agrupan en menor cantidad, es decir, los COVs están siendo emitidos en cantidades similares. Sin embargo, en plantas nativas y no nativas con daño foliar los grupos conformados se diversifican. Esto sugiere que, en plantas que han sido dañadas mecánicamente los COVs difieren entre ellos en su emisión como es el caso del 2-Hexenal. Los COVs que fueron emitidos sustancialmente distinto con respecto a los demás en a) NSD: es el E)-, (S)-3-Ethyl-4-methylpentanol, emitido en cantidades medias; b) NCD: son el Decanal (emitido en baja cantidad) y 2-Hexenal (el compuesto emitido en mayor cantidad); esta diferenciación del decanal en plantas con daño mecánico podría explicarse debido a su función de atraer parasitoides (Ali *et al.*, 2022) y para el 2-Hexenal por ser de los compuestos liberados por plantas después de recibir daño foliar (priming) (Scala *et al.*, 2013); c) NNSD: es el 2-Hexenal (emitido en mayor cantidad con respecto al resto de los COVs) y d) NNCD: el 2-Hexenal (emitido en mayor cantidad) y el 2,6-Nonadienal, (E,E).

De acuerdo con la hipótesis de EICA, se espera que las poblaciones nativas de una especie presenten mayor cantidad de metabolitos “prefabricados” o de fácil producción actuando a bajas concentraciones, mientras que en el ambiente no nativo se espera que las plantas

sean capaces de incrementar las concentraciones de metabolitos, específicamente contra insectos generalistas. Esto coincide con nuestros resultados, ya que, para el caso de nuestra especie, la dominancia de COVs fue baja en el ambiente nativo, lo que apoya la idea que en México, los compuestos volátiles se emiten en cantidades medias-bajas; mientras que en el ambiente no nativo podría verse favorecido un incremento en la emisión de ciertos compuestos. Esto puede apreciarse claramente con el compuesto 2-Hexenal, el cuál alcanzó una mayor cantidad emitida en plantas no nativas con y sin daño foliar en comparación con otros compuestos. Villanueva (2022) reporta este compuesto para plantas nativas que fueron dañadas por herbívoros generalistas o en combinación de daño por herbívoros generalistas + especialistas. Por tanto, de acuerdo con nuestras hipótesis se esperaría que, en el ambiente nativo, las altas presiones de selección por herbivoría conducirían a disminuir la liberación de volátiles constitutivos para evitar la detección por insectos especialistas y de aumentar la liberación de HIPVs que atraigan a los parasitoides, así, en el ambiente no nativo donde los insectos especialistas y sus parasitoides no están presentes, se favorecería un aumento en la producción de volátiles constitutivos que actúen contra insectos herbívoros generalistas; sin embargo, en este estudio, no hubo liberación de compuestos nuevos en plantas con daño mecánico de los previamente encontrados en poblaciones sin daño mecánico, en otras palabras, las plantas nativas sin daño tienen una riqueza mayor de COVs; las cantidades de COVs emitidas tampoco difirieron significativamente entre los grupos; por lo que, la emisión de cada COV parece ser similar entre orígenes. Pero, si bien no hubo un cambio al comparar a los cuatro grupos, si hubo un cambio significativo al analizar cada COV entre grupo, además que, en plantas no nativas hay COVs más dominantes con respecto al resto, donde la dominancia del 2-Hexenal podría ser un indicio que este compuesto actúan contra insectos generalistas y por tanto, la selección ha favorecido su producción. Al igual que los alcaloides, otros metabolitos secundarios como los COVs están involucrados en la defensa contra insectos generalistas y se espera un incremento en su producción en el ambiente introducido (Castillo *et al.*, 2019).

HIPVs y su función en la defensa contra insectos herbívoros en poblaciones nativas y no nativas .

Para explicar la evolución de los compuestos volátiles en plantas como defensa directa o indirecta *contra* insectos herbívoros han surgido diversas teorías, como la existencia de

una señal de “grito de ayuda” donde, al ser atacada por herbívoros, se recurre a los enemigos naturales (Dicke, 2009), los cuales desempeñan una función de “guardaespaldas” para la planta (Rosenkranz y Schnitzler, 2016). Diversos estudios han demostrado el papel defensivo de los HIPVs y su rol en la interacción planta-herbívoro-parasitoide en distintos sistemas de estudio (Danner et al., 2018; Turlings y Erb, 2018; Lin et al., 2021). En el caso específico de poblaciones nativas *D. stramonium* se reporta que la herbivoría y la presencia del herbívoro especialista *Lema daturaphila* inducen la liberación de COVs y por tanto, estos compuestos podrían ser usados por los parasitoides para localizar al huésped (Villanueva, 2022). Sin embargo, si los volátiles han evolucionado para servir como defensa en plantas aún sigue en debate (Lin et al., 2021).

Al estudiar los efectos de los compuestos orgánicos volátiles en las comunidades, trabajos previos (Dicke, 1986; Bernasconi et al., 1998; Kesler y Baldwin, 2001) han comprobado que algunos herbívoros, como la araña roja (ácaros araña), los áfidos o las polillas, son repelidos por los HIPVs, mientras que otros son atraídos, como los escarabajos (Halitschke et al., 2008), los áfidos (van Tol et al., 2009) y las polillas (Rojas, 1999). Así, la infestación de una planta por un herbívoro puede dar como resultado respuestas diferenciales en diferentes miembros de la comunidad (Dicke y Baldwin, 2010). En los estudios realizados con plantas nativas de tabaco (*Nicotiana attenuata*) en el suroeste de EE.UU. (Halitschke et al., 2008; Meldau et al., 2009), reportan que al “silenciar” genéticamente la producción de volátiles de hoja verde (GLVs), componente importante de los HIPVs de *N. attenuata* (Kessler, 2001), se reduce el nivel de herbivoría en estas plantas modificadas cuando se plantan en localidades nativas. Estos resultados hacen hincapié en el “doble filo” de las emisiones de HIPVs (Dicke y Baldwin, 2010). Las consecuencias selectivas netas de liberación de HIPVs para una planta probablemente dependen de la composición de la comunidad de insectos herbívoros asociada a ella, así como de las consecuencias relativas de la adecuación que resultan del ataque de cada uno de estos herbívoros (Poelman et al., 2008).

Para estudiar la variación natural presente en las emisiones de HIPVs, se han utilizado plantas cultivadas, como maíz, tomate, entre otras especies. Diversos estudios (Gouinguene et al., 2001; Kollner et al., 2008; Degen et al., 2004) realizados en cultivos de maíz, gerbera, manzana y algodón han reportado variaciones en las emisiones de HIPVs. Esta variación no sólo es cuantitativa, también hay variación en la composición del perfil metabolómico. Con estos estudios se sugiere que hay variación en las emisiones de HIPVs

entre los diferentes genotipos de plantas. Los primeros estudios que abordaron la variación natural de las emisiones de HIPVs fueron realizados en plantas pertenecientes a la familia de las solanáceas, como *Datura wrightii* (Hare, 2007) o *N. attenuata* (Schuman *et al.*, 2009). Por ejemplo, las *accessiones* obtenidas de plantas de *N. attenuata* ubicadas a < 1 m de distancia en una población nativa de Utah difieren en su composición de HIPVs. Se registró variación para varios terpenos y para un volátil de hoja verde, así como para el perfil total de VOCs detectables. En estos experimentos, se minimizó el efecto de factores ambientales, que pueden modificar la emisión de COVs (como la luz y temperatura), de modo que los resultados obtenidos son probablemente una variación genética (Schuman *et al.*, 2009). Para comprender la importancia evolutiva de los HIPVs, es necesario ampliar los estudios de las variaciones naturales en las emisiones de HIPVs, en términos de cantidad y composición de las emisiones. Estos conocimientos proporcionarán información sobre la gama de variaciones a las que están expuestos otros miembros de la comunidad y tendrán un papel fundamental en la comprensión de las fuerzas selectivas que afectan y modifican las emisiones de HIPVs (Dicke y Baldwin, 2010).

Las defensas contra herbívoros en la familia de las solanáceas pueden ser completamente inducibles o completamente constitutivas. De esta familia, el género *Datura* constituye un excelente modelo para el estudio de la evolución adaptativa de la defensa por la gran variedad de herbívoros especialistas y generalistas (Núñez-Farfán y Dirzo, 1994; Hare *et al.*, 2003), que ejercen distintas presiones de selección en poblaciones naturales (Carmona y Fornoni, 2013). Por ello, se propone la realización de experimentos donde se considere la emisión diferencial de COVs y se cuantifique el éxito reproductivo en *Datura stramonium* para evaluar si la adecuación de las plantas incrementa con la liberación de COVs que atraigan a los enemigos naturales de los herbívoros. Si esta hipótesis es cierta, existe diferenciación genética de los rasgos que mejoran la capacidad competitiva en el ambiente introducido, y éstos son beneficiosos en el nuevo escenario selectivo (Bossdorf *et al.*, 2005), tendríamos más evidencia y mejor comprensión del cambio evolutivo adaptativo en la emisión de metabolitos secundarios (como los alcaloides y terpenoides), en las poblaciones no nativas de *D. stramonium*.

Consideraciones técnicas

Como se describió previamente en los métodos, en este estudio probamos distintos métodos de colecta de COVs: colecta por *push-pull system*, por solvente y por SPME. Cada método tiene sus pros y contras (Tabla 9), en nuestro caso, las muestras colectadas por *push-pull system* no pudieron ser procesadas debido a que se rebasó el tiempo óptimo de almacenamiento. Para el caso de las muestras colectadas con hexano y diclorometano, se obtuvieron resultados preliminares (Anexo 4, Tabla A4; Anexo 5, Tabla A5) en los cuales se obtuvieron compuestos distintos a los encontrados por SPME, entre los que destaca la presencia del D-Limonene, un compuesto volátil ampliamente estudiado. Con esto, se sugiere la realización de estudios futuros bajo condiciones *in situ* o en invernadero que incluyan diversas técnicas de colecta y factores clave como el tiempo, ya que esto podría ocasionar que no se observe un cambio en los perfiles metabolómicos en plantas con o sin daño como reportan algunos estudios. Además, es importante considerar que la emisión de volátiles y su especificidad es desencadenada a partir de la detección de compuestos específicos (elicitores), presentes en las secreciones orales de insectos herbívoros, en secreciones asociadas a sus huevos o en el oviducto de las hembras (Turlings y Erb, 2018, Villanueva, 2022), por lo que, se sugiere la realización de experimentos que consideren la naturaleza del insecto herbívoro.

Tabla 8. Técnicas de colecta de COVs utilizadas en este estudio: ventajas y desventajas.

Método	Ventajas	Desventajas
Headspace	<ul style="list-style-type: none"> -Transfiere todos los volátiles recogidos en la trampa a la columna de CG. -Mayor sensibilidad -Capacidad de observar los metabolitos “más volátiles” 	<ul style="list-style-type: none"> -El tiempo de almacenamiento es variable. -Realizar pruebas para cada especie -Infraestructura -Los volátiles desorbidos sólo pueden medirse una vez
SPME	<ul style="list-style-type: none"> -Pueden utilizarse para preconcentrar volátiles del medio (aire) o de una solución. -Muy buena opción para detectar volátiles -Captura cierto tipo de compuestos de acuerdo con el tipo de fibra elegida. -Método rápido y limpio -No requiere solventes 	<ul style="list-style-type: none"> -Los analitos compiten por sitios de unión en el SPME -“Snapshots” “in situ” al momento del daño -Una sola lectura -No son almacenables -Problemas con la cuantificación
Solvente	<ul style="list-style-type: none"> -Da un perfil más completo de metabolitos incluyendo la representación de especies hidrofílicas polares. -Varias lecturas. -Control interno, corrigen cualquier pérdida de volátiles que se produce durante el proceso de preparación de la muestra. -Almacenamiento fácil de muestras. -La lectura en el CG se automatiza de forma rápida y fiable. 	<ul style="list-style-type: none"> -Es probable que se extraigan materiales no volátiles como ceras foliares, triterpenos, entre otros.

IX. Conclusiones

Se encontraron diez COVs en poblaciones de *D. stramonium*. La riqueza de COVs más alta fue para las poblaciones nativas sin daño, se observó una baja dominancia de compuestos en poblaciones nativas y una alta dominancia del compuesto 2-Hexenal en poblaciones no nativas. No se detectó un cambio significativo entre las cantidades emitidas de compuestos volátiles en *D. stramonium* entre poblaciones nativas y no nativas.

La emisión de COVs por una planta está regulada por múltiples factores abióticos y por la presencia de polinizadores, patógenos, parasitoides, insectos herbívoros, entre otros. Además, si todos estos elementos los contextualizamos en ambientes nativos y no nativos, las presiones de selección ejercida por insectos herbívoros será distinta. Estos cambios, ejercerán presiones de selección distintas sobre las emisiones de compuestos volátiles. En el caso particular de *Datura stramonium*, sería interesante analizar cómo cambian estas emisiones de COVs constitutos y/o inducibles entre plantas nativas y no nativas al exponerlas a insectos nativos y exóticos y si este cambio en inversión de caracteres tiene un impacto en la adecuación de las plantas.

X. Anexos

Anexo 1. Colecta de COVs por filtro de carbono (headspace)

Para la colecta de volátiles, las plantas se encontraban en etapa de floración. Se usaron tres plantas por cada línea, dos plantas con tratamiento de daño foliar y una planta control sin daño foliar. -En invernadero, se colectaron los volátiles emitidos por las plantas de las seis poblaciones de *D. stramonium*. El protocolo utilizado ha sido el establecido en el Laboratorio de Ecología de Plantas, CINVESTAV-Irapuato (Heil *et al.*, 2004; Hernández-Zepeda *et al.*, 2018; Razo-Belman *et al.*, 2018). Después de la colecta de COVs, se analizaron las principales diferencias de los perfiles de los COVs emitidos por *D. stramonium* ante el daño mecánico.

Las plantas de *D. stramonium* (Fig. A1) se cubrieron con una bolsa de folia de PET ('Bratschlauch', Toppits, Minden, Alemania) y los COVs emitidos por estas ramas se colectaron durante 24 h usando micro- bombas (modelo DC 06/21 FK, Fürgut, Tannheim, Alemania) y filtros de 1.5 mg de carbón activado (CLSA- Filters, Le Ruissaeu de Montbrun, Francia) (Donath y Boland, 1995).

Anexo 2. Método para la extracción de volátiles y semivolátiles con hexano

Para este método de extracción se siguieron las mismas condiciones; las plantas se encontraban en etapa de floración. Se usaron seis plantas por cada línea; tres plantas con tratamiento (daño foliar) y tres plantas control (sin daño foliar).

Una vez hecho el daño mecánico (30% de daño foliar) se cortó una hoja de cada planta (preferentemente la sexta hoja totalmente expandida). Cada hoja fue pesada y se tomó el registro del peso fresco. Posteriormente cada hoja fue colocada en un frasco de vidrio previamente lavado y esterilizado.

Se agregó una cantidad conocida de *n*-hexano, para evitar degradación de tejido y volátiles. Con este método, la muestra puede estar por tiempo prolongado en el REVCO almacenada a -70° C (Figura A2 a y b). Para la lectura, se agregaron 80 µL de bromodecano y se trituró el tejido con el solvente en un mortero con pistilo previamente lavado y limpiado con el solvente de la muestra (para lavar impurezas).

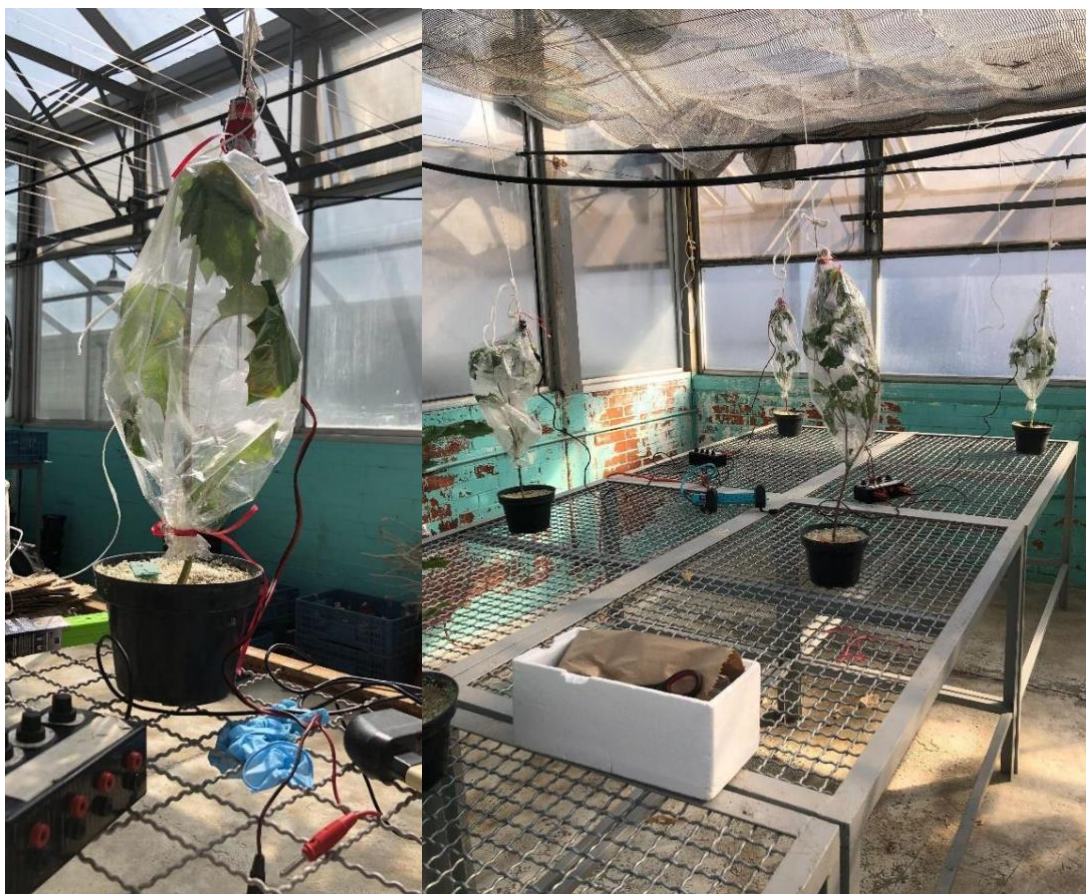


Figura A1. Colecta de COVs por el método de *headspace*. Como control negativo, se colectó el aire dentro de una bolsa PET vacía. Las muestras fueron almacenadas para su uso posterior.

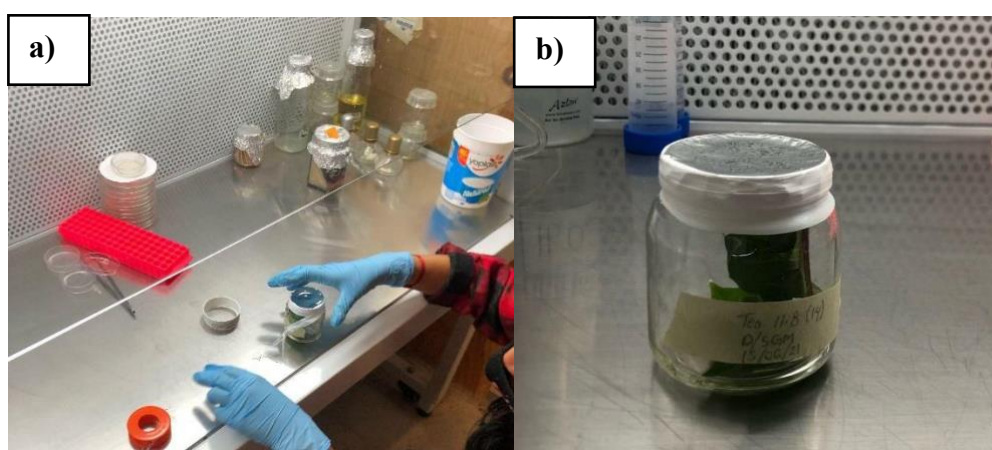


Figura A2. (a) Colecta de volátiles por solvente. (b) Frasco sellado para evitar pérdida de compuestos.

Anexo 3. Semicuantificación de los COVs encontrados en poblaciones nativas y no nativas de *D. stramonium*.

Tabla A3. Análisis de varianza para el área relativa bajo la curva (en unidades arbitrarias) de cada tratamiento en función de los compuestos. No se encontró diferencias significativas

Compuesto	Fuente de variación	g.l.	S.C.	C.M.	F	p
β-Farnesene	Tratamiento	3	0.393	0.1309	0.157	0.921
	Residuales	5	4.177	0.8355		
Decanal	Tratamiento	3	0.0173	0.00578	0.055	0.983
	Residuales	27	2.8497	0.10554		
(S)-3-Ethyl-4-methylpentanol	Tratamiento	3	2.646	0.8818	1.394	0.262
	Residuales	33	20.881	0.6328		
2-Hexenal, (E)-	Tratamiento	3	9.52	3.175	1.585	0.217
	Residuales	26	52.09	2.003		
3-Hexen-1-ol, (Z)-	Tratamiento	1	0.1029	0.1029	0.292	0.609
	Residuales	6	2.1185	0.3531		
2,6-Nonadienal, (E,E)-	Tratamiento	3	2.522	0.8407	1.034	0.423
	Residuales	9	7.32	0.8133		
Nonanal	Tratamiento	3	0.41	0.1368	0.624	0.602
	Residuales	51	11.17	0.2191		
Pentadecanal-	Tratamiento	3	0.041	0.01368	0.103	0.955
	Residuales	6	0.7951	0.13252		
Phenylethyl Alcohol	Tratamiento	3	0.4578	0.1526	1.404	0.28
	Residuales	15	1.6302	0.1087		

Anexo 4. Método para la extracción de volátiles y semivolátiles con diclorometano

Tabla A4. VOCs presentes en *D. stramonium* colectados por el método de disolvente (diclorometano). TR: Tiempo de retención; AP: área debajo del pico.

Metabolitos extraídos con disolvente (Diclorometano)					
Sin daño			Con daño		
TR	AP	Compuesto	TR	AP	Compuesto
4,776	1,023	D-Limonene	4,776	0,857	D-Limonene
5,449	0,362	Undecane, 5-methyl-	6,588	0,574	Dodecane, 4,6-dimethyl-
7,189	1,839	4-Isopropyl-1,3-cyclohexanedione	8,511	3,947	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-
8,519	3,101	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	9,649	0,322	Eicosane
9,561	0,474	Eicosane	9,890	0,534	Tetracosane
			13,240	1,155	Atropine
			14,226	2,181	Scopolamine

Anexo 5. Método para la extracción de volátiles y semivolátiles con hexano.

Tabla A5. VOCs presentes en *D. stramonium* colectados por el método de disolvente (hexano). TR: Tiempo de retención; AP: área debajo del pico.

Metabolitos extraídos con solvente (Hexano)					
Sin daño			Con daño		
TR	AP	Compuesto	TR	AP	Compuesto
2,564	0,892	2-Pentanol, 4-methyl-	2,604	0,532	3-Hexanone
5,401	0,715	Decane, 3,7-dimethyl-	2,636	0,650	2-Hexanone
6,475	0,500	Benzaldehyde, 3,5-dimethyl-	3,021	1,343	2,4-Dimethyl-1-heptene
8,519	4,623	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	3,133	0,733	2-Hexenal, (E)-
8,824	0,483	Pentacosane	6,475	0,558	Benzaldehyde, 3,5-dimethyl-
9,890	1,283	Eicosane	7,269	0,610	Dodecane, 2,6,11-trimethyl-
11,942	0,473	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	8,519	3,894	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-

I. Referencias

Alboukadel Kassambara and Fabian Mundt (2020). factextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factextra>

Ali, M. Y., Naseem, T., Zhang, J., Pan, M., Zhang, F., & Liu, T. X. (2022). Plant Volatiles and Herbivore Induced Plant Volatiles from Chili Pepper Act as Attractant of the Aphid Parasitoid *Aphelinus varipes* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Plants*, *11*(10), 1350.

Anastasaki, E., Drizou, F., & Milonas, P. G. (2018). Electrophysiological and oviposition responses of *Tuta absoluta* females to herbivore-induced volatiles in tomato plants. *Journal of chemical ecology*, *44*, 288-298.

Arimura, G. I., Matsui, K., & Takabayashi, J. (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant and Cell Physiology*, *50* (5), 911-923.

Ataide, L. M. S., Pappas, M. L., Schimmel, B. C. J., Lopez-Orenes, A., Alba, J. M., Duarte, M. V. A., Pallini, A., Schuurink, R. C., & Kant, M. R. (2016). Induced plant-defenses suppress herbivore reproduction but also constrain predation of their offspring. *Plant Science*, *252*, 300- 310. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.08.004>

Badra, Z., Larsson Herrera, S., Cappellin, L., Biasioli, F., Dekker, T., Angeli, S., & Tasin, M. (2021). Species-Specific Induction of Plant Volatiles by Two Aphid Species in Apple: Real Time Measurement of Plant Emission and Attraction of Lacewings in the Wind Tunnel. *Journal of Chemical Ecology*, *47*(7), 653-663.

Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., & Preston, C. A. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *science*, *311*(5762), 812-815.

Bernasconi, M. L., Turlings, T. C., Ambrosetti, L., Bassetti, P., & Dorn, S. (1998). Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *87*(2), 133-142.

Bixenmann, R., Coley, P., Weinhold, A., Kursar, T., 2016. High herbivore pressure favors constitutive over induced defense. *Ecology and Evolution* *6*: 6037– 6049. doi: 10.1002/ece3.2208

Blaisdell, G. K., & Roy, B. A. (2014). Two tests of enemy release of commonly co-occurring bunchgrasses native in Europe and introduced in the United States. *Biological invasions*, *16*, 833-842.

Blossey B, Notzold R. 1995. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* *83*:887–889.

Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W. E., Siemann, E., & Prati, D. (2005). Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, *144*, 1-11.

Cabrales-Vargas, R. A. (1991). Demografía e historia natural de *Datura stramonium* L. en el Pedregal de San Angel con algunas implicaciones evolutivas. *Bachelor's thesis. Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico*.

Callaway, R. M., & Ridenour, W. M. (2004). Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(8), 436-443.

Carmona, D., & Fornoni, J. (2013). Herbivores can select for mixed defensive strategies in plants. *New Phytologist*, 197(2), 576-585.

Castillo, G., Calahorra-Oliart, A., Núñez-Farfán, J., Valverde, P.L., Arroyo, J. Cruz, L. Tapia- López, R. 2019. Selection on tropane alkaloids in native and non-native populations of *Datura stramonium*. *Ecology and Evolution* 019; 00:1–9 *Chemoecology* 11, 9–16

Castillo, G., Cruz, L. L., Hernandez-Cumplido, J., Oyama, K., Flores-Ortiz, C. M., Fornoni, J., & Nunez-Farfan, J. (2013). Geographic association and temporal variation of chemical and physical defense and leaf damage in *Datura stramonium*. *Ecological Research*, 28, 663-672.

Crawley, M. J. (1986). The population biology of invaders. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 314(1167), 711-731.

Danner, H., Desurmont, G. A., Cristescu, S. M., & van Dam, N. M. (2018). Herbivore-induced plant volatiles accurately predict history of coexistence, diet breadth, and feeding mode of herbivores. *New Phytologist*, 220(3), 726-738.

De-la-Cruz, I.M, Cruz, L.L., Martínez-García, L., Valverde, P.L., Flores-Ortiz, C. M., Hernández- Portilla, L. B. & Núñez-Farfán, J. 2020. Evolutionary response to herbivory: population differentiation in microsatellite loci, tropane alkaloids and leaf trichome density in *Datura stramonium*. *Arthropod-Plant Interactions* 14:21–30

Degen, T., Dillmann, C., Marion-Poll, F., & Turlings, T. C. (2004). High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant physiology*, 135(4), 1928-1938.

Dicke, M. (1986). Volatile spider-mite pheromone and host-plant kairomone, involved in spaced-out gregariousness in the spider mite *Tetranychus urticae*. *Physiological Entomology*, 11(3), 251-262.

Dicke, M. (2009). Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, cell & environment*, 32(6), 654-665.

Dicke, M., & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in plant science*, 15(3), 167-175.

Dicke, M., Sabelis, M. W., Takabayashi, J., Bruin, J., & Posthumus, M. A. (1990). Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *Journal of chemical ecology*, 16, 3091-3118.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, 25(5), 417-440.

Effah, E., Barrett, D. P., Peterson, P. G., Potter, M. A., Holopainen, J. K., & Clavijo McCormick, A. (2020). Seasonal and environmental variation in volatile emissions of the New Zealand native plant *Leptospermum scoparium* in weed-invaded and non-invaded sites. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.

Engelberth, J., & Engelberth, M. (2020). Variability in the capacity to produce damage-induced aldehyde green leaf volatiles among different plant species provides novel insights into biosynthetic diversity. *Plants*, *9*(2), 213.

Essig, E. O. 1958. Insects and mites of Western North America. MacMillan company, N.Y.

Faiola, C., & Taipale, D. (2020). Impact of insect herbivory on plant stress volatile emissions from trees: A synthesis of quantitative measurements and recommendations for future research. *Atmospheric Environment: X*, *5*, 100060.

Fornoni, P. L. Valverde y J. Núñez-Farfán. 2003. Evolutionary ecology of tolerance to herbivory: advances and perspectives. *Comments Theor. Biol.* 8: 643–663.

Fox, J. (2003) Effect displays in R for generalised linear models. *Journal of Statistical Software* 8:15, 1–27.

Franks, S. J., Wheeler, G. S., & Goodnight, C. (2012). Genetic variation and evolution of secondary compounds in native and introduced populations of the invasive plant *Melaleuca quinquenervia*. *Evolution*, *66*(5), 1398-1412.

Gaquerel, E., Weinhold, A., & Baldwin, I. T. (2009). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphigidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VIII. An unbiased GCxGC-ToFMS analysis of the plant's elicited volatile emissions. *Plant Physiology*, *149*(3), 1408-1423.

Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, *3*(7), 408-414.

Gouinguene, S. et al. (2001) Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte).

Halitschke, R., Ziegler, J., Keinänen, M., & Baldwin, I. T. (2004). Silencing of hydroperoxide lyase and allene oxide synthase reveals substrate and defense signaling crosstalk in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal*, *40*(1), 35-46.

Halitschke, R., Stenberg, J. A., Kessler, D., Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2008). Shared signals—‘alarm calls’ from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. *Ecology letters*, *11*(1), 24-34.

Hare, J. D. (2007). Variation in herbivore and methyl jasmonate-induced volatiles among genetic lines of *Datura wrightii*. *Journal of chemical ecology*, *33*(11), 2028-2043.

Hare, J. D., & Walling, L. L. (2006). Constitutive and jasmonate-inducible traits of *Datura wrightii*. *Journal of chemical ecology*, *32*(1), 29-47.

Hare, J. D., Elle, E., & van Dam, N. M. (2003). Costs of glandular trichomes in *Datura wrightii*: a three-year study. *Evolution*, *57*(4), 793-805.

Heil, M. (2004). Direct defense or ecological costs: Responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild Lima bean (*Phaseolus lunatus*). *J. Chem. Ecol.* 30, 1289–1295. doi:10.1023/B:JOEC.0000030299.59863.69.

Heil, M., & Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in plant science*, *13*(6), 264-272.

Hernandez-Cumplido, J. (2009). Ecología de la interacción tritrófica *Datura stramonium*-*Trichobaris* sp.-parasitoides. *Masters Thesis, UNAM*.

Hiltpold, I., Erb, M., Robert, C. A., & Turlings, T. C. (2011). Systemic root signalling in a belowground, volatile-mediated tritrophic interaction. *Plant, cell & environment*, 34(8), 1267-1275.

Honor, R and Colautti, R. 2020. EICA 2.0: A general model of enemy release and defense in plant and animal invasions. *Plant Invasions: The Role of Biotic Interactions* 190. Doi: 10.1079/9781789242171.0010

Hu, L. (2022). Integration of multiple volatile cues into plant defense responses. *New Phytologist*, 233(2), 618-623.

Jiao M, Luna-Cavazos M, Bye R. 2002. Allozyme variation in Mexican species and classification of *Datura* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 232:155–166.

Joshi J, Vrieling K. 2005. The enemy release and EICA hypothesis revisited: incorporating the fundamental difference between specialist and generalist herbivores. *Ecology Letters* 8:704–714

Karban, R. and I. T. Baldwin. 1997. *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press. E.U.A.

Karban, R., Agrawal, A. A., & Mangel, M. (1997). The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology*, 78(5), 1351-1355.

Keane, R. M., & Crawley, M. J. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in ecology & evolution*, 17(4), 164-170.

Kessler A, Baldwin IT. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141– 2144.

Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511), 2141-2144.

Kigathi, R. N., Unsicker, S. B., Reichelt, M., Kesselmeier, J., Gershenzon, J., & Weisser, W. W. (2009). Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 1335-1348.

Kleunen, M. V., Fischer, M., & Johnson, S. D. (2007). Reproductive assurance through self-fertilization does not vary with population size in the alien invasive plant *Datura stramonium*. *Oikos*, 116(8), 1400-1412.

Kogan, M. & R.D. Goeden, 1970. The biology of *Lema trilineata daturaphyla* (Coleoptera: Chrysomelidae) with notes on efficiency of food utilization by larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am* .63:537-546.

Kollner, T. G., Held, M., Lenk, C., Hiltpold, I., Turlings, T. C., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2008). A maize (E)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *The Plant Cell*, 20(2), 482-494.

Li, T., & Blande, J. D. (2017). How common is within-plant signaling via volatiles?. *Plant signaling & behavior*, 12(8), 327-338.

Liñán Vigo, Franco Nery (2021). Selección natural en las defensas contra herbívoros de poblaciones nativas y foráneas de *Datura stramonium*. Instituto de Ecología, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3596020>

Liu, Y., Luo, S. H., Hua, J., Li, D. S., Ling, Y., Luo, Q., & Li, S. H. (2021). Characterization of defensive cadinenes and a novel sesquiterpene synthase responsible for their biosynthesis from the invasive *Eupatorium adenophorum*. *New Phytologist*, 229(3), 1740-1754.

Márquez, S., Piñero, D., ... & Núñez-Farfán, J. (2021). Genomic signatures of the evolution of defence against its natural enemies in the poisonous and medicinal plant *Datura stramonium* (Solanaceae). *Scientific reports*, 11(1), 1-19.

Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 274-280.

Meents, A. K., Chen, S. P., Reichelt, M., Lu, H. H., Bartram, S., Yeh, K. W., & Mithöfer, A. (2019). Volatile DMNT systemically induces jasmonate-independent direct anti-herbivore defense in leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.

Meldau, S., Wu, J., & Baldwin, I. T. (2009). Silencing two herbivory-activated MAP kinases, SIPK and WIPK, does not increase *Nicotiana attenuata*'s susceptibility to herbivores in the glasshouse and in nature. *New Phytologist*, 181(1), 161-173.

Mendesil, E., Bruce, T.J.A., Woodcock, C.M., Caulfield, J.C., Seyoum, E., & Pickett, J.A. (2009). Semiochemicals used in host location by the Coffee berry Borer, *Hypothenemus hampei*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 944-950

Miranda-Pérez, A., Castillo, G., Hernández-Cumplido, J., Valverde, P.L., Borbolla, M., Cruz, L.L., Núñez-Farfán, J. (2016). Natural selection drives chemical resistance of *Datura stramonium*. *PeerJ*, 4, 1898

Mitchell, C. E., Agrawal, A. A., Bever, J. D., Gilbert, G. S., Hufbauer, R. A., Klironomos, J. N., ... & Vázquez, D. P. (2006). Biotic interactions and plant invasions. *Ecology letters*, 9(6), 726-740.

Mitchell, C. E., Agrawal, A. A., Bever, J. D., Gilbert, G. S., Hufbauer, R. A., Klironomos, J. N., ... & Vázquez, D. P. (2006). Biotic interactions and plant invasions. *Ecology letters*, 9(6), 726-740.

Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431-450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>

Morawo, T., & Fadamiro, H. (2016). Identification of key plant-associated volatiles emitted by *Heliothis virescens* larvae that attract the parasitoid, *Microplitis croceipes*: implications for parasitoid perception of odor blends. *Journal of chemical ecology*, 42, 1112-1121.

Müller-Schärer, H., Schaffner, U., & Steinger, T. (2004). Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends in ecology & evolution*, 19(8), 417-422.

Müller, C. (2018). Evolution of increased competitive ability and shifting defence hypotheses. *Invasion biology: hypotheses and evidence*, 103-123.

Nunez-Farfan, J. (1991). Biología vegetal 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 interpoblacional. *PhD dissertation, UNAM*.

Núñez-Farfán, J. y R. Dirzo. 1994. Evolutionary ecology of *Datura stramonium* L. in Central Mexico: natural selection of resistance to herbivorous insects. *Evolution* 42: 432-436.

Peterson, B.L. y G.P., Dively. 1981. Effects of feeding by *Lema trivittata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on the growth, reproduction and competitive ability of jimsonweed in soybeans. *Proc. Northeast. Weed Sci. Soc.* 35:78.

Poelman, E.H. et al. (2008) Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Trends Plant Sci.* 13, 534–541.

Prentis, P. J., Wilson, J. R., Dormontt, E. E., Richardson, D. M., & Lowe, A. J. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in plant science*, 13(6), 288-294.

Rojas, J. C. (1999). Influence of host plant damage on the host-finding behavior of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental entomology*, 28(4), 588-593.

Rosenkranz, M., & Schnitzler, J. P. (2016). Plant volatiles. *eLS*, 1-9.

Rotter, M.C., & Holeski, L.M. (2018). A meta-analysis of the evolution of increased competitive ability hypothesis: Genetic-based trait variation and herbivory resistance trade-offs. *Biological Invasions*, 20, 2647–2660. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1724-1>

Rowan, D. D. (2011). Volatile metabolites. *Metabolites*, 1(1), 41-63.

SAS Institute Inc. 2012. JMP version 10. SAS Publishing. North Carolina, USA.

Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2013). Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 17781-17811.

Schiestl, F. P., & Johnson, S. D. (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in ecology & evolution*, 28(5), 307-315.

Schuman, M. C., Barthel, K., & Baldwin, I. T. (2012). Herbivory-induced volatiles function as defenses increasing fitness of the native plant *Nicotiana attenuata* in nature. *Elife*, 1, e00007.

Schuman, M. C., Heinzel, N., Gaquerel, E., Svatos, A., & Baldwin, I. T. (2009). Polymorphism in jasmonate signaling partially accounts for the variety of volatiles produced by *Nicotiana attenuata* plants in a native population. *New Phytologist*, 183(4), 1134-1148.

Skubel, S. A., Su, X., Poulev, A., Foxcroft, L. C., Dushenkov, V., & Raskin, I. (2020). Metabolomic differences between invasive alien plants from native and invaded habitats. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.

Unsicker, S. B., Kunert, G., & Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 479-485.

Valverde PL, Fornoni J, Núñez-Farfán J. 2003. Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: equal plant fitness benefits of growth and resistance against herbivory. *Journal of Evolutionary Biology* 16:127–137.

Valverde, P.L., Arroyo, J., Núñez-Farfán, J., Castillo, G., Calahorra, A., Pérez-Barrales, R., & Tapia-López, R. (2015). Natural selection on plant resistance to herbivores in the native and introduced range. *AoB Plants*, 7, plv090. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv090v>

Valverde, P.L., Fornoni, J. & Núñez-Farfán, J. 2001. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *J. Evol. Biol.* **14**: 424– 432.

Van der Putten, W. H., Vet, L. E., Harvey, J. A., & Wäckers, F. L. (2001). Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(10), 547-554.

Van Tol, R. W. H. M., Helsen, H. H. M., Griepink, F. C., & De Kogel, W. J. (2009). Female-induced increase of host-plant volatiles enhance specific attraction of aphid male *Dysaphis plantaginea* (Homoptera: Aphididae) to the sex pheromone. *Bulletin of entomological research*, 99(6), 593-602.

Villanueva Hernández, Carol Estefanía (2019). Interacción *Lema daturaphila* (Chrysomelidae)- parasitoides sobre *Datura stramonium* (Solanaceae). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3589795>

Villanueva, H.C. (2022) Ecología evolutiva de la interacción tritrófica *Datura stramonium*-*Lema daturaphila*-parasitoides. [Tesis de maestría] Universidad Nacional Autónoma de México.

Walling, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*. 19:195–216. Wang, L., L. Qu, Weber, I. D., Lopes, W. R., de Paula, L. C. B., Albernaz-Godinho, K. C., & Czapak, C. (2021). Tachinids associated with lepidopteran pests in agricultural crops in south-central region of Goiás, Brazil. *BioControl*, 66(5), 625-637.

Weaver, S., Warwick, S., 1984: The biology of Canadian weeds, *Datura stramonium* L., *Canadian J. Plant Set*, 64, 979-991.

Yamauchi, Y., Kunishima, M., Mizutani, M., & Sugimoto, Y. (2015). Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Scientific Reports*, 5(1), 1-8.