

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**EFECTO DE LA ENDOGAMIA SOBRE LAS DEFENSAS CONSTITUTIVAS E
INDUCIDAS POR HERBIVOROS EN *Datura stramonium* (Solanaceae)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

GUSTAVO JUNIOR VASQUEZ CRUZ

Ensenda B.C

Febrero de 2017

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA ENDOGAMIA SOBRE LAS DEFENSAS CONSTITUTIVAS E
INDUCIDAS POR HERBIVOROS EN *Datura stramonium* (Solanaceae)**

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

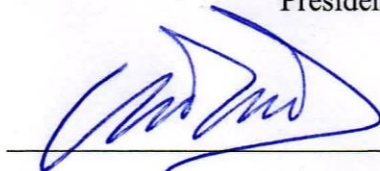
GUSTAVO JUNIOR VASQUEZ CRUZ

APROBADO POR:



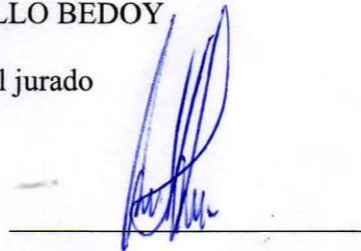
DR. RAFAEL BELLO BEDOY

Presidente del jurado



DR. CLARA M. HEREU ROMERO,

SECRETARIO



DR. CARLOS A. FLORES LÓPEZ

1ER. VOCAL

AGRADECIMIENTOS

De inicio, quiero agradecer a mis padres y hermanos, gracias por su compañía, tolerancia y apoyo. A mis otros padres (mis tíos) y hermanos (mis primas y mi primo) también gracias.

La importancia de este trabajo radica en que representa el inicio y el final de algo concreto que yo nunca había sido capaz de realizar, y por eso quiero agradecer a los seres humanos que me ayudaron y permitieron sumergirme y explorar el mundo tan extraño y fascinante que es la ciencia, a Nahara, a Sthephano y a Bello, y a todos mis profesores.

A mis amigos, por tan simple fenómeno como es coincidir, a todos ellos, a los que me preguntaron por mi tesis y la fecha de presentación, que se hizo tan lejana. De forma especial quiero agradecer a Alfredo Figueroa por el apoyo en el cuidado de las plantas y larvas que utilice en el experimento. A la Mary y Aby por su amistad y ayuda durante la colecta de datos y creo que también regaron las plantas. De igual forma a Alejandro Villareal por su ayuda en la colecta de datos y pláticas en el invernadero. Y de forma muy especial agradecer a Atziri Valenzuela por su compañía en el laboratorio, las buenas charlas, sus preguntas, sus respuestas y los buenos y malos ejemplos. A mi gurú científico Rafael Bello, por la amistad, confianza, apoyo y todo el conocimiento compartido, sin lugar a duda este trabajo no hubiera podido realizarse sin su guía, además de que me ayudo a reforzar los cimientos científicos para el futuro en el que me quiero desenvolver. A mis sinodales, Clara y Carlos por sus consejos durante la universidad y el apoyo en la tesis.

*Todos partieron y estamos quedados
sobre una ruta que sigue y nos deja...
Si todo ha sido sueño y desvaríos
que me madure en el sueño la muerte.*

G. Mistral

Resumen de la tesis de Gustavo Junior Vásquez Cruz presentado como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México.

EFFECTO DE LA ENDOGAMIA SOBRE LAS DEFENSAS CONSTITUTIVAS E INDUCIDAS POR HERBIVOROS EN *Datura stramonium* (Solanaceae)

Resumen aprobado:



Dr. Rafael Bello Bedoy

Los insectos herbívoros consumen tejido reduciendo la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Para evitar el daño en sus tejidos, en las plantas han evolucionado diferentes tipos de defensas, que se agrupan en dos grandes estrategias defensivas: la resistencia y la tolerancia. Diferentes estudios en *Datura stramonium* han demostrado que la endogamia, el apareamiento entre individuos relacionados genéticamente, reduce la resistencia y tolerancia contra insectos, pero no se ha evaluado si esta afecta la inducción de defensas. Este estudio evaluó si la endogamia afecta las defensas de las plantas de forma constitutiva e inducida cuando las plantas son dañadas por *Lema daturaphila*, un herbívoro especialista del género *Datura*. Los resultados mostraron que la resistencia, medida como el daño foliar, fue significativamente menor en las plantas con endogamia. La densidad de tricomas, un carácter de resistencia, fue similar en las plantas dañadas y no dañadas, así como en las plantas con endogamia y exogamia. Por otro lado, el daño por herbívoros afectó algunos rasgos asociados a la tolerancia como el índice de contenido de clorofila, tasa relativa de crecimiento y esfuerzo reproductivo, la endogamia no afectó dichos rasgos. Este estudio no encontró una capacidad en *D. stramonium* para inducir la defensa y reducir el daño una vez que la planta ha sufrido un primer daño. La endogamia no impactó de forma constitutiva e inducida la densidad de tricomas, en cambio sí mostró efecto negativo sobre la resistencia, sugiriendo que otros rasgos distintos a los tricomas determinaron este resultado. Por otra parte el herbívoro afectó la tolerancia de las plantas además se detectó gran variación genética tanto para la resistencia como para la tolerancia.

INDICE

	PAGINA
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Herbivoría</i>	1
1.2 <i>Resistencia</i>	2
1.3 <i>Tolerancia</i>	3
1.4 <i>Defensa Constitutiva e Inducida</i>	4
1.5 <i>Sistema Reproductivo y la Endogamia</i>	5
2. ANTECEDENTES	9
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVO GENERAL	15
4.1 <i>Objetivos específicos</i>	15
5. MATERIALES Y MÉTODO	16
5.1 <i>Sistema de Estudio</i>	16
5.2 <i>Diseño Experimental</i>	17
5.3 <i>Colecta de Datos</i>	19
5.4 <i>Resistencia Contra Herbívoros y Conteo de Tricomas</i>	20
5.5 <i>Análisis de Datos</i>	23
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	32
7.1 <i>Inducción de Tricomas y Resistencia</i>	32
7.2 <i>Tolerancia</i>	36
8. CONCLUSIÓN	39
9. LITERATURA CITADA	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCION	PAGINA
1	Diseño experimental. En la parte superior se muestra de forma cronológica el experimento, en la parte inferior se muestran los grupos de plantas debido al tipo de polinización, Auto (endogamia o auto-polinización) y Entre (exogamia o entrecruzamiento). 37 días después de la germinación se realizó la colecta de datos (altura 1) y el tratamiento de daño con larvas de <i>L. daturaphila</i> durante 24h. y 37 días después del daño se colectaron datos (altura 2, índice de contenido de clorofila, se contó el núm. de ramificaciones y núm. de flores, frutos y botones) y se colectaron 6 discos foliares por planta para medir la resistencia y estimar la densidad de tricomas en cada planta.	20
2	Muestras foliares consumidas por larvas de <i>L. daturaphila</i> , durante 1 h. de una planta endogama (A) y exógama (E) de la familia 12 sometida al tratamiento de daño. AT indica el área total y AC el área consumida por la larva (delimitada por la línea amarilla).	22
3	Muestras foliares sobre las cuales se contó la cantidad de tricomas (círculo rojo de 1.7 mm ²) bajo estereoscopio. (A) y (B) muestran el lado adaxial de muestras de una planta endogámica y exogámica respectivamente, de la familia 2 sometida al tratamiento de daño.	23
4	Promedio (± 1 E. E.) de cada rasgo evaluado en el experimento para cada una de las 12 familias, (a) tricomas, (b) resistencia, (c) índice de clorofila (ICC), (d) ramificaciones, (e) tasa relativa de crecimiento (TRC) y (f) Esfuerzo reproductivo (suma de flores, frutos y botones).	27
5	Resistencia promedio (± 1 E. E.) de las plantas producto de auto-polinización (azul) y entrecruzamiento (verde).	28
6	Promedio (± 1 E. E.) del índice de clorofila (ICC) (a), tasa relativa de crecimiento (TRC) y Esfuerzo reproductivo (suma de flores, frutos y botones) de las plantas sometidas al tratamiento de daño (azul) y sus controles (gris).	28
7	Interacción tratamiento de daño $\times$ polinización. Se muestra la resistencia promedio (± 1 E. E.) de las plantas sometidas y no al tratamiento de daño de progenie endogámica (azul) y exogámica (verde).	30
8	Variación familiar en el valor de depresión por endogamia (δ) para diferentes caracteres; resistencia, índice de clorofila (ICC), tasa relativa de crecimiento (TRC), ramificaciones y esfuerzo reproductivo (número de flores, frutos y botones). Para cada familia las barras grises y azules representan plantas sometidas al tratamiento de daño y controles, respectivamente. Los valores positivos indican efecto negativo de la endogamia respecto a la exogamia y los valores negativos indican efecto negativo de la exogamia.	31

LISTA DE TABLAS

FIGURA	DESCRIPCION	PAGINA
I	ANOVA de diferentes caracteres: densidad de tricomas (a), resistencia (b), índice de contenido de clorofila (ICC) (c), tasa relativa de crecimiento (TRC) (d), Ramificaciones (número de ramificaciones) (e) y esfuerzo reproductivo (suma de flores frutos y botones) (f). Se muestra el efecto de diferentes fuentes de variación.* indica efecto significativo ($p < 0.05$).	26
II	Media (± 1 E. E.), de la interacción tratamiento de daño $\times$ polinización de cada uno de los rasgos medidos. El valor superior es la media y el inferior en paréntesis el E.E. En letras negritas la interacción significativa.	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Herbivoría*

Debido a la capacidad que tienen las plantas de fijar energía solar estas se encuentran en la base de la cadena trófica en las comunidades terrestres (Fritz and Simms, 1992). Se ha estimado que sus consumidores, los herbívoros, pueden remover más del 20% de la productividad primaria neta anual (Agrawal, 2011). Los insectos herbívoros ejercen una fuerte presión sobre las plantas ya que pasan gran parte de su vida en el hospedero consumiendo gran cantidad de tejido (Coley & Barone, 1996; Herrera & Pellmyr, 2009). Por un lado, el daño que causan los herbívoros altera la regulación de genes asociados con el tamaño, la fotosíntesis y la defensa contra herbívoros y patógenos (Kariyat et al., 2012). Por otro lado, el daño a los diversos tejidos de las plantas representa un factor selectivo que afecta drásticamente la sobrevivencia, crecimiento y reproducción (Fritz and Simms, 1992), o mejor conocido de forma conjunta como *adecuación* o *fitness* (Núñez-Farfán & Eguiarte, 1999), promoviendo así la evolución de defensas químicas, mecánicas y fenológicas por parte de la planta (Coley & Barone, 1996). Éstas defensas se agrupan en dos grandes estrategias defensivas, resistencia y tolerancia (Núñez-Farfán et al., 2007). La resistencia es la capacidad de evitar y/o reducir el daño de los depredadores, y la tolerancia es la habilidad de las plantas de amortiguar el efecto del daño sobre la adecuación (Agrawal & Strauss., 1999; Agrawal et al., 2004; Heil, 2009; Strauss et al., 1999).

1.2 Resistencia

En las plantas, la resistencia incluye algunos rasgos estructurales como los tricomas, espinas, el grosor de la hoja, y bioquímicos y moleculares como metabolitos secundarios tóxicos o repelentes y proteínas inhibitorias (Heil, 2009; Oliver et al., 2009). Además las plantas cuentan con defensas que indirectamente reducen el consumo por herbívoros, como compuestos volátiles orgánicos (VOCs, por sus sigla en inglés) y néctar extra floral (EFN, por sus siglas en inglés) (Heil, 2009), cuyo papel es muy relevante en la atracción de depredadores de insectos (VOCs) o en la formación de una asociación entre plantas y hormigas (EFN).

Aunque la resistencia de las plantas está compuesta por muchos caracteres fenotípicos la resistencia contra herbívoros puede ser estimada por medio de la medición del área total de hojas consumida por insectos en una planta (Núñez-Farfán & Dirzo, 1994). Otra forma es cuantificando y/o conociendo la calidad de los rasgos asociados a la resistencia, como estructuras morfológicas, por ejemplo el número de espinas (Kariyat, et al, 2013) o número de tricomas (Valverde et al, 2001), o la concentración y tipo de compuestos químicos (Fritz & Simms, 1992). La resistencia de una planta también puede ser medida sobre los insectos consumidores, observando la sobrevivencia, crecimiento y fecundidad (no. de huevos) sobre plantas de genotipos o fenotipos resistentes (Carr & Eubanks, 2014).

La capacidad de resistir el daño va a depender en gran parte de la variación genética de las plantas, por eso, para estimar la resistencia es importante utilizar

diferentes familias genéticas, se le considera una familia genética a las semillas derivadas de una planta porque comparten una fracción de su genoma (Laurence, 1984).

1.3 Tolerancia

A pesar de la gran diversidad de defensas que han evolucionado en las plantas para evitar el consumo éstas sufren daño por herbívoros tanto en ambientes naturales como agrícolas (Agrawal, 2011). Una explicación es que la selección que imponen las plantas sobre los herbívoros promueve en ellos la capacidad de producir contra-defensas que les confieren la capacidad de consumir el tejido vegetal (Agrawal, 2001). En estos casos, cuando se reduce el valor adaptativo de la resistencia y las plantas no evitan el daño por herbívoros, las plantas emplean a la tolerancia como una estrategia de defensa.

La tolerancia es una estrategia de defensa que maximiza la adecuación de las plantas a diferentes niveles de daño (Fornoni & Nuñez-Farfán, 2000). Cuando las plantas deben compensar el efecto negativo de los herbívoros emplean mecanismos como el incremento de la tasa de crecimiento, en la tasa neta fotosintética y en la cantidad de ramificaciones, también la activación de meristemas y movilización de reservas almacenadas (Heil, 2009; Núñez-Farfán et al., 2007; Strauss et al., 1999).

La tolerancia no puede ser medida en una sola planta, por ello se emplean diferentes familias genéticas que se dividen en un grupo de plantas con daño y otro sin daño, entre ellas se compara el efecto del daño sobre los diferentes componentes de la adecuación tal como el número de flores, frutos y semillas, para

determinar; 1) el nivel de tolerancia y 2) si existen diferencias genéticas entre las líneas utilizadas en un experimento. Además se miden las diferentes respuestas de las plantas a nivel vegetativo y se puede determinar el papel de los caracteres como componentes de la tolerancia.

1.4 Defensa Constitutiva e Inducida

Las defensas que presentan las plantas son constitutivas y/o inducidas. Las defensas constitutivas son aquellas que están presentes en niveles constantes, mientras que las inducidas son las que aparecen o aumentan después del daño y pueden ser estimuladas específicamente por un agresor (Karban & Baldwin, 2007; Mithöfer & Boland, 2012). Los rasgos ligados a la resistencia son constitutivos y/o inducidos, en cambio la tolerancia siempre es inducida. La inducción de defensas puede disminuir la probabilidad de un segundo ataque, permite enviar y recibir información de las plantas vecinas sobre el ataque, y de forma indirecta la planta puede liberar señales que atraigan al depredador del herbívoro (Kessler, 2015). Pero se ha observado que también puede tener efectos negativos, como cambiar la composición de señales químicas de la planta atrayendo a otros herbívoros, los VCOs pueden modificar la interacción con los polinizadores y así alterar la adecuación de la planta (Kessler, 2015). La inducción de defensas incluso puede afectar negativamente la fotosíntesis (Nabity et al., 2012).

La resistencia de las plantas así como la tolerancia hacia los enemigos naturales varía entre individuos (Strauss et al., 1999), familias (Carr & Eubanks, 2002), poblaciones (Valverde et al., 2001) y especies de plantas, y también entre estadios

de desarrollo (Du et al., 2008). La variación de la resistencia y la tolerancia es afectada por el costo relativo en la adecuación y los beneficios que comprende cada una (Núñez-Farfán et al., 2007). Por ejemplo, se ha documentado que cuando se asignan recursos a las defensas constitutivas otros rasgos pueden verse afectados generando disyuntivas también conocidas como “(*trade-off*)” (Kessler, 2015). Sin embargo, no se han detectado disyuntivas entre resistencia y tolerancia (Kariñho & Núñez-Farfán 2015).

La presencia de variación genética es una fuente necesaria para la expresión variable y evolución de las defensas de las plantas contra herbívoros y patógenos (Carr & Eubanks, 2014). La variación individual en la resistencia o la tolerancia pueden ser causadas por una disminución efectiva de la recombinación, expresión de alelos deletéreos y acumulación de mutaciones. A su vez, la reducción en la variación genética puede ser consecuencia del sistema de apareamiento adoptado por las plantas en sus poblaciones. De esta forma, el sistema de apareamiento está fuertemente ligado a la evolución y el nivel defensivos de los individuos (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010a; Campbell, 2015; Leimu et al., 2008).

1.5 Sistema Reproductivo y la Endogamia

El sistema reproductivo que adoptan individuos y poblaciones de plantas influye de forma evolutiva en la selección de organismos, la estructura poblacional y diversidad genética (Núñez-Farfán et al., 2007). La mayoría de las plantas con flor (angiospermas) son hermafroditas, esto quiere decir que cuentan con órganos sexuales femeninos y masculinos, pistilo y estambres, respectivamente (Barrett,

2002; Campbell, 2015; Kalske et al., 2014). Si bien, es muy probable que las plantas hermafroditas se auto-polinicen, sin embargo distintos mecanismos relacionados a las estructuras sexuales como la hercogamia (separación espacial de anteras y estilos dentro de una misma flor) y dicogamia (separación temporal de estambres y estilos) reducen la posibilidad de que ocurra la auto-polinización (Barrett, 2002; Lande & Schemske, 1985). Aunque la reproducción de las angiospermas por auto-fertilización es evitada por muchas plantas aproximadamente un 20 % de las semillas que producen las plantas son derivadas de cruas por auto-fertilización (Barrett, 2002).

Existen diferencias notables entre la progenie producto de autopolinización respecto a la de entrecruzamiento (Darwin, 1876; Núñez-Farfán et al., 2007), siendo las plantas con endogamia (auto-polinización) las que presentan una mayor cantidad de efectos negativos en relación a las derivadas de entrecruzamiento (Charlesworth and Charlesworth, 1987; Darwin, 1876). Los efectos de la endogamia están relacionados con la disminución del vigor (i. e., peso, fertilidad, vitalidad, etc.) (Wright, 1922), por lo cual altera el desarrollo, la interacción con otros individuos o reproducción, así como la expresión de variación genética (Leimu et al., 2008). La endogamia también puede afectar las defensas de la planta contra sus enemigos naturales (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011), tanto constitutivas como inducidas (Kariyat et al., 2012). . La reducción en la adecuación en plantas endógamas en comparación a plantas exógamas es conocida como *depresión por endogamia* (Charlesworth & Willis, 2009), la cual es una fuerza selectiva importante que mantiene el entrecruzamiento como sistema

reproductivo en plantas. La depresión por endogamia resulta del incremento de la homocigosis de los individuos, y los efectos negativos de esta son principalmente el resultado de la expresión de alelos recesivos deletéreos (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Kalske et al., 2014; Lande & Schemske, 1985). En algunas poblaciones la depresión por endogamia es más baja que en otras debido a la larga historia de carga endógama (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010; Carr & Eubanks, 2002; Leimu et al., 2008). Por ejemplo, en poblaciones que experimentan fuerte endogamia se presenta poca o nula reducción en la adecuación debido a que las mutaciones recesivas deletéreas, al ser expuestas a la selección natural, son purgadas de la población (Keller & Waller, 2002). En cambio en poblaciones con una larga historia de entrecruzamiento se espera que la depresión por endogamia sea más fuerte, por lo tanto se tenderá a evitar la endogamia (Lande & Schemske, 1985). En relación a esto, en ambientes en donde los enemigos de la planta están presentes, la depresión por endogamia en las características defensivas puede ser más intensa que en ambientes donde los herbívoros no se encuentran (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011).

La depresión por endogamia (δ) puede ser medida de la siguiente forma;

$$\delta=1-(W_i/W_o)$$

donde W_i es la media de la adecuación de la progenie de una cruce endogámica y W_o es la media de la adecuación de los organismos producto de una cruce no endogámica (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Rasgos como el éxito en la germinación, producción total de flores y biomasa del adulto pueden ser utilizados

para medir la depresión por endogamia (Du et al., 1997). La magnitud de esta dependerá del rasgo utilizado para medirla y del estadio del individuo (Keller & Waller, 2002).

Aunque se han documentado una gran cantidad de efectos negativos en las plantas debido a la auto-polinización estas se favorecen cuando la abundancia de polinizadores es baja, cuando hay fenómenos como cuello de botella (Eguiarte et al., 2007) o tienen una rápida colonización de sitios desocupados (Barrett, 2002; Jain, 1976).

Si bien se ha documentado previamente que la endogamia afecta la defensa, la evidencia que apoya que la endogamia reduce la defensa constitutiva e inducida es limitada (Kariyat 2012; Campbell et al. 2013), y pocos han evaluado como se modifican la resistencia y la tolerancia en sus componentes (ver Campbell et al., 2014 para un estudio). Con base a la revisión anterior, este estudio evaluará la hipótesis que propone que las defensas, tanto constitutiva como inducidas se verán reducidas en plantas con endogamia, empleando como modelo de estudio a *Datura stramonium* y su herbívoro especialista *Lema daturaphila*.

2. ANTECEDENTES

La endogamia y sus efectos en las plantas han sido estudiados desde el siglo XIX. Uno de los primeros trabajos que registró las diferencias entre individuos producto de polinización cruzada (exogamia) y autopolinización (endogamia) fue realizado por Darwin en 1876, “*The Effects of Cross and Self Fertilization in the Vegetable Kingdom*” donde concluye que la polinización cruzada es generalmente benéfica y la autopolinización perjudicial. Para comprender mejor los efectos de la endogamia se han desarrollado formas de medir tanto el grado de endogamia, *coeficiente de endogamia f* por Wright (1922) y el efecto en la adecuación, *depresión por endogamia* (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Más recientemente se han realizado diferentes estudios para conocer sus efectos (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011; Carr & Eubanks, 2002; Campbell et al., 2014; Du et al., 2008; Kariyat et al., 2013), y comprender cómo es que la autopolinización es un factor que limita la adopción de la endogamia en las poblaciones.

Recientemente se propuso que la endogamia podía disminuir la resistencia de las plantas haciéndolas más susceptibles al efecto negativo que causan los herbívoros sobre las mismas. Núñez-Farfán et al. (1996) evaluaron por primera vez el efecto de la endogamia en la resistencia de las plantas contra herbívoros. Este estudio no detectó un efecto negativo sobre la resistencia, ya que no encontraron diferencias entre la progenie exogámica y endogámica de *Datura stramonium* en la cantidad de daño foliar efectuado por sus herbívoros naturales *Epitrix parvula* (Coleoptera: Chrysomelidae) y *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera:

Pyrgomorphidae), pero en términos reproductivos se encontró fuerte depresión por endogamia en las semillas. Posteriormente Carr & Eubanks, (2002) encontraron que en *Mimulus guttatus* la endogamia alteró la resistencia a su herbívoro *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) y la depresión por endogamia incrementó hasta tres veces más en comparación a las plantas que no fueron dañadas por *P. spumarius*, además el efecto fue variable entre familias y poblaciones, lo que indica variación genética en la carga de mutaciones de efectos deletéreos entre familias y entre poblaciones. Más adelante, Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, (2010a) encontraron en *Datura stramonium* que plantas endogamas sufrieron mayor daño que las exógamas en dos años distintos en un ambiente natural, mostrando un costo de la endogamia en la resistencia total a los herbívoros *Lema daturaphila* (Coleoptera: Chrysomleidae) y *E. Parvula* (Coleoptera: Chrysomleidae), de igual forma reportaron depresión por endogamia en el número de semillas por plantas, número de frutos por planta y número de semillas por fruto. Otros trabajos han reportado las consecuencias perjudiciales de la endogamia ante sus enemigos naturales, (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2011; Du et al., 2008; Leimu et al., 2008; Ivey et al., 2004; Kariyat et al., 2012, 2013; Muola et al., 2011; Portman et al., 2015; Stephenson et al., 2004).

Como se mencionó anteriormente la endogamia incrementa la homocigocis de los individuos y generalmente esto tiene efectos negativos, principalmente como resultado de la expresión de alelos recesivos deletéreos (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Kariyat et al, (2012) demostraron mediante el uso microarreglos que la endogamia afecta la expresión de genes involucrados en la

resistencia de las plantas y el consumo por herbívoros también participa sobre-regulando genes asociados con la defensa y disminuye la regulación de genes relacionados con la fotosíntesis y el crecimiento en *Solanum carolinense* (Solanaceae). Resultados similares fueron mostrados por Portman et al., (2015), quienes encontraron niveles bajos de expresión de dos genes asociados a la defensa (LoxD y OPR3) en plantas endógamas de *S. carolinense*, las cuales también mostraron mayor cantidad de consumo, siendo estas un mejor hospedero para el desarrollo de larvas de *Manduca sexta* (Lepidopterae: Sphingidae).

Además de la resistencia, la endogamia puede alterar la tolerancia de las plantas. Diferencias entre individuos de la misma especie pueden ser encontradas en la habilidad de sobrevivir y reproducirse después del ataque (Strauss et al., 1999), por ejemplo entre plantas endógamas y exógamas. Uno de los primeros trabajos que evalúa el efecto de la endogamia en la tolerancia de las planta ante los herbívoros fue realizado por Ivey et al. (2004), quienes reportaron que en diferentes poblaciones de *Mimulus guttatus* la tolerancia en plantas endógamas debido al herbivorismo disminuyó hasta un 25 % con respecto al control. También se encontró una fuerte variación en la tolerancia entre familias como consecuencia de la endogamia. Stephenson et al., (2004) encontraron que en *Cucurbita pepo* ssp. *texana* rasgos asociados a la reproducción fueron afectados por la endogamia cuando fueron dañadas por los insectos *Diabrotica undecimpunctata howardi* y *Acalymma vittatum*.

La capacidad de las plantas de tolerar el daño por herbívoros depende de la historia de vida y de las diversas formas en que las plantas responden al ataque (Du et al., 2008), así como del modo de acción de los herbívoros (Strauss et al., 1999). Aunque las plantas puedan tolerar el daño por herbívoros y no sufrir efectos en la reproducción, esta interacción puede acarrear otro tipo de efectos adversos ya que el insecto puede transmitir patógenos mortales y causar la muerte de la planta, siendo el herbívoro indirectamente el responsable ya que causan heridas por donde el patógeno puede introducirse a la planta (Du et al., 2008).

Si bien, diferentes estudios han evaluado el efecto de la endogamia sobre las estrategias defensivas, resistencia y tolerancia, pocos han evaluado el efecto de la endogamia en la inducción de defensas ligadas a la resistencia, como las defensas estructurales y bioquímicas. Los tricomas son estructuras unicelulares o multicelulares (Levin, 1973), se encuentran en la superficie de las plantas y tienen función defensiva ante los herbívoros (Heil, 2009; Kessler & Baldwin, 2002; Valverde et al., 2001). En *Datura stramonium* se ha observado que plantas que presentan gran densidad de tricomas son menos consumidas que las que tienen poca densidad (Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015; Valverde et al., 2001) apoyando la hipótesis de que los tricomas tienen un papel defensivo contra herbívoros. Por otro lado, Valverde et al. (2001) observaron plasticidad fenotípica en la densidad de tricomas foliares de *D. stramonium* cuando compararon este carácter entre plantas que crecieron en invernadero y en condiciones naturales, el resultado fue que en invernadero la cantidad de tricomas tendió a homogenizarse entre las poblaciones, en una población disminuyó y en dos aumentó la densidad de

tricomas respecto a las plantas cultivadas en ambiente natural. Sin embargo se desconoce si la densidad de tricomas encontrada está ligada a la presencia de herbívoros o algún otro factor ambiental. En relación al sistema de apareamiento se ha encontrado que la endogamia en *S. carolinense* afecta la densidad de tricomas foliares y también compromete la capacidad de las planta de inducir tricomas después de que estas son consumidas por herbívoros (Kariyat et al., 2013). Ligado a esto, Portman et al. (2015) comprobaron que la endogamia en *S. carolinense* afecta la expresión de genes involucrados con la defensa, específicamente en la vía del ácido jasmónico, que es la principal molécula asociada a la inducción de defensas estructurales como los tricomas.

Por otra parte, cuando las hojas de las plantas son consumidas por herbívoros existe reducción del área fotosintética (Strauss et al., 1999), lo que disminuye la fotosíntesis, esto puede afectar la adecuación de la planta. Sin embargo, el daño también puede incrementar la fotosíntesis alterando la demanda de asimilación de carbono (Nabity et al., 2009). La capacidad de compensar puede depender de la historia de herbivoría, siendo las poblaciones de plantas que crecen en ambientes con altos niveles de herbivoría las que evolucionen hacia mecanismos de compensación al daño (Thomson et al., 2003). El contenido de clorofila en las hojas sirve como un buen indicador de actividad fotosintética debido a que es un componente clave en la absorción de luz solar (Hörtensteiner & Kräutler, 2011), bajas concentraciones de ésta limitan el potencial fotosintético de la planta (Ghasemi et al., 2011; Richardson et al., 2002). No se conocen estudios que evalúen el efecto de la endogamia en la actividad fotosintética después de que las

plantas son consumidas por herbívoros, debido a esto en este trabajo se evaluó el índice de contenido de clorofila (ICC).

Se ha encontrado que la endogamia también puede ofrecer ventajas ante algunos enemigos naturales. Bello-Bedoy & Núñez-Farfán (2011), encontraron que plantas de *D. stramonium*, con endogamia, que sufrieron niveles muy altos de infección viral redujeron aparentemente la depresión por endogamia, produciendo un poco más de semillas que las plantas producto de entrecruzamiento. Ivey et al. (2004) encontraron que en una de cuatro poblaciones de *Mimulus guttatus* las plantas endogamas que sufrieron herbivoría presentaron incremento en la probabilidad de producir brotes o flores, lo que sugiere que los herbívoros ayudan a mantener el sistema de apareamiento mixto.

Pocos estudios que han evaluado el efecto que tiene la endogamia en las defensas constitutivas e inducidas cuando las plantas son dañadas por herbívoros, esta información nos ayuda a entender como el sistema de apareamiento influye sobre las defensas de las plantas contra sus consumidores. Aquí se utilizó a *D. stramonium* como planta modelo ya que ha sido utilizada en diferentes estudios que han evaluado el efecto de la endogamia sobre la resistencia y tolerancia.

3. HIPÓTESIS

La endogamia afectará negativamente las defensas constitutivas e inducidas contra herbívoros en *Datura stramonium* (Solanaceae)

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en *Datura stramonium* el efecto de la endogamia en las defensas constitutivas e inducidas contra el insecto herbívoro *Lema daturaphila*.

4.1 Objetivos específicos

Evaluar si la endogamia afecta la resistencia constitutiva e inducida por larvas contra *Lema daturaphila*.

Evaluar si la endogamia afecta la densidad de tricomas constitutiva e inducida contra larvas de *Lema daturaphila*.

Evaluar si el herbivorismo afectó la tolerancia de las plantas y contrastar entre plantas producto de exogamia y endogamia.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Sistema de Estudio

Datura stramonium (Solanaceae) es una planta herbácea anual de origen aparente en Centro o Sudamérica. Se distribuye alrededor del mundo en climas cálidos y tropicales (Kleunen et al., 2007; Weaver & Warwick, 1984). La altura de la planta varía entre 0.3 a 1.5 metros, presenta ramificación dicotómica y hojas alternas (Wilbur L. Mountain, 1987). Es hermafrodita con reproducción por semilla, auto-compatible con sistema de apareamiento mixto (Núñez-Farfán & Dirzo, 1994). *D. stramonium* es consumida por *Shenarium purpurascens* (Orthoptera: Acrididae) un saltamontes generalista (Núñez-Farfán, Cabrales-Vargas & Dirzo, 1996), y por dos escarabajos especialistas (folívoros) *Epitrix parvula* (Coleoptera: Chrysomelidae), y *Lema daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Valverde et al., 2001). De acuerdo a Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, (2011) existe preferencia de *L. daturaphila* y *E. parvula* en consumir plantas de progenie endogámica de *D. stramonium*.

En este estudio se utilizó a *L. daturaphila* como insecto herbívoro ya que es una especie altamente relacionada a plantas del género *Datura* y además se encuentra de forma abundante en Ensenada B.C, que fue la zona de trabajo del presente estudio. *L. daturaphila* lleva acabo todos los estadios de su ciclo de vida, excepto pupa, sobre la planta, se alimenta principalmente de las hojas, aunque en estado adulto, en ausencia de estas, lo puede hacer de flores y tallo. Durante su último

estadio como larva alcanza una longitud total promedio de 8 mm y puede consumir en total un promedio de 217.3 mg de alimento en su desarrollo (Kogan & Goeden, 1970).

5.2 Diseño Experimental

Las semillas que se utilizaron en este experimento fueron obtenidas por polinización manual controlada, se obtuvieron semillas por tratamiento de autopolinización (auto) y entrecruzamiento (entre) por cada planta madre, las semillas derivadas de una planta se les considera una familia genética, ya que comparten una fracción de su genoma (Laurence, 1984). La autopolinización se realizó frotando tres anteras con polen sobre el estigma de la misma flor y para las de entrecruzamiento se usó polen de tres individuos distintos de la misma población, se frotaron tres anteras en el estigma de la flor, la cual fue emasculada previo a la polinización (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010). La polinización manual fue realizada por el Dr. Rafael Bello Bedoy en 2006 en una población de *D. stramonium*, localizada en la localidad de Teotihuacán (Estado de México; 19°41'N, 98°51' E).

Germinación y Crecimiento — Para este trabajo se utilizaron semillas de 12 familias de *D. stramonium* durante todo el experimento. Se germinaron 50 semillas de autopolinización y 50 de entrecruzamiento por cada familia. Previo a la germinación, las semillas fueron almacenadas a 4° C durante una semana y después hidratadas por 20 días. Para facilitar la germinación, a cada semilla se le cortó un fragmento de la testa, evitando dañar el embrión. Las semillas de cada familia

fueron sembradas en una maceta de 1L con suelo Berger BM3. Después de 20 días de la siembra se trasplantaron 12 plántulas de cada tratamiento de polinización por cada familia, en macetas individuales con capacidad de 250 ml. Una vez trasplantadas, cada semana se aplicó 50 ml, por planta, de una solución de fertilizante NPK 19-19-19 (Scotts) a una concentración de $3 \text{ gr}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ NPK 19-19-19, recomendada por el fabricante para otras solanáceas. Las plantas se mantuvieron en un invernadero y se regaron dos veces por día. El número total de plantas fue de $(n)=288$, 24 plantas por cada familia, 12 plantas derivadas de auto-polinización y 12 de entrecruzamiento. De las 12 plantas de cada tratamiento de polinización, un número de 6 fueron asignadas a un tratamiento de daño foliar (explicado abajo) y 6 asignadas al grupo control.

Tratamiento de Daño — Con el fin de evaluar la respuesta defensiva de las plantas a sus herbívoros se realizó un tratamiento de daño foliar una vez que éstas presentaron cuatro hojas desarrolladas. Para ello se colocaron 3 larvas de *Lema daturaphila* en diferentes hojas para que consumieran el tejido foliar durante 24 horas. Las larvas fueron hambreadas previamente 2 horas para asegurar que comenzaran a comer al mismo tiempo y que todas las plantas experimentarían las mismas condiciones experimentales. Se utilizaron larvas entre los estadios 3-4 ya que en estos se presenta la mayor cantidad de consumo sobre *D. stramonium* (Espinosa & Fornoni, 2006). Las larvas fueron puestas en 6 plantas de auto-polinización y en 6 de entrecruzamiento por cada familia, cada una con su respectivo control sin daño (figura 1). Las larvas utilizadas se colectaron de plantas de *Datura wrightii* Regel, localizadas en UABC Ensenada, campus el Sauzal, Baja

California México. Después del tratamiento, las plantas con daño y sin daño fueron separadas en distintas mesas y distribuidas de forma aleatoria.

5.3 Colecta de Datos

Para comparar el desarrollo de las plantas entre familias así como entre autopolinización y entrecruzamiento, y la respuesta de las plantas al tratamiento de daño se realizaron dos tomas de datos a lo largo del experimento. La primera se realizó 30 días después del trasplante, cuando las plantas estuvieron bien establecidas, se midió la altura (altura 1). Después de la toma de datos se inició el tratamiento de daño. La segunda colecta de datos se realizó cuando las plantas estuvieron en estado reproductivo, 37 días después de la primera toma de datos, se midió la altura (altura 2), se contó el número de botones, flores y/o frutos, de aquí en adelante es nombrado como esfuerzo reproductivo, se contó el número de ramificaciones y se registró el índice de clorofila (ICC) de tres hojas con medidor de *CCM200 plus* (Opti-Sciences) (figura 1). La tasa relativa de crecimiento se obtuvo de la siguiente forma, $TRC = (altura\ 2 - altura\ 1) / 37$ (días de una a otra medición).

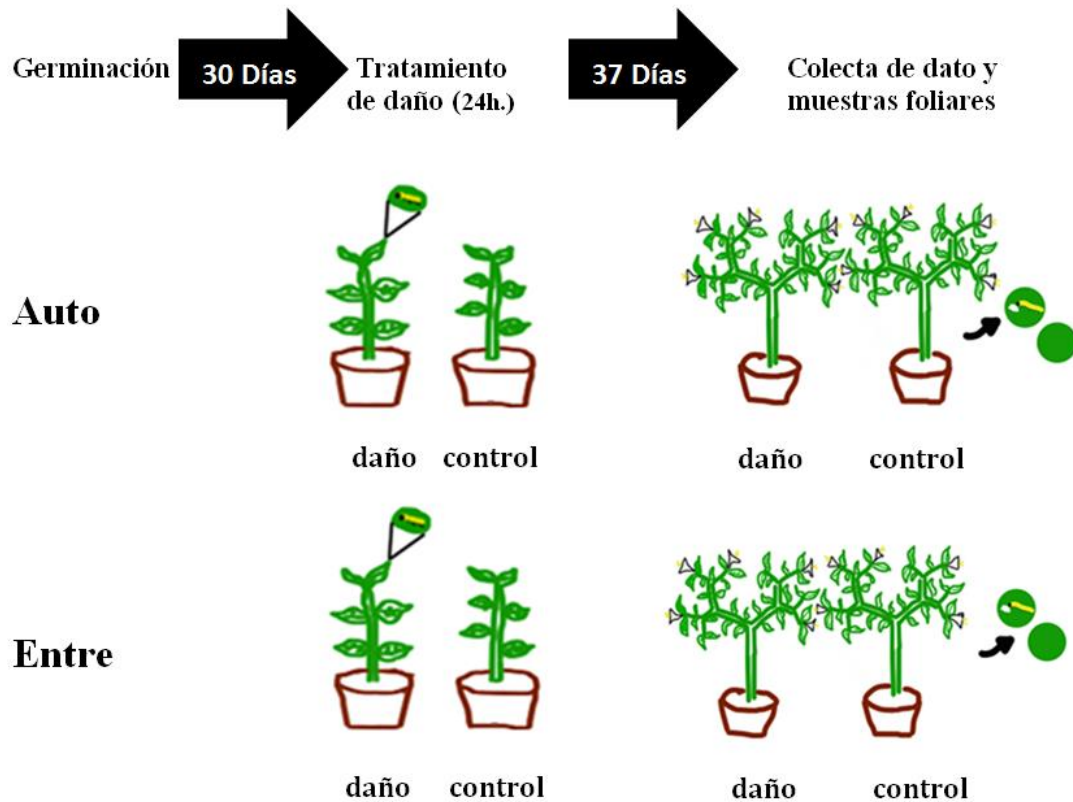


Figura 1. Diseño experimental. En la parte superior se muestra de forma cronológica el experimento, en la parte inferior se muestran los grupos de plantas debido al tipo de polinización, Auto (con endogamia o auto-polinización) y Entre (exogamia o entrecruzamiento). 37 días después de la germinación se realizó la colecta de datos (altura 1) y el tratamiento de daño con larvas de *L. daturaphila* durante 24h. y 37 días después del daño se colectaron datos (altura 2, índice de contenido de clorofila, se contó el núm. de ramificaciones y núm. de flores, frutos y botones) y se colectaron 6 discos foliares por planta para medir la resistencia y estimar la densidad de tricomas en cada planta.

5.4 Resistencia Contra Herbívoros y Conteo de Tricomas

Para determinar si el tratamiento de daño indujo una mayor densidad de tricomas y esto redujo el consumo foliar (1) se estimó la densidad de tricomas foliares por cada familia y (2) se evaluó el consumo de *L. daturaphila* en un área determinada. Para ello, de cada una de las plantas del experimento, con un

sacabocados de área de 1cm², se colectaron seis muestras circulares de hoja, dos muestras por hoja seleccionada (figura 1). Tres muestras por planta fueron preservadas en hojas de papel para realizar conteo de tricomas (explicado abajo) y tres se usaron inmediatamente para evaluar la cantidad de área foliar consumida por larvas (explicado abajo).

Medición de daño foliar y estimación de la resistencia— Para evaluar el consumo de larvas en las plantas se pusieron a hambrear larvas *L. daturaphila* entre estadio 3-4 por dos horas, se tomaron muestras de hoja y se colocaron en cajas Petri. Enseguida de colocar las muestras de todas las familias (entre, auto, con daño y sin daño) se colocó con un pincel una larva sobre la superficie de la muestra. Las larvas se retiraron después de una hora aproximadamente. Finalmente las muestras fueron fotografiadas para así estimar la proporción de área foliar consumida, las muestras fueron porcesadas en el software libre *ImageJ (Image processing and Analysis in Java)*.

De cada disco se determinó el área consumida (*AC*) para cada muestra de hoja (figura 2). Se calculó el promedio de consumo que llevaron a cabo las larvas en cada planta, con los respectivos valores de *AC* y área total (*AT*), de cada uno de los tres discos, y se estimó la proporción total de consumo para cada individuo (*Di*) como:

$$D_i = \sum_{i,j}^n AC/AT$$

donde AC es el área consumida por el herbívoro y AT el área total de la muestra. La resistencia (R_i) fue calculada como:

$$R_i = 1 - D_i$$

Donde un valor igual a uno indica resistencia total y un valor menor a uno indica menor resistencia.

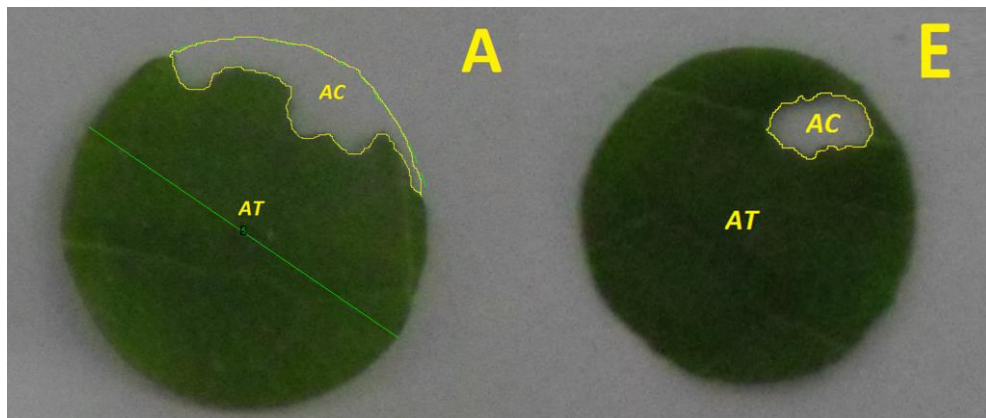


Figura 2. Muestras foliares consumidas por larvas de *L. daturaphila*, durante 1h. de una planta endogama (A) y exógama (E) de la familia 12 sometida al tratamiento de daño, AT indica el área total y AC el área consumida por la larva (delimitada por la línea amarilla).

Estimación de la densidad de tricomas— Para conocer la cantidad de tricomas de cada muestra (tres muestras por planta) se tomó una fotografía de la muestra en el lado adaxial, bajo estereoscopio a 50x (Stemi 2000-C, ZEISS acoplado a una cámara ICc 5, ZEISS, y a una computadora Dell 7020 i7). Las imágenes se analizaron empleado el programa de análisis digital ZEN 2012 (Blue edition) © Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011. En cada una de las tres muestras de la hoja se

sobrepuso en la superficie un círculo de un área de 1.7 mm^2 cuidando no tocar la vena central (Kariñho- Betancourt & Núñez-Farfán, 2015) (Figura 3). Se contó la cantidad de tricomas en el área señalada. Con el número total de tricomas conocido por cada muestra de hoja se estimó el promedio por planta (densidad de tricomas).

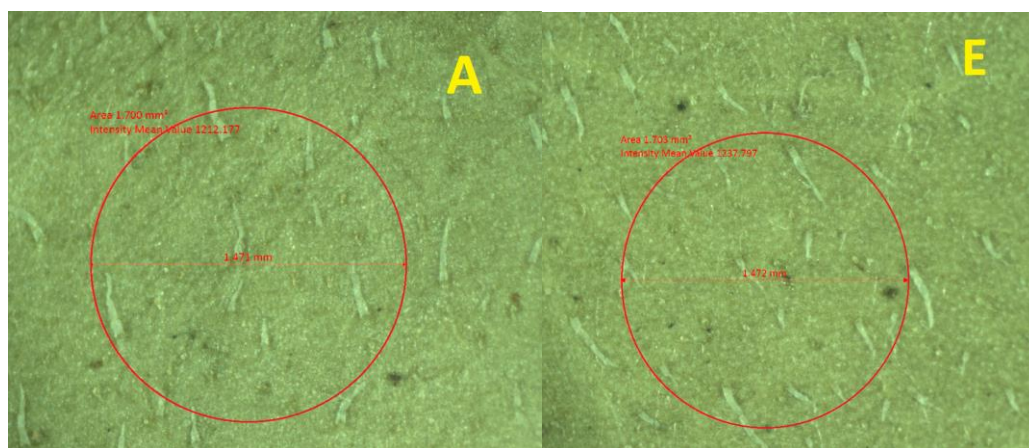


Figura 3. Muestras foliares sobre las cuales se contó la cantidad de tricomas (círculo rojo de 1.7 mm^2) bajo estereoscopio. (A) y (B) muestran el lado adaxial de muestras de una planta endogámica y exogámica respectivamente, de la familia 2 sometida al tratamiento de daño.

5.5 Análisis de Datos

Análisis estadístico — Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) para ver el efecto de la familia (12 familias), polinización (autopolinización vs entrecruzamiento), tratamiento de daño (con daño vs sin daño) y las interacciones (familia $\times$ polinización, familia $\times$ tratamiento de daño, tratamiento de daño $\times$ polinización) para todos los rasgos medidos, cuando la triple interacción (familia $\times$

polinización × tratamiento de daño) no tuvo efecto significativo se removió del análisis, los datos fueron normalizados solamente para la resistencia. Todos los análisis fueron realizados en el software JMP 10.

Depresión por endogamia — Para ver si el tratamiento de daño alteró la depresión por endogamia (δ) esta fue calculada, primero para cada una de las familias y segundo con los promedios de todas las familias en los siguientes rasgos; resistencia, ICC, TRC, número de ramificaciones y esfuerzo reproductivo. La depresión por endogamia (δ) fue obtenida de la siguiente forma;

$$\delta = 1 - (W_i/W_o)$$

donde W_i es la media de la adecuación de la progenie de una cruza endogámica y W_o es la media de la adecuación de los organismos producto de una cruza no endogámica (Charlesworth & Charlesworth, 1987).

6. RESULTADOS

El daño ocasionado por larvas de *Lema daturaphila* en plantas jóvenes de *Datura stramonium* se vio reflejado en diferentes caracteres defensivos en la etapa reproductiva.

Familia — El efecto de la familia resultó significativo para todos los rasgos medidos según el ANOVA (tabla I). La densidad de tricomas varió en un rango que va desde los 5.5 hasta los 11 tricomas por mm^2 (fig. 4a). Se encontró hasta un 37.15% de diferencia en la resistencia entre las familias con el mayor y menor valor (fig. 4b). Para el ICC las diferencias entre familias fueron de hasta 23.32 % (fig. 4c). El número de ramificaciones fue de 2.65 a 3.2 (fig. 4d). La TRC varió de 0.58 hasta 0.7 cm por día (fig. 4e) y el esfuerzo reproductivo mostró hasta un 29.48% de diferencia entre familias (fig. 4f).

Polinización — El tipo de polinización afectó significativamente la resistencia (tabla I b). Las plantas con endogamia fueron 20% más consumidas por larvas que las plantas exógamas (fig. 5). El resto de los rasgos no mostraron diferencia entre plantas endógamas y exógamas.

Tratamiento de daño — El daño foliar afectó significativamente el ICC (tabla I, c) (daño=22.13 y sin daño=23.59), la TRC (daño=0.68 mm/día y sin daño 0.69 mm/día) (tabla I, d) y el esfuerzo reproductivo (daño=7.13 y sin daño=7.56) (tabla I f). En todos los casos su efecto fue negativo (fig. 6 a, b y c). La densidad de tricomas, la resistencia y ramificaciones no difirieron del tratamiento control.

Tabla I. ANOVA de diferentes caracteres: densidad de tricomas (a), Resistencia (b), índice de contenido de clorofila (ICC) (c), tasa relativa de crecimiento (TRC) (d), Ramificaciones (número de ramificaciones) (e) y esfuerzo reproductivo (suma de flores frutos y botones) (f). Se muestra el efecto de diferentes fuentes de variación.* indica efecto significativo ($p < 0.05$).

Rasgo	Fuente de variación	<i>d.f</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
(a) Densidad de tricomas	Familia	11	1048,8311	7,9497	<0.0001*
	Polinización	1	6,0152	0,5015	0.4795
	Tratamiento de daño	1	35,6646	2,9736	0.0859
	Familia × polinización	11	264,7339	2,0066	0.0284*
	Familia × tratamiento de daño	11	173,7218	1,3167	0.2154
	Tratamiento de daño × polinización	1	0,4729	0,0394	0.8428
(b) Resistencia	Familia	11	1,9342	82,3172	<0.0001*
	Polinización	1	0,0502	23,506	<0.0001*
	Tratamiento de daño	1	0,0061	2,8788	0.091
	Familia × polinización	11	0,3111	13,2405	<0.0001*
	Familia × tratamiento de daño	11	0,0471	2,0052	0.0286*
	Tratamiento de daño × polinización	1	0,0088	4,1314	0.0432*
(c) ICC	Familia	11	867,2713	3,164	0.0005*
	Polinización	1	1,0804	0,0434	0.8352
	Tratamiento de daño	1	151,7991	6,0917	0.0142*
	Familia × polinización	11	505,095	1,8427	0.0476*
	Familia × tratamiento de daño	11	453,5922	1,6548	0.0843
	Tratamiento de daño × polinización	1	47,3907	1,9018	0.1691
(d) TRC	Familia	11	0,4741	22,0769	<0.0001*
	Polinización	1	0,0054	2,8142	0.0947
	Tratamiento de daño	1	0,0079	4,0864	0.0443*
	Familia × polinización	11	0,0747	3,4826	0.0002*
	Familia × tratamiento de daño	11	0,0861	4,009	<0.0001*
	Tratamiento daño × polinización	1	0,0006	0,3192	0.5726
	Tratamiento daño × polinización × familia	11	0,0401	1,87	0.044*
(e) Ramificaciones	Familia	11	8,2825	2,5453	0.0046*
	Polinización	1	0,0165	0,0561	0.813
	Tratamiento de daño	1	0,1454	0,4916	0.4838
	Familia × polinización	11	7,3997	2,274	0.0117*
	Familia × tratamiento de daño	11	3,5753	1,0987	0.3626
	Tratamiento de daño × polinización	1	0,3192	1,0793	0.2999
(f) Esfuerzo reproductivo	Familia	11	196,791	8,9668	<0.0001*
	Polinización	1	5,5073	2,7604	0.0979
	Tratamiento de daño	1	13,1733	6,6027	0.0108*
	Familia × polinización	11	75,5268	3,4414	0.0002*
	Familia × tratamiento de daño	11	34,6357	1,5782	0.1058
	Tratamiento de daño × polinización	1	1,1773	0,5901	0.4431
	Tratamiento daño × polinización × familia	11	59,663	2,7185	0.0025*

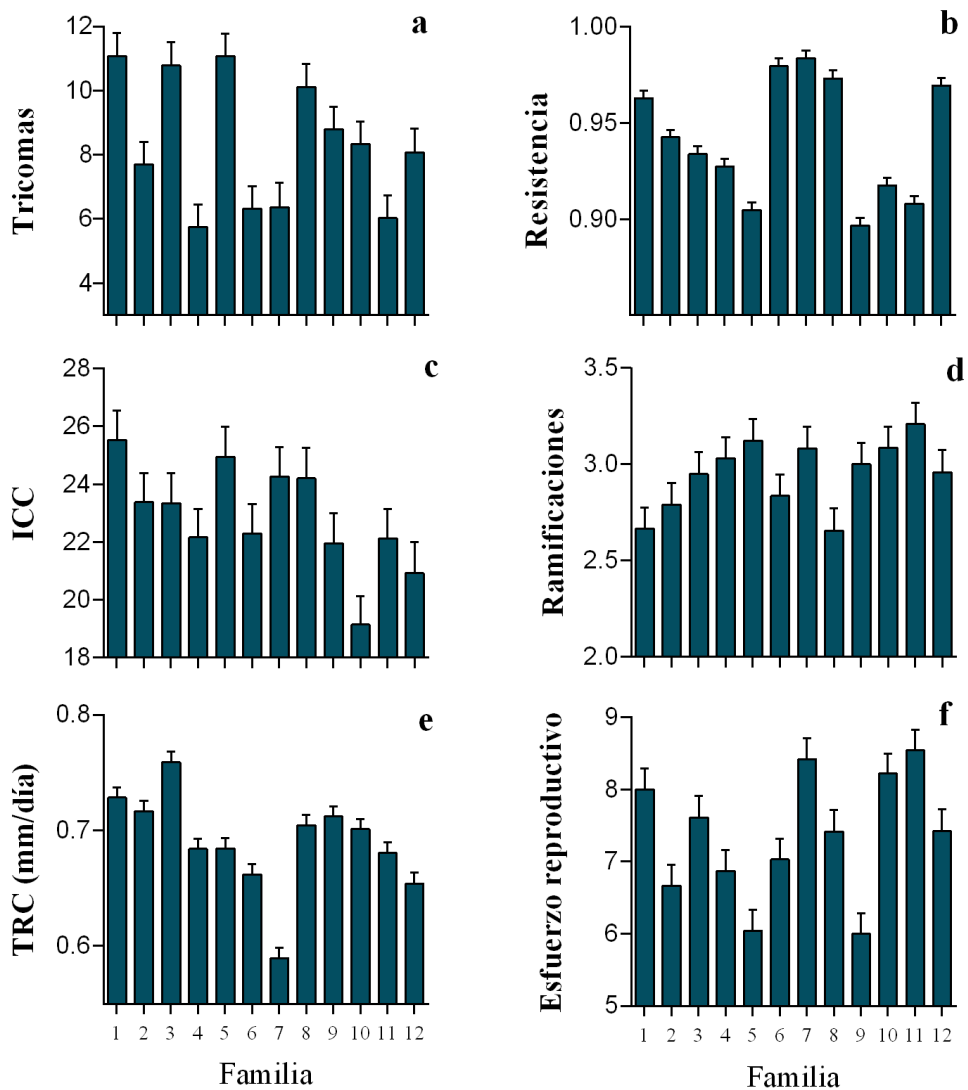


Figura 4. Promedio (± 1 E. E.) de cada rasgo evaluado en el experimento para cada una de las 12 familias, (a) tricomas, (b) resistencia, (c) índice de clorofila (ICC), (d) ramificaciones, (e) tasa relativa de crecimiento (TRC) y (f) esfuerzo reproductivo (suma de flores, frutos y botones).

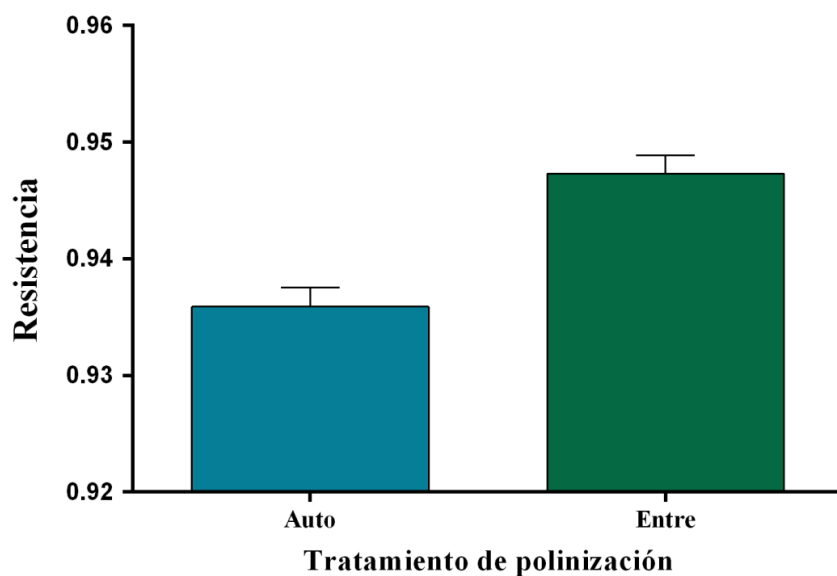


Figura 5. Resistencia promedio (± 1 E. E.) de las plantas producto de auto-polinización (azul) y entrecruzamiento (verde).

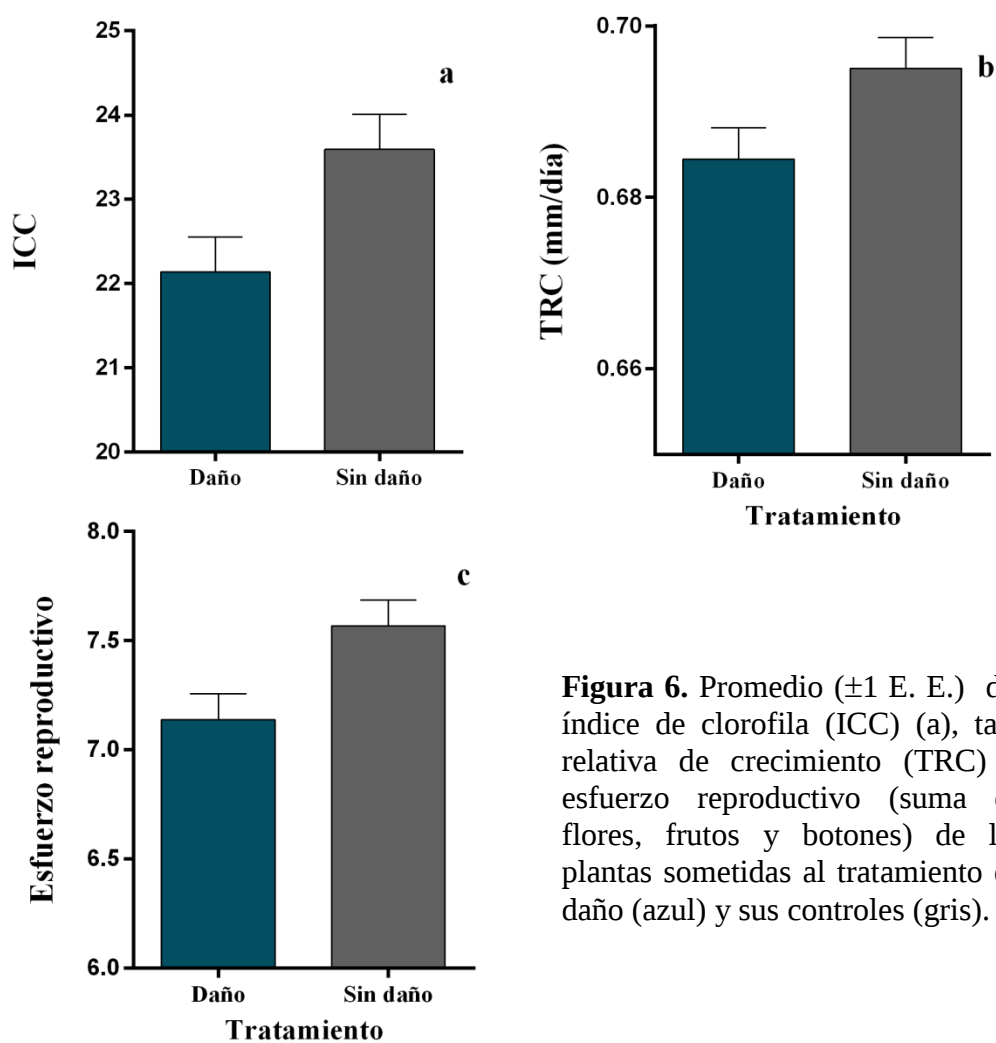


Figura 6. Promedio (± 1 E. E.) del índice de clorofila (ICC) (a), tasa relativa de crecimiento (TRC) y esfuerzo reproductivo (suma de flores, frutos y botones) de las plantas sometidas al tratamiento de daño (azul) y sus controles (gris).

Tratamiento de daño × polinización — Se detectó un efecto significativo de la interacción tratamiento de daño × polinización en la resistencia (tabla 2, b). La cantidad de daño foliar en plantas que no fueron sometidas al tratamiento de daño fue de 5.27 % (entre) y 6.23% (auto), la cual difirió de las plantas que sufrieron el tratamiento de daño, el porcentaje fue similar en las de entrecruzamiento (5.3%) pero aumento ligeramente en las de autopolinización (6.96%) (fig. 7).

Tabla II. Media (± 1 E. E.), de la interacción tratamiento de daño × polinización de cada uno de los rasgos medidos. El valor superior es la media y el inferior en paréntesis el E.E. En letras negritas la interacción significativa.

Rasgo	Autopolinización		Entrecruzamiento	
	Daño	Sin daño	Daño	Sin daño
Tricomas	8.835 (0.421)	8.203 (0.415)	8.624 (0.411)	7.828 (0.4)
Resistencia	0.932 (0.002)	0.939 (0.002)	0.947 (0.002)	0.947 (0.002)
ICC	22.603 (0.592)	23.245 (0.594)	21.668 (0.592)	23.935 (0.578)
TRC	0.687 (0.005)	0.7 (0.005)	0.681 (0.005)	0.689 (0.005)
Esfuerzo reproductivo	6.936 (0.167)	7.493 (0.168)	7.341 (0.167)	7.642 (0.163)
Ramificaciones	2.968 (0.064)	2.946 (0.064)	2.886 (0.064)	2.998 (0.062)

Interacciones: familia × polinización y familia × tratamiento de daño — La interacción familia × polinización fue significativa para cada uno de los rasgos medidos (tabla 1), mostrando que la endogamia actúa de forma distinta en cada

familia y cada rasgo. La interacción familia $\times$ tratamiento de daño mostró efecto significativo solo en la resistencia y TRC, evidenciando que el efecto del daño es heterogéneo para estos dos rasgos.

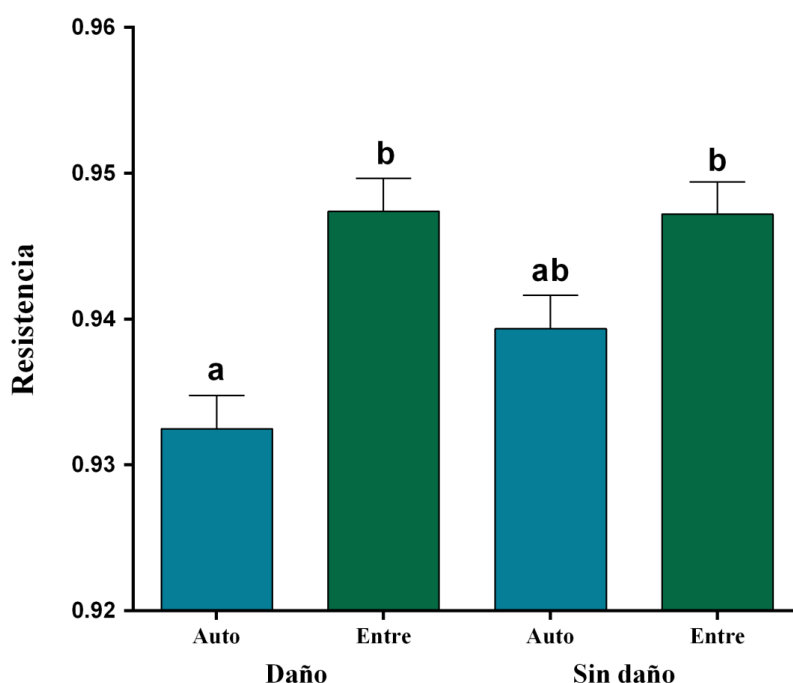


Figura 7. Interacción tratamiento de daño $\times$ polinización, se muestra la resistencia promedio (± 1 E. E.) de las plantas sometidas y no al tratamiento de daño de progenie endogámica (azul) y exogámica (verde).

La triple interacción tratamiento de daño $\times$ polinización $\times$ familia fue significativa para el ICC y el esfuerzo reproductivo (tabla 1, d y f) indicando que la respuesta de las familias es heterogénea, y esta depende del tipo de polinización y del tratamiento de daño.

Depresión por endogamia — La depresión por endogamia fue variable entre las familias y rasgos evaluados (fig. 8). En la mayoría de las familias la endogamia redujo la resistencia, ICC y esfuerzo reproductivo (fig. 8 a, b y e), lo contrario

sucedió con la TRC donde en la mayoría de las familias la exogamia redujo este rasgo (fig. 8 c), las ramificaciones no mostraron ni una de las dos tendencias en las familias. El daño alteró la depresión por endogamia en la resistencia de $\delta=0.008$ (sin daño) a $\delta=0.015$ (daño), aunque el resto de los rasgos mostraron diferencias en la magnitud de la depresión por endogamia no fueron significativas.

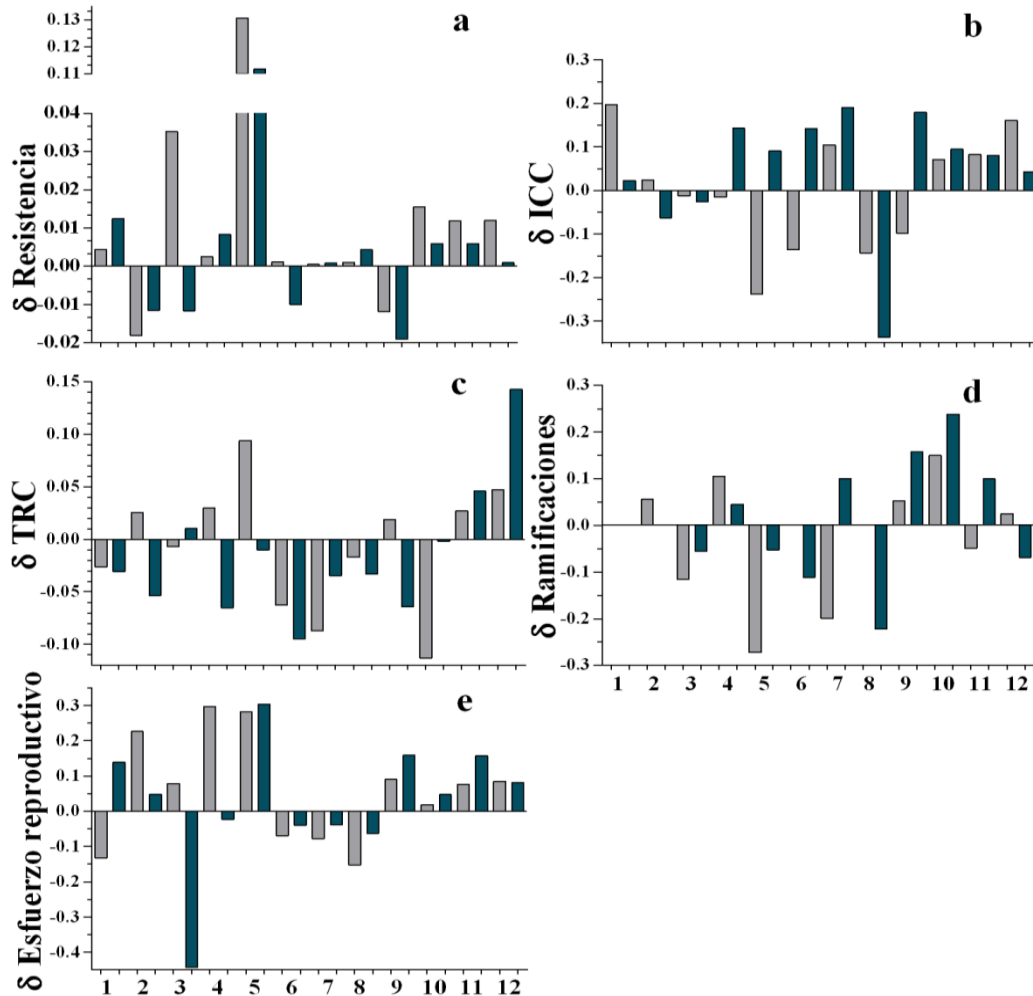


Figura 8. Variación familiar en el valor de depresión por endogamia (δ) para diferentes caracteres; resistencia, índice de clorofila (ICC), tasa relativa de crecimiento (TRC), ramificaciones y el esfuerzo reproductivo (suma de flores, frutos y botones). Para cada familia las barras grises y azules representan plantas sometidas al tratamiento de daño y controles, respectivamente. Los valores positivos indican efecto negativo de la endogamia respecto a la exogamia y los valores negativos indican efecto negativo de la exogamia.

7. DISCUSIÓN

Las estrategias defensivas, resistencia y tolerancia, evolucionan por selección natural a partir de la variación genética presente en poblaciones naturales de plantas. La variación es reducida por la endogamia, particularmente los efectos drásticos de la auto-polinización la reducen hasta 50% en cada generación (Carr & Eubanks, 2014). Pero además, la endogamia reduce la capacidad de expresar defensas constitutiva e inducidas (Bello-Bedoy and Núñez-Farfán, 2011; Kariyat et al 2014; Campbell et al., 2014), incrementando la susceptibilidad de las planta al daño de sus enemigos naturales. En este estudio, evaluando la inducción de defensas estructurales se encontró que el daño por herbívoros no ocasionó inducción de tricomas y tampoco hubo diferencias por el tipo de polinización. Por otra parte la endogamia impactó de forma negativa a la resistencia, mientras que los rasgos ligados a la tolerancia fueron afectados por el tratamiento de daño pero no por el tipo de polinización.

7.1 Inducción de Tricomas y Resistencia

Como respuesta al daño, diferentes rasgos defensivos relacionados a la resistencia pueden ser inducidos (incrementados o producidos de *novo*) (Boege & Marquis, 2005), un ejemplo son los tricomas. Aunque pocos estudios han evaluado el efecto de la endogamia en la inducción de defensas, se ha encontrado que esta las afecta (Campbell et al., 2014; Kariyat et al., 2013).

En este estudio la endogamia no tuvo un efecto evidente sobre la densidad promedio de tricomas. Tampoco la densidad de tricomas difirió entre las plantas con daño y sin daño, demostrando que el daño por herbívoros no ocasionó inducción de tricomas. Estos resultados demuestran que independientemente del tratamiento de polinización, el daño foliar por el herbívoro especialista no influyó sobre este componente de resistencia en las plantas de *D. stramonium* estudiadas aquí.

En especies de plantas donde se ha evaluado si la endogamia afecta la inducción de caracteres defensivos se ha demostrado que los herbívoros pueden inducir a las plantas a producir más tricomas, espinas o compuestos químicos a pesar del nivel de endogamia (Kariyat et al, 2013; Campbell et al, 2014). Por ejemplo, Kariyat et al. (2014) encontraron en *Solanum carolinense* que la endogamia redujo la densidad de tricomas y espinas de forma constitutiva y la inducción de estos fue menor que en las plantas exógamas después de ser dañadas por larvas de *Manduca sexta*. En la misma especie, Campbell et al., (2014) reportaron que la endogamia impacta de forma perjudicial la inducción de fenoles después de que a las plantas se les removió tejido de forma manual.

Una explicación a la ausencia de respuesta de *D. stramonium* en este estudio es que la producción constitutiva de tricomas es tan alta, que su capacidad plástica para incrementar el número de tricomas está limitada ya que se ha alcanzado la máxima capacidad (Murrent et al., 2015). En relación a esto la densidad de tricomas promedio encontrada aquí, 8.372, es similar a la reportada para *D.*

stramonium en previos estudios de la misma población, 8.73 y 6.929, Castillo et al, (2015) y Valverde et al, (2001) respectivamente.

Por otra parte se encontró que el número de tricomas de las plantas con endogamia dañadas varió sustancialmente entre familias; el efecto detectado fue negativo, positivo o no se detectó. En cambio en las plantas exógamas incrementó la densidad promedio de tricomas en la mayoría de las familias (más tricomas). La variación en la densidad de tricomas en las plantas endógamas podría ser explicada por una irregularidad en la expresión coordinada de hormonas que controlan la expresión de tricomas en presencia o ausencia de daño (Campbell et al., 2014). En *S. Carolinense*, se ha observado que el número de tricomas y espinas cambia en plantas endógamas respecto a las exógamas (Kariyat et al., 2014), apoyando la idea de la disrupción del fenotipo defensivo por aumento en el nivel de endogamia. Así, las diferencias observadas entre familias genéticas en el presente estudio podrían ser explicadas por la diferente capacidad de respuesta que tienen las plantas endógamas y exógamas relacionado con los mecanismos que controlan los rasgos defensivos estructurales como los tricomas. Esta idea podría ser probada por medio de un estudio de variación en la síntesis de hormonas de las plantas.

Este estudio fue realizado en invernadero sin embargo la inducción de tricomas podría estar ligada a condiciones naturales en donde la presión de los depredadores seguramente es de mayor magnitud, tanto por la abundancia como por el tiempo de consumo, además de la presencia de patógenos o factores abióticos, que pueden ser

un factor importante que altere la respuesta defensiva de las plantas (Ivey et al., 2004; Keller & Waller, 2002).

A diferencia de la densidad de tricomas la cantidad de consumo observada fue mayor en las plantas endogámas que exogámas, mostrando depresión por endogamia en la resistencia, lo que concuerda con un gran número de estudios (Bello-Bedoy & Núñez-Farfán, 2010; Du et al., 2008; Kalske et al., 2014; Muola et al., 2011), sugiriendo que los tricomas por si mismos no determinan el nivel de daño que recibe una planta, y otros componentes defensivos diferentes a los tricomas fueron los responsables de la cantidad de consumo en este estudio. *D. stramonium* contiene alcaloides tropanicos como la atropina, hiosciamina y escopolamina (Bustos-Segura et al., 2014; Weaver & Warwick, 1984), quienes pueden cumplir funciones defensivas ante herbívoros (Shonle & Bergelson, 2000). Si bien se desconoce si la endogamia afecta dichos componentes, las plantas endogamas de *D. stramonium* son comúnmente más dañadas que las exogámas (Bello-Bedoy & Núñez Farfán 2010), y es muy posible que la endogamia altere metabolitos secundarios implicados en la defensa (Campbell et al., 2013) y/o provoque diferencias en la calidad nutricional del tejido foliar en las plantas con endogamia, en donde los herbívoros ocupan consumir mayor cantidad de tejido (Bello-Bedoy and Núñez-Farfán, 2010a). Además el papel de los tricomas puede ser diferente entre poblaciones y no necesariamente conferir resistencia (Valverde et al., 2001).

7.2 Tolerancia

La tolerancia amortigua el efecto del daño por herbívoros sobre la adecuación (Fornoni, 2011; Strauss et al., 1999), esta se puede visualizar como el incremento de la tasa neta fotosintética, aumento en el número de ramificaciones, aumento de la tasa relativa de crecimiento, mayor producción de estructuras reproductivas, entre otros (Strauss et al., 1999). En este estudio se encontró que las plantas fueron poco tolerantes al daño ejercido por *Lema daturaphila*. El índice de contenido de clorofila (ICC), la tasa relativa de crecimiento (TRC) y el esfuerzo reproductivo (total de flores, frutos y botones) presentaron una disminución por el tratamiento de daño, mostrando poca compensación de las plantas, en cambio el total de ramificaciones no fue impactado por el daño, mostrando compensación de las plantas en este rasgo. La capacidad de las plantas de tolerar el daño depende del estadio de vida, del ambiente (Heil, 2009), y de la especie que ejerce el daño (Fornoni, 2011), la respuesta de las plantas es variable y puede ser baja o hasta sobre-compensar (Heil, 2009). Se ha propuesto que la herbivoría en un estadio temprano puede beneficiar a las plantas (Strauss et al., 1999), sin embargo en este trabajo se encontró lo opuesto, las plantas fueron afectadas en diferentes rasgos de tolerancia cuando fueron dañadas por larvas de *L. daturaphila*, por lo consiguiente la adecuación se vio comprometida por la herbivoría.

Diferentes estudios han encontrado que la endogamia altera la tolerancia de las plantas. En *Cucurbita pepo* se encontró que la endogamia afecta el rendimiento reproductivo, en *D. stramonium* el número de frutos y semillas es afectado (Bello-

Bedoy et al, 2010a), la biomasa de las hojas y raíces en *Solanum carolinense* (Campbell et al, 2014), entre otros. Si bien la mayoría de los estudios muestran efecto negativo de la endogamia ante sus enemigos, otros han encontrado un efecto contrario, por ejemplo Bello-Bedoy et al., (2010b) en *D. stramonium* encontraron que *Trichobaris soror*, un depredador de semilla, se encontraba en menor abundancia en plantas endogamas que en exógamas, Ivey et al., (2004) encontraron que las plantas endogamas de *Mimulus guttatus* incrementaron la probabilidad de producir brotes o flores después de ser dañadas por *Philaenus spumarius*. En este estudio no se detectó algún efecto significativo de la endogamia sobre el esfuerzo reproductivo, el número de ramificaciones, la TRC y en el ICC, de este último rasgo hay muy poca información y el resultado fue similar a los otros rasgos mencionados asociados a la tolerancia. En resumen la endogamia no alteró la tolerancia de las plantas, lo que difiere de lo comúnmente esperado, que la compensación sea más baja en comparación a las plantas producto del entrecruzamiento (Carr & Eubanks, 2014).

La variación genética sirve como base para la evolución de la resistencia y la tolerancia a través de selección natural (Carr & Eubanks, 2014). En este trabajo todos los rasgos medidos presentaron variación debido a la familia y en la interacción familia $\times$ polinización (tabla 1), indicando la presencia de variación genética de los genes que controlan la depresión por endogamia entre familias. Previos estudios en *D. stramonium* han encontrado resultados similares en defensa y adecuación, apoyando los resultados encontrados aquí (Kariñho-Betancourt & Núñez-Farfán, 2015; Fornoni & Núñez-Farfán, 2000; Núñez-Farfán et al, 1996). La

heterogeneidad en los efectos de la depresión endogámica es explicada por una purga diferencial de la carga genética (i.e., genetic load), entre diferentes familias.

La variación genética es comprometida por la endogamia ya que disminuye la heterocigosis en las plantas y aumenta la homocigosis, como consecuencia los individuos pueden incrementar la expresión de alelos deletéreos (Núñez-Farfán et al., 2007), algo conocido como depresión por endogamia (Charlesworth & Charlesworth, 1987), lo que acarrea efectos adversos para los individuos. Como consecuencia la endogamia en plantas puede alterar la interacción con los herbívoros (Núñez-Farfán et al., 2007), reduciendo la producción de defensas por medio de la fijación de alelos que afecten a las defensas o afecten su valor nutricional, también se ha descrito que afecta la tolerancia (Carr & Eubanks, 2014). Aquí se encontró que la resistencia fue afectada por la endogamia mientras que la tolerancia no mostro algún efecto significativo debido a esta, lo cual refleja que el efecto de la endogamia es distinto entre estrategias defensivas y además que el efecto perjudicial no es una regla, este va depender de diferentes factores ambientales y de la historia de endogamia dentro de la población. Un gran número de grupos de plantas ha presentado transición del entrecruzamiento hacia la autopolinización (Goodwillie et al., 2005), sin embargo se cree que es la depresión por endogamia quien frena esto (Charlesworth & Willis, 2009), y por lo tanto permite que se mantenga el sistema de apareamiento mixto.

Para complementar los resultados encontrados en este experimento es necesario que se realicen estudios que manipulen diferentes especies de herbívoros que

actúen de forma individual y conjunta en plantas derivadas de cruas endogamas y exógamas de diferentes líneas genéticas, en ambientes naturales y en diferentes poblaciones, así se podrá ver si la inducción de defensas está determinada por una especie específica o por la presión conjunta de los herbívoros, se observaría si la capacidad de inducir defensas está limitada por las poblaciones y el papel que juega el sistema de apareamiento en la inducción, además lo ideal sería evaluar otros tipos de rasgos defensivos además de los tricomas.

8. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio la inducción de tricomas como respuesta al daño ejercido por *L. daturaphila* fue limitada por *D. stramonium* y no existieron diferencias ocasionadas por el tipo polinización. Sin embargo la endogamia afectó la resistencia de las plantas, mostrando depresión por endogamia en la resistencia, por lo cual el papel de los tricomas no tuvo importancia defensiva y se cree que otros rasgos asociados a la resistencia fueron los responsables de tal diferencia. El daño de *L. daturaphila* impactó a las plantas de forma negativa en diferentes rasgos asociados a la tolerancia, como consecuencia el herbivorismo afectó la adecuación de las plantas, pero la endogamia no alteró dicho efecto. Gran variación genética fue detectada en cada uno de los rasgos, tanto de resistencia como de tolerancia, esto permite que la resistencia y la tolerancia evolucionen por selección natural (Carr and Eubanks, 2014).

9. LITERATURA CITADA

Agrawal, A.A. (2001). Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* 294, 321–326.

Agrawal, A.A. (2011). Current Trends in The Evolutionary Ecology of Plant Defence. *Funct. Ecol.* 25, 420–432.

Agrawal, A.A., Conner, J.K., & Stinchcombe, J.R. (2004). Evolution of Plant Resistance and Tolerance to Frost Damage. *Ecol. Lett.* 7, 1199–1208.

Agrawal, Anurag A., Sharon Y. Strauss, & Michael J. Stout. Costs of Induced Responses and Tolerance to Herbivory in Male and Female Fitness Components of Wild Radish. *Evolution* (1999): 1093-1104.

Ashman, T. L. (2002). The Role of Herbivores in the Evolution of Separate Sexes From Hermaphroditism. *Ecology*, 83(5), 1175-1184.

Barrett, S.C.H. (2002). The Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3, 274–284.

Barton, K.E., Koricheva, J., Ashman, A.E.T., & DeAngelis, E.D.L. (2010). The Ontogeny of Plant Defense and Herbivory: Characterizing General Patterns Using Meta-Analysis. *Am. Nat.* 175, 481–493.

Bello-Bedoy, R., & Núñez-Farfán, J. (2010a). Cost of Inbreeding in Resistance to Herbivores in *Datura stramonium*. *Ann. Bot.* mcq038.

- Bello-Bedoy, R., & Núñez-Farfán, J. (2011). The Effect of Inbreeding on Defence Against Multiple Enemies in *Datura stramonium*. *J. Evol. Biol.* 24, 518–530.
- Bello-Bedoy, R., Cruz, L.L., & Núñez-Farfán, J. (2010b). Inbreeding Alters a Plant-Predispersal Seed Predator Interaction. *Evol. Ecol.* 25, 815–829.
- Boege, K., & Marquis, R.J. (2005). Facing herbivory as You Grow up: The Ontogeny of Resistance in Plants. *Trends Ecol. Evol.* 20, 441–448.
- Bustos-Segura, C., Fornoni, J., & Núñez-Farfán, J. (2014). Evolutionary Changes in Plant Tolerance Against Herbivory Through a Resurrection Experiment. *J. Evol. Biol.* 27, 488–496.
- Campbell, S.A. (2015). Ecological Mechanisms for The Coevolution of Mating Systems and Defence. *New Phytol.* 205, 1047–1053.
- Campbell, S.A., Halitschke, R., Thaler, J.S., & Kessler, A. (2014). Plant Mating Systems Affect Adaptive Plasticity in Response to Herbivory. *Plant J.* 78, 481–490.
- Carr, D.E., & Eubanks, M.D. (2002). Inbreeding Alters Resistance to Insect Herbivory and Host Plant Quality in *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *Evolution* 56, 22–30.
- Carr, D.E., & Eubanks, M.D. (2014). Interactions Between Insect Herbivores and Plant Mating Systems. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 185–203.
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 237–268.

Charlesworth, D., & Willis, J.H. (2009). The Genetics of Inbreeding Depression. *Nat. Rev. Genet.* 10, 783–796.

Coley, P.D., & Barone, J.A. (1996). Herbivory and Plant Defenses in Tropical Forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 305–335.

Darwin, C. (1876). *The Effects of Cross and Self Fertilisation in the Vegetable Kingdom* (J. Murray).

Delphia, C. M., Rohr, J. R., Stephenson, A. G., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2009). Effects of genetic variation and inbreeding on volatile production in a field population of horsenettle. *International Journal of Plant Sciences*, 170(1), 12-20.

Du, D., Winsor, J.A., Smith, M., DeNicco, A., & Stephenson, A.G. (2008). Resistance and Tolerance to Herbivory Changes With Inbreeding and Ontogeny in a Wild Gourd (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot.* 95, 84–92.

Dudash, M.R., Carr, D.E., and Fenster, C.B. (1997). Five Generations of Enforced Selfing and Outcrossing in *Mimulus guttatus*: Inbreeding Depression Variation at the Population and Family Level. *Evolution* 51, 54–65.

Eguiarte L.E., V. Souza & X. Aguirre (Compiladores). 2007. *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México

Espinosa, E.G., and Fornoni, J. (2006). Host Tolerance Does not Impose Selection on Natural Enemies. *New Phytol.* 170, 609–614.

Fornoni, J. (2011). Ecological and Evolutionary Implications of Plant Tolerance to Herbivory. *Funct. Ecol.* 25, 399–407.

Fornoni, J., & Núñez-Farfán, J. (2000). Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: genetic variation and costs for tolerance to defoliation. *Evolution*, 54(3), 789-797.

Fritz, R.S., & Simms, E.L. (1992). *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics* (University of Chicago Press).

Ghasemi, M., Arzani, K., Yadollahi, A., Ghasemi, S., & Khorrami, S.S. (2011). Estimate of Leaf Chlorophyll and Nitrogen Content in Asian Pear (*Pyrus serotina* Rehd.) by CCM-200. *Not. Sci. Biol.* 3, 91–94.

Goodwillie, C., Kalisz, S., & Eckert, C.G. (2005). The Evolutionary Enigma of Mixed Mating Systems in Plants: Occurrence, Theoretical Explanations, and Empirical Evidence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 47–79.

Heil, M. (2009). Plastic Defence Expression in Plants. *Evol. Ecol.* 24, 555–569.

Herrera, C.M., & Pellmyr, O. (2009). *Plant Animal Interactions: An Evolutionary Approach* (John Wiley & Sons).

Hörtensteiner, S., & Kräutler, B. (2011). Chlorophyll Breakdown in Higher Plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1807, 977–988.

- Ivey, C.T., Carr, D.E., & Eubanks, M.D. (2004). Effects of Inbreeding in *Mimulus guttatus* on Tolerance to Herbivory in Natural Environments. *Ecology* 85, 567–574.
- Jain, S.K. (1976). The Evolution of Inbreeding in Plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 7, 469–495.
- Johnson, M.T.J. (2011). Evolutionary Ecology of Plant Defences Against Herbivores. *Funct. Ecol.* 25, 305–311.
- Kalske, A., Mutikainen, P., Muola, A., Scheepens, J.F., Laukkanen, L., Salminen, J.-P., & Leimu, R. (2014). Simultaneous Inbreeding Modifies Inbreeding Depression in a Plant–Herbivore Interaction. *Ecol. Lett.* 17, 229–238.
- Karban, R., & Baldwin, I.T. (2007). *Induced Responses to Herbivory* (University of Chicago Press).
- Kariñho-Betancourt, E., & Núñez-Farfán, J. (2015). Evolution of Resistance and Tolerance to Herbivores: Testing The Trade-off Hypothesis. *PeerJ* 3, e789.
- Kariyat, R.R., Balogh, C.M., Moraski, R.P., Moraes, C.M.D., Mescher, M.C., & Stephenson, A.G. (2013). Constitutive and Herbivore-Induced Structural Defenses are Compromised by Inbreeding in *Solanum carolinense* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* 100, 1014–1021.
- Kariyat, R.R., Mena-Alí, J., Forry, B., Mescher, M.C., De Moraes, C.M., & Stephenson, A.G. (2012). Inbreeding, Herbivory, and The Transcriptome of *Solanum carolinense*. *Entomol. Exp. Appl.* 144, 134–144.

- Keller, L.F., & Waller, D.M. (2002). Inbreeding Effects in Wild Populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230–241.
- Kessler, A. (2015). The Information Landscape of Plant Constitutive and Induced Secondary Metabolite Production. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 47–53.
- Kessler, A., & Baldwin, and I.T. (2002). Plant Responses to Insect Herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 299–328.
- Kleunen, M. van, 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, 1400–1412.
- Kogan, M., & Goeden, R.D. (1970). The Biology of *Lema trilineata daturaphila*, (Coleoptera: Chrysomelidae) with Notes on Efficiency of Food Utilization by Larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63, 537–546.
- Lande, R., & Schemske, D.W. (1985). The Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression in Plants. I. Genetic Models. *Evolution* 39, 24–40.
- Lawrence, M J. 1984. The genetical analysis of ecological traits. In Shorrocks, B., (ed.) *Evolutionary Ecology* Black-well, Oxford.
- Leimu, R., Kloss, L., & Fischer, M. (2008). Effects of Experimental Inbreeding on Herbivore Resistance and Plant Fitness: The Role of History of Inbreeding, Herbivory and Abiotic Factors. *Ecol. Lett.* 11, 1101–1110.

Levin, D. A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology*, 3-15.

Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 431–450.

Moreno-García, M., Condé, R., Bello-Bedoy, R., & Lanz-Mendoza, H. (2014). The Damage Threshold Hypothesis and the Immune Strategies of Insects. *Infection, Genetics and Evolution*, 24, 25-33.

Muola, A., Mutikainen, P., Laukkanen, L., Lilley, M., & Leimu, R. (2011). The Role of Inbreeding and Outbreeding in Herbivore Resistance and Tolerance in *Vincetoxicum hirundinaria*. *Ann. Bot. mcr174*.

Murren, C. J., Auld, J. R., Callahan, H., Ghalambor, C. K., Handelsman, C. A., Heskell, M. A., ... & Pfennig, D. W. (2015). Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity*, 115(4), 293-301.

Nabity, P.D., Zavala, J.A., & DeLucia, E.H. (2009). Indirect Suppression of Photosynthesis on Individual Leaves by Arthropod Herbivory. *Ann. Bot.* 103, 655–663.

Nabity, P.D., Zavala, J.A., & DeLucia, E.H. (2012). Herbivore Induction of Jasmonic Acid and Chemical Defences Reduce Photosynthesis in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.* ers364.

- Núñez-Farfán, J., & Dirzo, R. (1994). Evolutionary Ecology of *Datura stramonium* L. In Central Mexico: Natural Selection for Resistance to Herbivorous Insects. *Evolution* 48, 423–436.
- Núñez-Farfán, J., Cabrales-Vargas, R.A., & Dirzo, R. (1996). Mating System Consequences on Resistance to Herbivory and Life History Traits in *Datura stramonium*. *Am. J. Bot.* 83, 1041–1049.
- Núñez-Farfán, J. & Eguiarte, L. (Compiladores). 1999. La evolución biológica. UNAM, México.
- Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., & Valverde, P.L. (2007). The Evolution of Resistance and Tolerance to Herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 541–566.
- Oliver, T.H., Leather, S.R., & Cook, J.M. (2009). Tolerance Traits and the Stability of Mutualism. *Oikos* 118, 346–352.
- Portman, S.L., Kariyat, R.R., Johnston, M.A., Stephenson, A.G., & Marden, J.H. (2015). Inbreeding Compromises Host Plant Defense Gene Expression and Improves Herbivore Survival. *Plant Signal. Behav.* 10, e998548.
- Richardson, A.D., Duigan, S.P., & Berlyn, G.P. (2002). An Evaluation of Noninvasive Methods to Estimate Foliar Chlorophyll Content. *New Phytol.* 153, 185–194.
- Shonle, I., & Bergelson, J. (2000). Evolutionary Ecology of the Tropane Alkaloids of *Datura Stramonium* L. (solanaceae). *Evolution* 54, 778–788.

- Stephenson, A. G., Leyshon, B., Travers, S. E., Hayes, C. N., & Winsor, J. A. (2004). Interrelationships among inbreeding, herbivory, and disease on reproduction in a wild gourd. *Ecology*, 85(11), 3023-3034.
- Strauss, S.Y., Agrawal, A.A., Strauss, S.Y., & Agrawal, A.A. (1999). The Ecology and Evolution of Plant Tolerance to Herbivory. *Trends Ecol. Evol.* 14, 179–185.
- Thompson, J. N. (1988). Variation in interspecific interactions. *Annual review of ecology and systematics*, 65-87.
- Thomson, V.P., Cunningham, S.A., Ball, M.C., & Nicotra, A.B. (2003). Compensation for Herbivory by *Cucumis sativus* Through Increased Photosynthetic Capacity and Efficiency. *Oecologia* 134, 167–175.
- 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.
- Weaver, S.E., & Warwick, S.I. (1984). The Biology of Canadian Weeds.: 64. *Datura stramonium* L. *Can. J. Plant Sci.* 64, 979–991.
- Wilbur L. Mountain (1987). Jimsonweed, *Datura stramonium* L. *Pa. Dep. Agric. Plant Ind.* 13, No. 1.
- Wright, S. (1922). Coefficients of Inbreeding and Relationship. *Am. Nat.* 56, 330–338.