

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

Variación en el contenido y composición de las ceras epicuticulares de *Cnidoscolus aconitifolius* en tres tipos de vegetación de la Península de Yucatán

**Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias y
Biotecnología de Plantas**

presenta :

Ilka Guadalupe Ortegón Campos

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2005

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología bajo la asesoría del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez a quien agradezco su confianza, los conocimientos transmitidos y el tiempo que dedicó a la revisión y corrección de la tesis.

Al Dr. Víctor Parra Tabla por su confianza y paciencia.

De manera especial a mi amiga, la Q.B.B. Fabiola Escalante Erosa por su asesoría en la parte experimental.

A los Dres. Astrid Ulrike Eben, Luz María Calvo Irabién y José Luis Andrade por sus valiosos comentarios y observaciones para el enriquecimiento del presente escrito.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en esta institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de la maestría, así como el apoyo económico del proyecto "Ecología y evolución de las interacciones herbívoro-planta-polinizador" (No. 33128).

Con mucho Amor le dedico este trabajo

A mi esposo Julio

A mis padres Juan y Elizabeth

A mis hermanos Vanessa, Juan José, Tatiana y Ángel

A mis sobrinas Elizabetha y Sofia

Contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción general	5
Capítulo 1 Antecedentes	
1.1 Variaciones ontogénicas y estacionales de las ceras vegetales	9
1.2 Factores ambientales y las ceras	10
1.3 Los herbívoros y las ceras	12
1.4 Especie de estudio	13
1.5 Objetivo general	16
1.5.1 Objetivos particulares	16
1.6 Referencias	17
Capítulo 2 Variación en el rendimiento de las ceras epicuticulares de <i>Cnidoscolus aconitifolius</i> en los diferentes tipos de vegetación	
2.1 Introducción	19
2.2 Materiales y Métodos	20
2.2.1 Caracterización ambiental de los sitios de estudio	20
2.2.2 Material biológico	22
2.2.3 Cuantificación de las ceras epicuticulares	23
2.2.4 Análisis estadísticos	23
2.3 Resultados y discusión	25
2.4 Conclusiones	32
2.5 Referencias	33
Capítulo 3 Variación interpoblacional de los componentes mayoritarios presentes en las ceras epicuticulares de <i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	
3.1 Introducción	35
3.2 Materiales y Métodos	37
3.2.1 Curvas de calibración	37
3.3.2 Condiciones del cromatógrafo	37
3.3.3 Análisis estadísticos	38
3.3 Resultados y discusión	39
3.4 Conclusiones	50
3.5 Referencias	51

Capítulo 4 Relación entre la cantidad y la composición química de las ceras epicuticulares con la herbivoría

4.1 Introducción	53
4.2 Materiales y Métodos	55
4.2.1 Análisis estadísticos	56
4.3 Resultados y discusión	56
4.4 Conclusiones	68
4.5 Referencias	69

Conclusiones generales y perspectivas

Conclusiones	73
Perspectivas	74

Lista de Cuadros

Cuadro 2.3.1 Análisis de varianza anidado del rendimiento ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ceras epicuticulares en las cuatro poblaciones de *Cnidoscolus aconitifolius*. Pág. 27

Cuadro 3.3.1 Matriz de correlación de Pearson entre los componentes químicos de las ceras epicuticulares de *Cnidoscolus aconitifolius*. Pág. 39

Cuadro 3.3.2 Matriz de correlación de Pearson entre la concentración de los componentes químicos de las ceras epicuticulares y la precipitación, temperatura máxima y evaporación (para el mes de septiembre) de los sitios de estudio. Pág. 42

Cuadro 3.3.3 Análisis de varianza anidados de las diferencias entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y entre hojas dentro de los individuos, en la concentración de los componentes mayoritarios de las ceras epicuticulares de *Cnidoscolus aconitifolius*. Pág. 43

Cuadro 4.3.1 Análisis de varianza univariado del índice de herbivoría entre las cuatro poblaciones de *Cnidoscolus aconitifolius*. Pág. 56

Cuadro 4.3.2 Regresiones lineales entre el rendimiento de *Cnidoscolus aconitifolius* y el índice de herbivoría para cada una de las poblaciones. Pág. 59

Cuadro 4.3.3 Regresiones lineales entre la concentración de los componentes principales de *Cnidoscolus aconitifolius* y el índice de herbivoría para cada una de las poblaciones. Pág. 62

Cuadro 4.3.4 Regresiones lineales entre la concentración de los componentes principales de *Cnidoscolus aconitifolius* y el índice de herbivoría en el conjunto de poblaciones. Pág. 66

Lista de Figuras

- Fig. 1.4.1** Componentes principales de las ceras epicuticulares de *Cnidoscolus aconitifolius*. Pág. 14
- Fig. 2.2.1** Ubicación de los sitios de estudio. a) Dzemul, b) Cuxtal y c) Hobonil. Pág. 22
- Fig. 2.3.1** Promedio ($\bar{x} \pm D.E$) del área foliar y el rendimiento de ceras totales en las poblaciones de Dzemul (a), Cuxtal (b) y Hobonil 1 (c) y Hobonil 2 (d). Págs. 25, 26
- Fig. 2.3.2** Rendimiento de las ceras epicuticulares totales en los sitios de estudio. Pág. 28
- Fig. 2.3.3** Precipitación promedio (a), temperatura máxima (b) y evaporación (c) en los sitios de estudio durante el año 2001. Págs. 29, 30
- Fig. 3.3.1** Ruta biosintética de las amirinas (tomado de Mann, 1986). Pág. 40
- Fig. 3.3.2** Concentración de los componentes alcano 1 (a), alcano 2 (b), amirenona (c), α -amirina (d), β -amirina (e), acetato de α -amirina (f) y acetato de β -amirina (g) en las cuatro poblaciones de estudio. Págs. 45-48
- Fig. 4.3.1** Índice de herbivoría ($\bar{x} \pm D.E$) en las cuatro poblaciones de estudio. Pág. 57
- Fig. 4.3.2** Correlación entre el índice de herbivoría con el rendimiento total de ceras para el conjunto de poblaciones. Pág. 59
- Fig. 4.3.3** Correlaciones entre el índice de herbivoría y los diferentes componentes principales de *Cnidoscolus aconitifolius* en las cuatro poblaciones de estudio. Págs. 62-65

Lista de Abreviaturas

AcO	Acetato
ANOVA	Análisis de varianza
GC	Gas chromatography
GMLH	Modelos lineales generalizados
msnm	metros sobre el nivel del mar
UV	ultravioleta

RESUMEN

Las plantas superiores están cubiertas por una capa de ceras epicuticulares que las protegen contra factores ambientales adversos como la sequía y la radiación UV; las ceras epicuticulares constituyen también la primera línea de defensa contra insectos y patógenos.

Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae) es un arbusto común en la Península de Yucatán, donde es utilizada con propósitos medicinales y alimenticios. Aunque esta especie cuenta con diversos mecanismos de defensa, se han observado niveles importantes de herbivoría altamente variable entre poblaciones. Dado que no se han llevado a cabo estudios químicos de las ceras epicuticulares en esta especie, y que no se ha explorado su variación espacial, ni su relación con la susceptibilidad de las plantas al ataque de los herbívoros, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variación en el contenido total de ceras y su composición química en cuatro poblaciones de *C. aconitifolius*, en tres tipos de vegetación diferentes del estado de Yucatán. Igualmente, exploramos su relación con la herbivoría.

Los resultados mostraron que existen diferencias significativas en el rendimiento total de ceras entre poblaciones. Las poblaciones se dividieron en dos grupos: uno formado por las poblaciones ubicadas en el tipo vegetacional selva mediana subperennifolia (Hobonil) con el mayor rendimiento, y otro formado por las poblaciones ubicadas en la selva baja caducifolia (Cuxtal) y en la selva baja espinosa (Dzemul). Entre los factores ambientales analizados, solo la temperatura tuvo una correlación positiva con el rendimiento total de ceras.

El análisis por cromatografía de gases de los diferentes extractos cerosos mostró que la composición química de las ceras varió significativamente entre poblaciones, formándose de manera general tres grupos; el de Cuxtal, con mayor proporción de componentes principales, seguido por el grupo de Dzemul y finalmente por las poblaciones de Hobonil. En este caso, la precipitación y la evaporación

estuvieron correlacionadas con la concentración de manera negativa y positiva, respectivamente.

El nivel de herbivoría fue también diferente entre poblaciones, con un mayor nivel en la población de Hobonil 2. La correlación entre la herbivoría y el rendimiento total de ceras en el conjunto de poblaciones fue positiva, lo que sugiere que la actividad de los insectos herbívoros puede estimular la producción de ceras epicuticulares en *C. aconitifolius*. Asimismo, algunos de los componentes principales de las ceras (alcano 1, acetato de α -amirina y acetato de β -amirina) mostraron una correlación negativa con la herbivoría, lo que sugiere que a una mayor concentración de estos componentes, el índice de herbivoría disminuye en el conjunto de poblaciones.

Se concluye que existen patrones de variación espacial en la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares en *C. aconitifolius* y que una combinación de factores bióticos y abióticos son la fuente de dicha variación.

ABSTRACT

All higher plants are covered by a layer of epicuticular waxes that protect them against adverse environmental factors such as drought and UV radiation; epicuticular waxes also constitute the first line of defense against insects and pathogens.

Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae) is a common bush growing in the Yucatan Peninsula, where is used as both food and medicine. Although this plant has a variety of defensive mechanisms, highly variable levels of herbivory have been observed among various populations. To date no chemical studies of the epicuticular wax of *C. aconitifolius* have been carried out and thus there are no reports on the variation of its chemical composition or its possible relationship with the plant susceptibility to herbivore attack; the objective of this study was to evaluate the variation in both the total wax content and its chemical composition of four populations of *C. aconitifolius* growing in three different vegetation types of the state of Yucatan, and exploring their correlation with herbivory.

Results showed that there were significant differences in the total wax content of the different populations. Two groups could be observed, one formed by the two populations located in the subhumid forest (Hobonil) and another one grouping the populations located in the dry forest (Cuxtal) and in the thorny dry forest (Dzemul). Among the environmental factors analysed only temperature was positively correlated with the total wax content.

A GC analysis of the different wax extracts showed that its chemical composition varied significantly among populations. Three main groups were formed depending on the concentration of the main chemical components, with Cuxtal having the higher concentration and those from Hobonil having the least amount of mayor components. Precipitation and evaporation showed a negative and positive correlation with the concentration of main components, respectively.

The herbivory level was also different between populations, with Hobonil 2 experiencing the highest level of attack. The correlation between herbivory and the total wax content in the group of populations was positive, suggesting that the activity of the herbivores stimulates the production of epicuticular waxes in *C. aconitifolius*. On the other hand, some of the main components of the epicuticular waxes (alkane 1, α -amyrin acetate and β -amyrin acetate) showed a negative correlation with herbivory, suggesting that higher concentrations of these components in the epicuticular wax lowers the level of herbivory.

Results showed that there exists variation in the amount and chemical composition of the epicuticular wax of *C. aconitifolius* and that a combination of biotic and abiotic factors are the cause of this variation.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La superficie de las plantas superiores representa la más grande interfase entre la biosfera y la atmósfera. Esta interfase existe en forma de una delgada membrana extracelular llamada cutícula vegetal. Las plantas superiores han estado cubiertas por la cutícula vegetal desde que habitaron los continentes hace aproximadamente 400 millones de años, siendo esta estructura protectora un requisito para la vida de las plantas fuera de un ambiente saturado de agua (Gutschick, 1999; Riederer & Schreiber, 1995).

La cutícula está compuesta por una serie de componentes heterogéneos entre los que se encuentran la cutina, la suberina y las ceras cuticulares. Estas últimas se encuentran embebidas en los polímeros de cutina y suberina y continúan como una capa amorfa hacia la superficie externa de la planta que se conocen como ceras superficiales o epicuticulares. En muchas plantas, las estructuras cristalinas de las ceras epicuticulares revisten esta capa, dándole a la superficie de la planta una apariencia gris (Salisbury & Ross, 1994).

La principal función de las ceras epicuticulares es la de proporcionar una barrera hidrofóbica a la superficie de la planta para preservar el balance de agua, evitando con esto la evaporación o pérdida excesiva de humedad. Las ceras epicuticulares también protegen a la planta contra la pérdida de solutos por la escorrentía foliar, contra la invasión de hongos y bacterias y contra daños que puedan ser causados por radiación UV (Post-Beittenmiller, 1996).

Las ceras epicuticulares son sintetizadas en respuesta a señales ambientales tales como intensidad de luz, fotoperíodo, humedad y frío, entre otras, y su presencia es testimonio del papel esencial que desempeñan en la adaptación de la planta al ambiente aéreo. El hecho de que factores ambientales influyan en la composición y cantidad de ceras es evidencia de que su producción es un proceso regulado activamente (Post-Beittenmiller, 1996).

La composición química de las ceras epicuticulares en las plantas varía de manera interespecífica e intraespecífica y estas diferencias se observan también al comparar diferentes estructuras en una misma planta, plantas de diferente edad y condiciones ambientales donde dichas plantas se desarrollan. Las diferencias en la cantidad y composición de las ceras sugieren que además de actuar como barrera contra la deshidratación, éstas tienen una variedad de funciones ecológicas entre las que se encuentran las interacciones planta-insecto (Eigenbrode & Espelie, 1995). De hecho existen una gran cantidad de evidencias que sugieren un papel combinado de las ceras epicuticulares en respuesta a factores tanto abióticos como bióticos. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en plantas de importancia económica y en condiciones controladas y muy pocos estudios se han llevado a cabo en condiciones naturales donde se explore además el papel de ambos tipos de factores, y en particular en especies de distribución tropical.

Cnidoscolus aconitifolius es un arbusto monoico que se distribuye de manera amplia en la Península de Yucatán. En particular en el estado de Yucatán esta especie se encuentra en tipos de vegetación contrastantes que difieren en los parámetros climáticos básicos (i.e. precipitación y temperatura), por lo que es de esperar que las características cuantitativas y cualitativas de las ceras epicuticulares varíen de acuerdo a dichas diferencias climáticas. Sin embargo, también se ha observado que a pesar de que *C. aconitifolius* presenta diferentes tipos de defensa para evitar la herbivoría (Parra-Tabla et al. 2004), esta especie puede ser atacada de manera constante e intensa por diferentes especies de herbívoros, pero también con un patrón espacialmente variable. Estas diferencias en los patrones de herbivoría pueden estar igualmente relacionadas con la cantidad de ceras y la composición química de las mismas. Así, el objetivo de este estudio fue la cuantificación de las ceras epicuticulares totales y de los metabolitos secundarios presentes en la hojas de *C. aconitifolius* en diferentes tipos de selva, así como establecer una relación entre la cantidad y composición química de las ceras con los niveles de herbivoría observados.

En concreto la importancia y originalidad de este estudio radica principalmente en conocer la naturaleza de la producción de las ceras epicuticulares en condiciones naturales en una especie tropical y en el efecto que pueden tener sobre sus herbívoros potenciales. De manera inicial en este trabajo se presentan los antecedentes de los trabajos realizados sobre las ceras epicuticulares, seguido por una análisis de la variación obtenida en el rendimiento y composición química de las ceras en los diferentes tipos de selva y la correlación entre las ceras y las características climáticas de cada sitio. Posteriormente se explora la posible relación entre la cantidad y composición química de las ceras con los niveles de herbivoría encontrados. Finalmente se concluye de acuerdo a los resultados observados cuál es el papel potencial de los factores bióticos y abióticos en la explicación de la naturaleza cuantitativa y cualitativa de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*.

REFERENCIAS

- Eigenbrode, S. & K. Espelie.** 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insects herbivores. *Annual Review of Entomology*, **40**: 171-194.
- Gutschick, V.** 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist*, **143**: 3-18.
- Parra-Tabla, V., Rico-Gray, V. & Carbajal, M.** 2004. Effect of defoliation on leaf growth, sexual expression and reproductive success of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Plant Ecology*, **173**: 153-160.
- Post-Beittenmiller, D.** 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 405-430.
- Riederer, M. & L. Schreiber.** 1995. Waxes-The transport barriers on plant cuticles. In: *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. Hamilton R.J. (ed). The Oily Press. U.K.
- Salisbury, F. & C. Ross.** 1994. *Fisiología Vegetal*. Ed. Iberoamérica. pp 343.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

En algunas plantas superiores se reportan estudios del contenido y composición de las ceras epicuticulares presentes tanto en hojas, como en semillas y otras partes de la planta (Manners & Davis, 1984). El estudio de la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares en las hojas es de importancia por sus aplicaciones en áreas tan diferentes como las interacciones planta-insecto (Eigenbrode et al. 1991), las relaciones quimiotaconómicas entre diferentes especies (García et al. 1995) y su importancia en la permeabilidad cuticular (i.e sensibilidad a agentes químicos) (Baker & Hunt, 1981); existen además estudios que han relacionado estos parámetros con la morfología de las ceras (Baum et al. 1989; Freeman et al. 1979) y la edad de la planta (Gülz et al. 1991; Avato et al. 1984).

1.1 Variaciones ontogénicas y estacionales de las ceras vegetales

Todos los órganos aéreos de las plantas superiores están cubiertos por una capa cerosa continua en la superficie de la cutícula, la cual protege a las células vegetales contra diversos factores ambientales. Esta capa de ceras epicuticulares es necesaria también para una transpiración controlada y para el intercambio gaseoso a través de los estomas. Durante el desarrollo de las hojas, el rendimiento y composición química de las ceras epicuticulares cambia, por lo que el peso total, concentración y composición química de las ceras epicuticulares puede ser solo momentánea (Gülz, et al. 1991).

Existen varios trabajos que reportan el efecto de la variación ontogénica en la composición química de las ceras vegetales. Para varias familias de plantas se han observado variaciones importantes en los patrones de alcanos en sus ceras, i.e. el número de alcanos aumenta durante la maduración y, en la mayoría de los casos, se observa un incremento en la longitud de la cadena de los diferentes hidrocarburos conforme aumenta la edad de la hoja (Bianchi, 1995).

Igualmente se han reportado cambios cuantitativos y cualitativos en la composición de las ceras epicuticulares de *Tilia tomentosa*, encontrándose que las ceras de las hojas enrolladas contienen series homólogas de alcanos, ésteres, alcoholes, ácidos grasos, así como triterpenos pentacíclicos del tipo de las amirinas; con el desenrollamiento de las hojas, 15 días después, en las ceras se observa la presencia del acetato de β -aminerilo, seguido de la síntesis de aldehídos. El que esta transformación ocurra durante el desenrollamiento de las hojas, sugiere que la luz puede ser el factor de activación de las enzimas que dirigen la síntesis de estas sustancias cerosas. Este estudio confirma que la biosíntesis de ceras es un proceso dinámico que, además de afectar cualitativa y cuantitativamente la composición de las ceras, determina la formación de homólogos dentro de cada clase de metabolitos (Gülz et al. 1991).

En un estudio comparativo sobre los cambios que ocurren en las ceras epicuticulares en diferentes estructuras de plántulas y plantas maduras del sorgo, se encontró que los componentes cerosos son los mismos tanto en las hojas jóvenes como en las maduras, aunque en proporciones diferentes. Mientras que en las hojas jóvenes predominan los alcoholes, en las hojas maduras los componentes predominantes son los ácidos grasos libres (Avato et al. 1984). Lo anterior sugiere que las diferencias en la composición de las ceras epicuticulares puede deberse a fluctuaciones climáticas y estacionales, a la transformación de los constituyentes formados durante los períodos iniciales de crecimiento, y/o a la activación de rutas metabólicas adicionales durante el desarrollo ontogénico.

1.2 Factores ambientales y las ceras

Generalmente se acepta que la capa cerosa interpuesta entre los órganos vegetales y su ambiente juega un papel importante en todos los procesos físicos y fisiológicos que ocurren en los tejidos superficiales. La naturaleza química de los componentes de las ceras epicuticulares contribuyen a controlar de manera efectiva el intercambio hídrico y gaseoso e influyen en la retención y redistribución de productos

químicos; de esta manera las ceras contrarrestan los cambios drásticos que ocurren en el ambiente (Bianchi, 1995).

Se ha reportado que la resistencia al congelamiento de las plantas de maíz durante períodos de frío involucra un aumento en la producción de ceras epicuticulares y una variación en la composición química de las mismas.

En las variedades de maíz menos resistentes al frío se observó una mayor apertura estomática y bajas cantidades de ceras epicuticulares, mientras que las variedades resistentes mostraron la presencia de estomas cerrados y una mayor cantidad de ceras epicuticulares. Con base en estos resultados se sugiere que la retención de agua en la variedad de maíz resistente está dada por su metabolismo, por una regulación estomática alterada y por su alto contenido de ceras epicuticulares (Vigh et al. 1981).

De manera similar se han reportado incrementos en la producción de ceras epicuticulares como consecuencia de un aumento en la radiación solar y una disminución en los valores de temperatura y humedad relativa, confirmando que la luz y la temperatura también influyen sobre la síntesis y composición de las ceras epicuticulares (Sheperd et al. 1995; Whitecross & armstrong, 1971). Un ejemplo de lo anterior está dado por las diferencias observadas en la composición de las ceras epicuticulares en *Brassica oleraceae* y *Brassica napus* mantenidas bajo dos diferentes intensidades de luz. Los resultados obtenidos mostraron una mayor proporción de alcanos, ácido octacosanoico, alcoholes primarios y ésteres de cadena larga en las ceras de las plantas iluminadas y una menor proporción de aldehídos, cetonas y alcoholes secundarios en las plantas ubicadas en la sombra (Sheperd et al. 1995).

Aún cuando es común observar altos rendimientos de ceras epicuticulares en especies que crecen en condiciones de sequía, e.g. la concentración de los ésteres cerosos en las hojas de especies del género *Phaseolus* aumenta hasta 20 veces bajo condiciones de estrés hídrico (Anderson et al. 1984), Svenningsson y Liljenberg

(1986) no encontraron una correlación en la cantidad y composición de las ceras epicuticulares en plantas de avena como respuesta al estrés hídrico.

1.3 Los herbívoros y las ceras

Una de las principales funciones ecológicas de las ceras epicuticulares es la de mediar en las interacciones planta-insecto (Eigenbrode & Espelie, 1995; Eigenbrode et al. 1991; Renmwick, 1989; Chapman & Bernays, 1989). La conducta de muchos insectos al llegar a la superficie vegetal indica que la están evaluando como posible fuente de alimento o como sitio de oviposición (Eigenbrode & Espelie, 1995; Chapman & Bernays, 1989).

Las ceras contribuyen a la defensa de la planta afectando a los insectos mediante toxicidad directa de sus componentes o mediante efectos físicos que impiden la herbivoría o dificultan el movimiento de los insectos (Eigenbrode & Espelie, 1995).

Aunque en ocasiones la cubierta cerosa puede ser eficaz en la defensa vegetal, algunas veces las formas no-cerosas o con una baja cantidad de ceras parecen ser las más resistentes (Juniper, 1995). Un ejemplo de lo anterior está dado por el trabajo de Eigenbrode y Espelie (1995) en el que se compararon dos diferentes fenotipos de un grupo de plantas, incluyendo *Brassica oleraceae* y *Hordeum vulgare*. El fenotipo "brillante" de *B. oleraceae*, caracterizado por tener en las hojas cristales lipídicos muy simples y cantidades reducidas de lípidos, limita hasta en un 90% las poblaciones de insectos herbívoros cuando se le compara con el fenotipo ceroso-"normal", caracterizado por tener cristales lipídicos más complejos y en mayor cantidad.

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo para evaluar la composición de las ceras epicuticulares en una especie de frambuesa (*Rubus idaeus*) y su relación con la resistencia de las plantas a la infestación de un áfido, se encontró que la composición química de las ceras en hojas jóvenes era significativamente diferente a la de las hojas maduras, principalmente en la cantidad de terpenos y alcoholes

primarios, por lo que a estos metabolitos se les identificó como los responsables de la mayor resistencia de las hojas jóvenes al áfido (Sheperd et al. 1999).

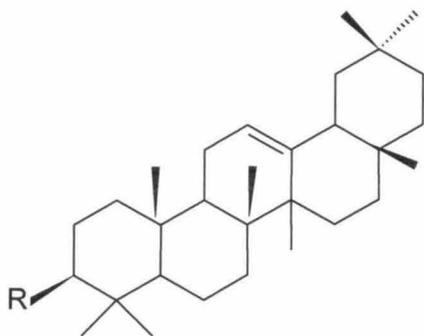
1.4 Especie de estudio

Cnidoscolus aconitifolius es una especie que pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es un arbusto o árbol pequeño que mide entre 1 y 3 m de altura, posee tallos con tricomas urticantes delgados que miden entre 0.7 y 3 mm de largo. Presenta inflorescencias umbeliformes con flores blancas, femeninas y masculinas. La época de floración es durante los meses de abril y agosto. Las hojas son grandes, profundamente lobuladas, con lóbulos acuminados prominentes a lo largo del margen, con pocos tricomas urticantes (Burger & Huft, 1995).

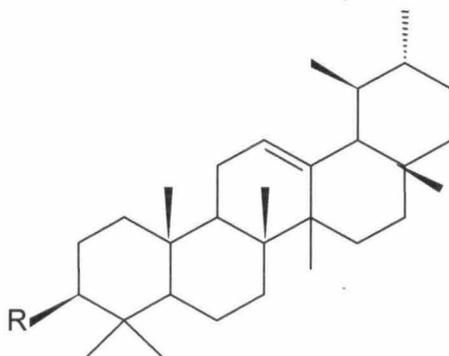
Los tricomas pican e irritan la piel causando un dolor intenso que persiste por horas, algunas veces acompañado de hinchazón y verrugas (Standley & Steyermark, 1949).

Las hojas de esta especie tienen una tasa de crecimiento promedio de 3 semanas (Carbajal, 1998) y se caracterizan por la presencia de glándulas en forma de disco encontradas en el ápice del pecíolo. Esta especie crece en áreas deciduas o siempreverdes, entre 0 y 1200 msnm. Se cree que es nativa del Sureste de México y se distribuye desde México hasta Perú (Burger & Huft, 1995).

Recientemente se identificaron los componentes principales de las ceras epicuticulares de *Cnidoscolus aconitifolius*. Los cinco componentes corresponden a los acetatos de α -amirina y β -amirina, la amirenona, una mezcla de α -amirina y β -amirina y una mezcla de alcanos (Escalante et al. 2004) (Fig. 1.4.1).



R: OCOCH₃ acetato de β-amirina
 R: OH β-amirina
 R: =O amirenona



R= OCOCH₃ acetato de α-amirina
 R= OH α-amirina

Fig. 1.4.1 Componentes principales de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*.

Cnidocolus aconitifolius es un buen modelo biológico para el estudio de las ceras epicuticulares, ya que por un lado se le puede encontrar en diferentes ambientes con características climáticas contrastantes y por otro lado porque en esos diferentes ambientes presenta niveles de herbivoría distintos. Estas características permiten evaluar el papel tanto de los factores abióticos (e.g. precipitación y temperatura) como de los biológicos (interacción con herbívoros), en la producción y naturaleza química de las ceras.

Respecto a la herbivoría se ha observado que a pesar de que *C. aconitifolius* tiene mecanismos de defensa físicos (espinas urticantes en sus tallos, hojas, flores y frutos) y de asociación mutualista (hormigas de las especies *Camponotus sp*, *C. planatus*, y *Pseudomyrmex sp*), esta planta es usualmente atacada y en ocasiones de manera muy intensa, por orugas de mariposas (*Chioides catillus albofasciatus* y *Anteos maerula*) y saltamontes (orthoptera) (Carbajal, 1998). Se ha observado que los patrones de herbivoría en *C. aconitifolius* varían considerablemente entre diferentes poblaciones; en algunas poblaciones las larvas de mariposa consumen hasta un 80% del total de las hojas, en otras poblaciones el daño causado por los herbívoros es muy bajo (menos del 2% de área foliar, Parra-Tabla, et al. 2004). Adicionalmente, experimentos de defoliación artificial en condiciones naturales han demostrado que *C. aconitifolius* presenta respuestas inducidas a la herbivoría mediante la producción de tricomas urticantes, pero también que esta respuesta es altamente dependiente del ambiente en el que se encuentren las plantas (Abdala 2004).

Dado que las diferencias en los patrones de herbivoría pueden estar relacionadas con la cantidad de ceras epicuticulares en las hojas de *C. aconitifolius* y/o con la presencia o ausencia de uno o más metabolitos secundarios, en el presente estudio se llevó a cabo un análisis de la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares de cuatro poblaciones de *C. aconitifolius*, distribuidos en tres tipos de vegetación contrastante del estado de Yucatán, México.

1.5 Objetivo general

Evaluar la variación en la cantidad y en la composición química de las ceras epicuticulares de *Cnidoscolus aconitifolius* en tres tipos de vegetación contrastantes.

1.5.1 Objetivos particulares

- Cuantificar las ceras totales de cuatro poblaciones en tres tipos de vegetación.
- Cuantificar los componentes principales de los extractos cerosos de *C. aconitifolius* en cuatro poblaciones.
- Comparar la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius* en tres tipos de vegetación.
- Evaluar la relación entre la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*, con la precipitación, temperatura y evaporación.
- Explorar la relación entre la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*, con su resistencia o susceptibilidad a la herbivoría.

1.6 REFERENCIAS

- Abdala, L.** 2003. Variación geográfica e inducción de tricomas como respuesta a la defoliación en tres poblaciones de *Cnidoscolus aconitifolius* (MILL) I.M John (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Anderson, W., Gellerman, J. & H. Schlenk.** 1984. Effect of drought on phytol wax esters in *Phaseolus* leaves. *Phytochemistry*, **23**: 2695-2696.
- Avato, P., Bianchi, G. & G. Mariani.** 1984. Epicuticular waxes of sorghum and some compositional changes with plant age. *Phytochemistry*, **23**: 2843-2846.
- Baker, E. & Hunt, G.** 1981. Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration. *New Phytologist*, **88**: 731-747.
- Baum, B., Tulloch, P. & G. Bailey.** 1989. Epicuticular waxes of the genus *Hordeum*: a survey of their chemical composition and ultrastructure. *Canadian Journal of Botany*, **67**: 3219-3226.
- Bianchi, G.** 1995. Plant waxes. *In: Waxes: chemistry, molecular biology and functions.* Hamilton R.J. (ed). The Oily Press. U.K.
- Burger, W. & M. Huft.** 1995. Flora Costaricensis. Fieldiana: Botany, **36**: 13-854.
- Carbajal, M.** 1998. Biología reproductiva y efectos de la herbivoría en la expresión sexual y el éxito reproductivo en la planta ginomonoica *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill) I.M. John (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. F.M.V.Z. UADY. Mérida, Yucatán, México.
- Chapman, R. & E. Bernays.** 1989. Insect behavior at the leaf surface and learning as aspects of host plant selection. *Experientia*, **45**: 215-222.
- Eigenbrode, S., Espelie, K. & A. Shelton.** 1991. Behavior of neonate diamondback moth larvae [*Plutella xylostella* (L.)] on leaves and on extracted leaf waxes of resistant and susceptible cabbages. *Journal of Chemical Ecology*, **17**: 1691-1703.
- Eigenbrode, S. & K. Espelie.** 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insects herbivores. *Annual Review of Entomology*, **40**: 171-194.
- Escalante, F., Ortegón, I., Parra, V. & L. Peña.** 2004. Chemical composition of the epicuticular wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. *Revista de la Sociedad Química de México*, **48**: 24,25.

- Freeman, B., Albrigo, L. G. & R. Biggs.** 1979. Cuticular waxes of developing leaves and fruit of blueberry, *Vaccinium ashei* Reade cv. Bluegem. Journal of the American Society of Horticultural Sciences, **104**: 398-403.
- García, S., Hieden, H. & C. Hubbuch.** 1995. Triterpene methyl ethers from palmae epicuticular waxes. Phytochemistry, **36**: 1381-1382.
- Gülz, P., Müller, E. & R. Prasad.** 1991. Developmental and seasonal variations in the epicuticular waxes of *Tilia tomentosa* leaves. Phytochemistry, **30**: 769-773.
- Juniper, B.** 1995. Waxes on plant surface and their interactions with insects. In: Waxes: chemistry, molecular biology and functions. Hamilton R.J. (ed). Hamilton R.J. (ed). The Oily Press. Great Britain.
- Manners, G. & Davis, D.** 1984. Epicuticular wax constituents of North American and European *Euphorbia esula*. Phytochemistry, **23**: 1059-1065.
- Parra-Tabla, V., Rico-Gray, V. & M. Carbajal.** 2004. Effect of defoliation on leaf growth sexual expression and reproductive success of *Cnidioscolus acnitifolius* (Euphorbiaceae). Plant Ecology, **173**: 153-160.
- Renwick, J.** 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. Experientia, **45**: 223-227.
- Sheperd, T., Robertson, G., Griffiths, D., Birch, A. & G. Duncan.** 1995. Effects of environment on the composition of epicuticular wax from Kale and Swede. Phytochemistry, **40**: 407-417.
- Sheperd, T., Robertson, G., Griffiths, D. & A. Birch.** 1999. Epicuticular wax composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) Phytochemistry, **52**: 1239-1254.
- Stadley, P. & Steyermaek, J.** 1949. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. Vol. 24 Part. VI. Chicago. pp 59-60.
- Svenningsson, M. & C. Liljenberg.** 1986. Changes in cuticular transpiration rate and cuticular lipids of oat (*Avena sativa*) seedlings induced by water stress. Physiologia Plantarum, **66**: 9-14.
- Vigh, L., Horvath, I., Farkas, T., Mustardy, L & A. Faludi-Daniel.** 1981. Stomatal behavior and cuticular properties of maize leaves of different chilling-resistance during cold treatment. Physiologia Plantarum, **51**: 287-290.
- Whitecross, M. & D. Armstrong.** 1971. Environmental effects on epicuticular waxes of *Brassica napus*. L. Australian Journal of Botany, **20**: 87-95.

CAPITULO 2

VARIACIÓN EN EL RENDIMIENTO DE LAS CERAS EPICUTICULARES DE *Cnidioscolus aconitifolius* EN DIFERENTES TIPOS DE VEGETACIÓN

2.1 INTRODUCCIÓN

Las ceras epicuticulares de las plantas superiores proveen una barrera físico-química que ayuda a las plantas en su resistencia a la sequía y a las enfermedades, y también juegan un papel importante en el reconocimiento del hospedero para ciertos insectos (Post-Beittenmiller, 1996).

Se han realizado estudios destacando la variación en el rendimiento de las ceras epicuticulares que se puede esperar entre especies, mientras que otros indican algún grado de variación intraespecífica (Baum et al, 1989; Whitecross & Armstrong, 1971) . Otros estudios han mostrado o insinuado que algunos factores ambientales influyen en el rendimiento de ceras epicuticulares (Sheperd et al, 1995; Mayeux & Jordan 1984; Baker, 1974). En *Brassica napus* y *Hordeum vulgare* se ha reportado un incremento en la producción de ceras epicuticulares como consecuencia de un aumento en la radiación solar y una disminución en la temperatura y humedad relativa. Se ha observado bajo condiciones controladas, que los individuos en la sombra muestran una tendencia a reducir el rendimiento de ceras a mayores temperaturas (aproximadamente 27° C) y que individuos expuestos a la luz y a bajas temperaturas (aproximadamente 22° C) aumentan su rendimiento (Whitecross & Armstrong, 1971).

Se puede esperar que la cantidad total de ceras en las plantas esté correlacionada con las condiciones ambientales del sitio en el cual se desarrollan, particularmente si estos sitios difieren en la cantidad de luz UV, porcentaje de humedad, temperatura, precipitación y ataque de insectos, todos ellos factores que afectan la producción de ceras (Rashote et al. 1997).

En este capítulo se presentan los resultados en el rendimiento total de ceras en individuos de las diferentes poblaciones de estudio, así como su relación con diferentes variables ambientales, esperándose, dado el gradiente de precipitación en la Península de Yucatán, una mayor producción de ceras epicuticulares en el tipo de vegetación más seco y una menor en el tipo de vegetación más húmedo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Caracterización ambiental de los sitios de estudio

Para el presente trabajo se estudiaron individuos de cuatro poblaciones de *Cnidocolus aconitifolius* ubicadas en tres tipos de vegetación contrastantes: a) selva baja caducifolia espinosa; b) selva baja caducifolia y c) selva mediana (Fig. 2.2.1). Estos tres tipos de vegetación se encuentran en un gradiente noroeste-suroeste del estado de Yucatán y se caracterizan por sus diferencias en cuanto a componentes florísticos, diversidad, estructura vegetacional, precipitación y tipo de suelo (Flores & Espejel, 1994).

La primera población, Dzemul, se localiza en la parte noreste del estado de Yucatán a 7 m snm (21° 31' N, 21° 17' W), con una precipitación anual de 450-650 mm y una temperatura media anual de 25.9°C, cubierta en su mayor parte por selva baja caducifolia espinosa. Los suelos son arenosos y con una abundante acumulación de hojarasca (Duch 1988). La vegetación principal de este sitio incluye árboles de la familia Fabaceae como *Acacia collinsii*, *Lisiloma latisiliqua*, *Mimosa bahamensis*, *Piscidia piscipula*, *Bursera simaruba*, *Jatropha gauderrii*, y herbáceas como *Agave angustifolia*, *Bromelia karats*, e *Ipomea crinicalyx* (Flores & Espejel, 1994).

La segunda población, Cuxtal, localizada hacia la parte centro-sureste del estado de Yucatán (20° 48' N, 89° 42' W), con una precipitación anual de 750-1200 mm y una temperatura media anual que oscila entre 26°C a 27.6°C. Está cubierta en su mayoría por selva baja caducifolia. Los suelos son planos, poco profundos, calcáreos, con gran afloración de roca. Este tipo de selva está compuesto por un estrato arbóreo y otro herbáceo con bejucos leñosos, también caducos, compuestos

por especies de las familias Bignoniaceae, Fabaceae y Combretaceae. Las principales especies son *Jatropha gaumeri*, *Metopium brownei*, *Bursera simaruba*, *Maclura tinctoria*, *Bumelia retusa*, entre otras (Flores & Espejel, 1994).

En el sitio de Hobonil se ubicaron dos poblaciones de *C. aconitifolius*. Este sitio se encuentra localizado en la parte sureste del estado (20° 00' N, 89° 01' W) a 150 km de Dzemul, a 36 msnm, con una precipitación anual de 1300-1500 mm y una temperatura media anual que oscila entre 25.9°C a 26.6°C. Se encuentra cubierto en su mayoría por selva mediana. La especies principales en este tipo de vegetación incluyen a *Vitex gaumerii*, *Enterolobium cycloparum*, *Guazuma ulmifolia*, *Sabal mexicana*, *Plumeria rubra*, *Ceiba aesculifolia* y las herbáceas *Aphelandra deppeana* y *Hamelia patens* (Flores & Espejel, 1994).

Las principales diferencias entre las dos poblaciones de *C. aconitifolius* ubicadas en Hobonil son la cantidad de luz a la que los individuos están expuestos y a una diferencia mínima respecto a la altura sobre el nivel del mar. En una de las poblaciones (Hobonil 1), los individuos de *C. aconitifolius* se encuentran cubiertos por la vegetación circundante, en tanto que la otra (Hobonil 2), se encuentra sobre un montículo de piedra a aproximadamente a 30 msnm y los individuos se encuentran completamente expuestos a la luz solar.

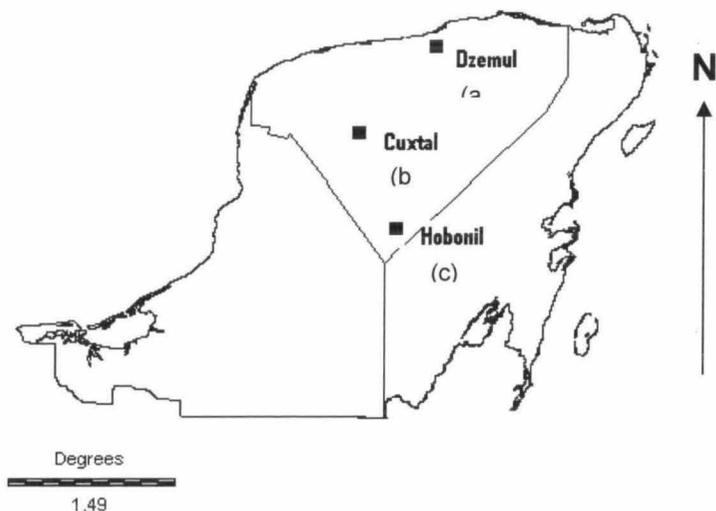


Fig. 2.2.1. Ubicación de los sitios de estudio. a) Dzemul, b) Cuxtal y c) Hobonil.

2.2.2 Material biológico

De cada población se seleccionaron al azar 10 individuos adultos de aproximadamente 2.5 m de altura, que tuvieran al menos 6 hojas enteras (no afectadas por la herbivoría) por individuo, ubicadas justo por debajo de los nuevos brotes foliares (hojas jóvenes); estas hojas se etiquetaron para su estudio posterior. Las colectas de material vegetal se realizaron al final del mes de septiembre y a principio del mes de octubre de 2001, durante la época de lluvias. Una vez realizada la colecta, las hojas se mantuvieron en bolsas de plástico, dentro de una nevera con hielo, para mantenerlas frescas hasta su procesamiento en el laboratorio. Los datos ambientales fueron proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CNA)

tomándose los datos de las estaciones meteorológicas más cercanas a las poblaciones de estudio, siendo para la población de Dzemul la estación localizada en el puerto de Telchac, para Cuxtal la estación de la Ciudad de Mérida y para Hobonil la estación localizada en Peto.

2.2.3 Cuantificación de las ceras epicuticulares

De acuerdo a lo reportado en la literatura, las ceras epicuticulares se obtienen comúnmente sumergiendo la parte de interés en un disolvente no polar (e.g. hexano) por un período de 30 seg (Arroyo, 2000; Rashote et al. 1997). Para la extracción de las ceras se tomaron dos hojas de cada individuo etiquetado y se sumergieron en un vaso de precipitado con 500 ml de hexano durante 30 seg, sin sumergir la parte cortada y así evitar extraer otros metabolitos que no fueran ceras. El extracto ceroso se obtuvo al eliminar el disolvente en un rotavapor y cada extracto se redisolvió con diclorometano y se transfirió a viales. El disolvente presente en los viales se eliminó con un flujo de nitrógeno y los viales se colocaron a presión reducida hasta peso constante.

Para realizar la cuantificación (rendimiento) de las ceras totales se dividió la cantidad de extracto ceroso entre el área foliar total. Este procedimiento se realizó por triplicado en cada uno de los individuos analizándose un total de 120 hojas para las cuatro poblaciones. El área de las hojas se midió en cm^2 con un medidor de área foliar modelo CI-202.

2.2.4 Análisis estadísticos

Para evaluar posibles diferencias en el tamaño de las hojas entre las poblaciones se realizó un ANOVA de una vía comparando el área foliar en las cuatro poblaciones se realizo un ANOVA de una vía, en tanto que para la evaluación de las diferencias en el rendimiento de ceras epicuticulares entre hojas de cada individuo, entre individuos y entre poblaciones se realizó un ANOVA anidado utilizando el modulo GMLH del paquete estadístico SYSTAT, ver. 10.0 (SYSTAT 2000); finalmente

se llevó a cabo un análisis de comparación de medias de Tukey para determinar cuales poblaciones fueron estadísticamente diferentes.

Para determinar posibles relaciones entre el rendimiento total de ceras en las cuatro poblaciones, con factores como la precipitación, la evaporación y la temperatura máxima del mes de septiembre, se realizaron análisis de regresión simple con múltiples valores en "X" (Zar, 1984).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de área foliar y de rendimiento total de ceras epicuticulares para los individuos de las poblaciones de Dzemul, Cuxtal, Hobonil 1 y Hobonil 2 se presentan en la figuras 2.3.1a, b, c, d respectivamente.

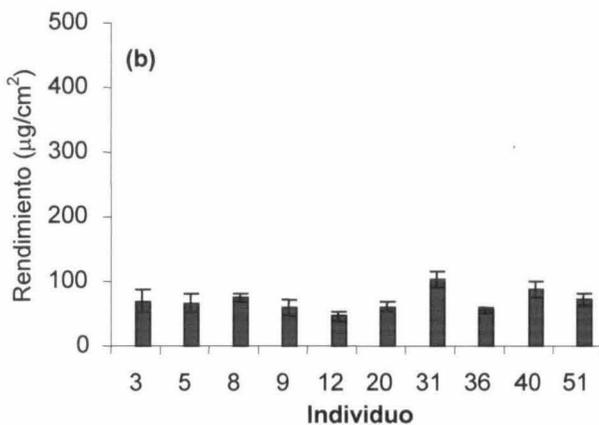
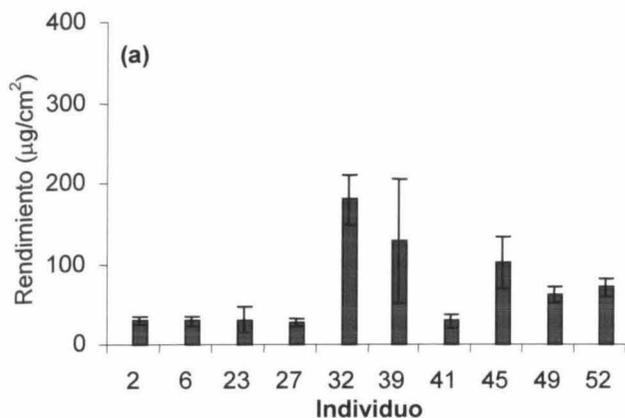
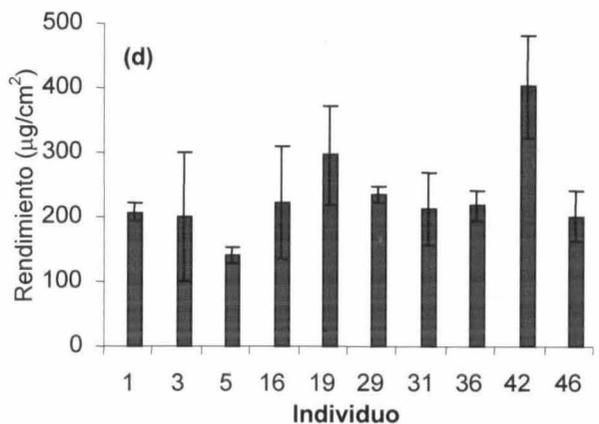
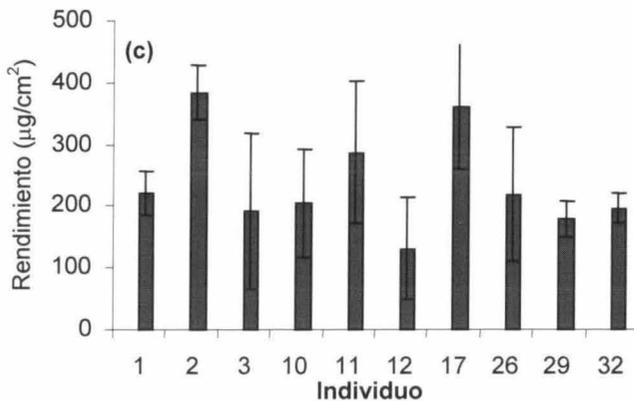


Fig. 2.3.1 Promedio ($\bar{x} \pm D.E$) del área foliar y el rendimiento de ceras totales en las poblaciones de Dzemul (a), Cuxtal (b).



Cont. Fig. 2.3.1 Promedio ($\bar{x} \pm D.E.$) del área foliar y el rendimiento de ceras totales en las poblaciones de Hobonil 1(c) y Hobonil 2 (d).

El tratamiento estadístico de los datos mostró que no existen diferencias significativas ($F=2.053$, $p>0.05$, 3 g.l.) en el área foliar de las cuatro poblaciones. Este resultado es interesante dado que se podrían haber esperado diferencias entre las dos poblaciones de Hobonil, por la cantidad de luz a la que están expuestos los diferentes individuos; esperando hojas más grandes en individuos sombreados y hojas más pequeñas en individuos expuestos a la luz (Grime, 1982).

Al analizar los resultados del rendimiento de ceras epicuticulares totales en individuos de las cuatro poblaciones, se encontró que no existen diferencias significativas en el rendimiento de ceras entre la hojas de cada individuo ni entre individuos de una misma población, pero si entre las diferentes poblaciones de *C. aconitifolius* (Cuadro 2.3.1).

Cuadro 2.3.1 Análisis de varianza anidado del rendimiento ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de ceras epicuticulares en las cuatro poblaciones de *C. aconitifolius*.

Fuente de Variación	Estadístico				
	S.C	g.l	C.M	F	p
Población	0.831	3	0.277	33.210	<0.05
Individuos (población)	0.089	9	0.10	1.191	>0.05
Hojas (individuo)	0.114	20	0.006	0.684	>0.05
Error	0.709	85	0.08		

Al analizar el contenido de ceras totales de las cuatro poblaciones de *C. aconitifolius* se identificaron dos grupos distintos (Tukey=0.938, $p>0.05$). Uno de los grupos es el conformado por las poblaciones de Cuxtal y Dzemul, en tanto que en el segundo se ubican las dos poblaciones de Hobonil (Tukey=0.001, $p<0.05$; Fig. 2.3.2), observándose un mayor rendimiento de ceras en las poblaciones del segundo grupo.

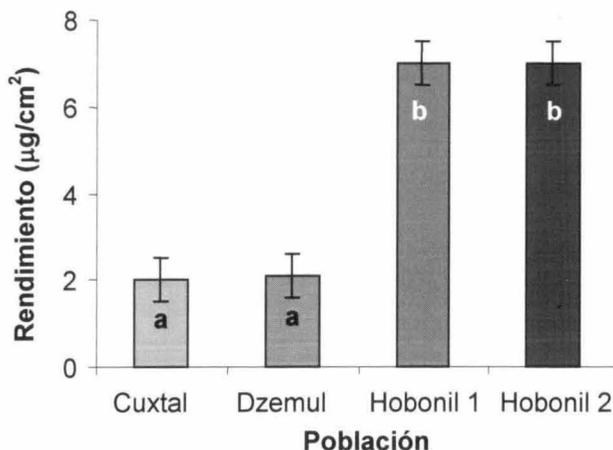


Fig. 2.3.2 Rendimiento de las ceras epicuticulares totales en los sitios de estudio.

Dado que se ha reportado que la principal función de las ceras es la de prevenir la pérdida excesiva de agua en las plantas (Gutschick, 1999; Araus et al. 1991), se hubiera esperado que, debido a que las poblaciones se encuentran en tipos de vegetación contrastante, con diferentes condiciones ambientales, existieran diferencias en el rendimiento de las ceras epicuticulares y que este disminuyera de acuerdo al gradiente de precipitación característico de la Península, e.g., selva baja caducifolia espinosa (Dzemul) > selva baja (Cuxtal) > selva mediana (Hobonil). Sin embargo los resultados obtenidos muestran una mayor producción de ceras en individuos pertenecientes a la población con mayor precipitación (Hobonil).

Para tratar de explicar las diferencias observadas en el rendimiento de ceras totales en cada una de las diferentes poblaciones, se evaluaron los registros mensuales de la precipitación, temperatura y evaporación de los diferentes sitios de estudio (Fig. 2.3.3 a, b, c; respectivamente), encontrándose solamente en el mes de septiembre una correlación significativa entre una de las variables ambientales y el rendimiento obtenido, esto puede deberse a que las hojas tomadas para la extracción de las ceras epicuticulares, fueron hojas jóvenes, recién expandidas que brotaron durante ese mes y en las cuales cualquier cambio ocurrido en el ambiente se reflejaría

en la cantidad de ceras producidas, ya que la producción de estas es rápida y puede apreciarse en cuestión de días (Sheperd et al. 1995; Mayeux & Jordan, 1984; Nodskov, 1975; Baker, 1974).

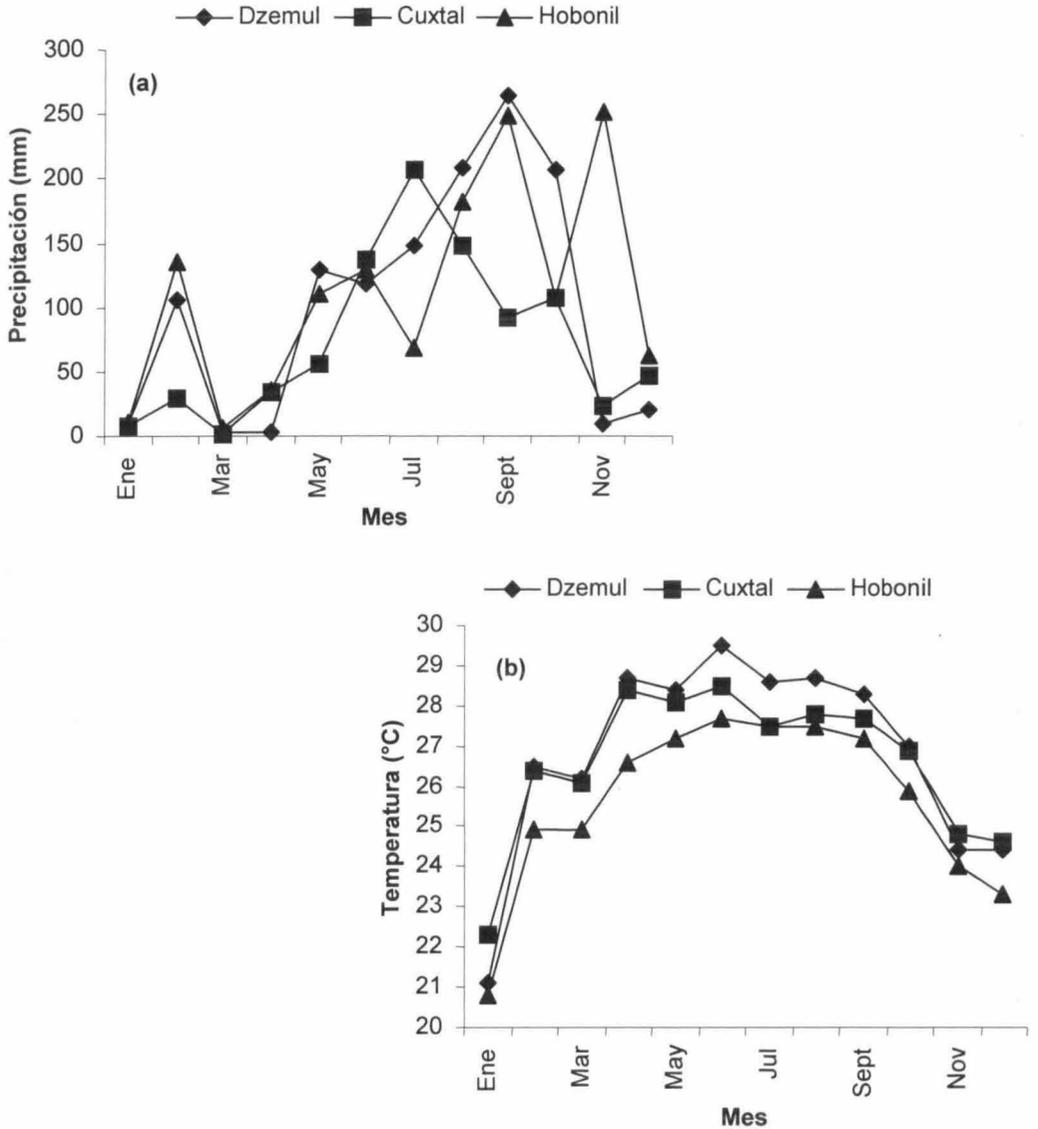
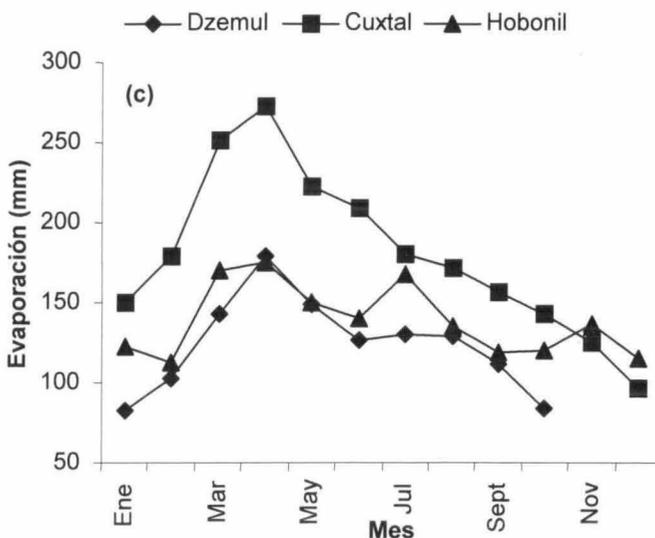


Fig. 2.3.3 Precipitación promedio (a), temperatura máxima (b) y evaporación (c) en los sitios de estudio durante el año 2001



Cont. Fig. 2.3.3 Precipitación promedio (a), temperatura máxima (b) y evaporación (c) en los sitios de estudio durante el año 2001

El análisis estadístico de los datos mostró que no existe una correlación significativa entre el rendimiento total de ceras y la precipitación ($r=0.224$, $p>0.05$, 1g.l) o la evaporación promedio del mes de septiembre ($r=-0.28$, $p>0.05$, 1g.l); esto significa que una menor precipitación y una mayor evaporación no resulta en un aumento en la producción de ceras, como podría esperarse ya que se ha observado un efecto estimulante en la producción de ceras epicuticulares al disminuir los valores de humedad relativa (Baker, 1974).

Con respecto a la temperatura promedio del mes de septiembre, la correlación entre ésta y la cantidad de ceras producidas por los individuos de *C. aconitifolius* fue negativa en los sitios de estudio ($r=-0.481$, $p<0.05$, 1g.l), lo cual significa que a menores temperaturas el rendimiento de ceras es mayor. Esto coincide con lo reportado para *Eucalyptus viminalis*, *Brassica napus* y *B. Oleraceae*, las cuales aumentan su producción de ceras conforme la temperatura a la que están expuestas

disminuye, ubicándose el máximo de producción en los 21° C (Sheperd et al. 1995; Mayeux & Jordan, 1984; Baker, 1974; Whitecross & Armstrong, 1971). Asimismo se ha reportado que individuos mantenidos a la sombra reducen el rendimiento de ceras a cualquier temperatura, en tanto que individuos expuestos a la luz aumentan su rendimiento (Sheperd et al. 1995; Mayeux & Jordan, 1984; Nodskov, 1975; Baker, 1974; Whitecross & Armstrong, 1972), esta tendencia no se observó en el caso de las dos poblaciones de Hobonil las cuales mostraron un rendimiento total de ceras similar aun cuando una de ellas se encuentra completamente expuesta a la luz solar.

Los resultados obtenidos de las correlaciones entre el rendimiento total de ceras y los factores ambientales mostraron que la cantidad de ceras no depende ni de la precipitación ni de la evaporación y aunque la producción de ceras mostró una correlación con la temperatura, probablemente ni este factor sea determinante, debido a que las diferencias en la temperatura en las diferentes poblaciones es mínima, por lo que deben existir otros factores, que pueden estar influyendo en la producción de ceras epicuticulares. Sin embargo, sería importante explorar de manera experimental el valor umbral de temperatura al cual se puede estimular la producción de las ceras epicuticulares.

En conjunto, los resultados observados sugieren que deben existir otros factores que pueden estar influyendo en la producción de ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*.

2.4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la cuantificación de ceras epicuticulares totales de *C. aconitifolius* mostraron la formación de dos grupos poblacionales distintos, uno de los grupos conformado por Dzemul y Cuxtal y el otro, por las dos poblaciones de Hobonil.

El rendimiento de ceras no siguió el patrón esperado de precipitación de la Península de Yucatán: selva baja caducifolia espinosa (Dzemul) > selva baja (Cuxtal) > selva mediana (Hobonil).

El rendimiento de las ceras epicuticulares no estuvo correlacionado ni con la precipitación y evaporación, pero si con la temperatura.

2.5 REFERENCIAS

- Araus, J., Febrero, A. & P. Vendrell.** 1991. Epidermal conductance in different parts of durum wheat grown under mediterranean conditions: the role of epicuticular waxes and stomata. *Plant Cell and Environment*, **14**: 545-558.
- Arroyo, G.** 2000. Análisis y cuantificación de ceras epicuticulares presentes en hojas de diferentes ecotipos de *Cocos nucifera* L. Tesis de Maestría. CICY. Mérida, Yucatán. pp 67 .
- Baker, E. A.** 1974. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* Var. Gemmifera. *New Phytologist*, **73**: 955-966.
- Baum, B., Tulloch, A., & G. Bailey.** 1980. A survey of epicuticular waxes among genera of *Triticeae*. I. Ultrastructure of glumes and some leaves as observed with scanning electron microscope. *Canadian Journal of Botany*, **58**: 2467-2480.
- Duch, J.G.** 1988. La conformación territorial del estado de Yucatán. Universidad de Chapingo, México, D. F.
- Eigenbrode, S. & K. Espelie.** 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insects herbivores. *Annual Review of Entomology*, **40**: 171-194.
- Flores, J. S. & I. Espejel.** 1994. Tipos de vegetación de la Península de Yucatán. *Etnoflora Yucatanense*. Fascículo 3. UADY. Mérida, Yucatán. pp 135.
- Grime, J.** 1982. Estrategias de adaptación de las plantas y procesos que controlan la vegetación. Ed. Limusa. México. pp 19-51.
- Gutschick, V.** 1999. Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytologist*, **143**: 3-18.
- Mayeux, Jr. H. & W. Jordan.** 1984. Variations in amounts of epicuticular wax on leaves of *Prosopis glandulosa*. *Botanical Gazette*, **145**(1): 26-32.
- Nodskov, B.** 1975. Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry*, **14**: 921-929.
- Post- Beittenmiller, D.** 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 405-430.

Rashote, A., Jenks, M., Nguyen, T. & K. Feldman. 1997. Epicuticular wax variation in ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **45**(2): 251-255.

Sheperd, T., Robertson, G., Griffiths, D., Birch, A. & G. Duncan. 1995. Effects of Environment on the composition of epicuticular wax from Kale and Swede. *Phytochemistry*, **40**:407-417.

SYSTAT 10. 2000. Statistic I. SPSS Inc. Chicago.

Whitecross, M. & D. Armstrong. 1971. Environmental effects on epicuticular waxes of *Brassica napus*. L. *Australian Journal of Botany*, **20**:87-95.

Zar, J. 1984. Biostatistical analysis. Prentice Hall. New Jersey.

CAPITULO 3

VARIACIÓN INTERPOBLACIONAL DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS PRESENTES EN LAS CERAS EPICUTICULARES DE *Cnidoscopus aconitifolius*

3.1 INTRODUCCIÓN

Se considera que el tema de la ecología química de las plantas puede haberse desarrollado para contestar una pregunta surgida en los años 50's, al descubrirse productos naturales complejos y variados en las plantas superiores: ¿cual es el propósito de esta abundancia de estructuras?. En 1959 se argumentó que la razón de ser de estos "metabolitos secundarios" no era solamente que fueran productos de deshecho del metabolismo primario, acumulados en las células vegetales debido a la ausencia de un sistema excretor eficiente. En cambio, se propuso que estos metabolitos son sustancias "disparadoras" que inducen o previenen la toma de nutrientes por los herbívoros (Harborne, 1999).

Contrario a los metabolitos primarios, que son prácticamente constituyentes universales de células, tejidos y órganos, los metabolitos secundarios son generalmente específicos en su distribución, tanto taxonómica como ontogénicamente (Berenbaum, 1995). La variación química de los metabolitos secundarios puede ocurrir dentro de la misma hoja, entre hojas de la misma rama, o entre plantas de la misma población. Asimismo, los factores ambientales pueden alterar de manera dramática las concentraciones de metabolitos secundarios, especialmente en el tejido foliar (Harborne, 1999).

La composición química de las ceras epicuticulares varía entre los distintos grupos filogenéticos e incluso dentro de los mismos grupos, especies, individuos o entre los diferentes estadios de crecimiento de un mismo individuo. Los principales componentes químicos encontrados en las ceras epicuticulares son los n-alcanos, ésteres, alcoholes y ácidos grasos (Post-Beittenmiller, 1996).

Al igual que otros metabolitos secundarios, la composición química de las ceras epicuticulares se ve afectada por los factores ambientales imperantes en el sitio en el cual se desarrolla la planta, incluyendo la intensidad de luz, la temperatura y la humedad (Whitecross & Armstrong, 1971; Baker, 1974). Como ejemplo de lo anterior se ha reportado que en las hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) la luz y la temperatura, más que influir en la producción de un grupo de metabolitos sobre otro, afecta el largo de la cadena de los metabolitos que integran los diferentes grupos (Nodskov, 1975).

La mayoría de los estudios que evalúan el efecto de diferentes condiciones ambientales en el rendimiento y composición de ceras epicuticulares producidas en hojas, utilizan especies de importancia económica y condiciones altamente controladas (Whitecross & Armstrong, 1971; Baker, 1974; Nodskov, 1975; Faini et al. 1999). Sin embargo, existen muy pocos reportes donde se comparen los patrones de variación espacial de la composición de las ceras en poblaciones naturales. Si en plantas de importancia económica mantenidas bajo condiciones controladas se presentan diferencias en el rendimiento y la composición química de las ceras epicuticulares, es de esperarse que las poblaciones naturales de plantas que se encuentran en condiciones ambientales variables (e.g. diferentes regímenes de temperatura y precipitación), también presenten diferencias dependiendo del nivel de contraste en dichas condiciones.

En este capítulo se presentan los resultados de la variación en la composición de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*, su comparación entre las cuatro poblaciones de estudio y su relación con las condiciones ambientales de cada población.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Curvas de calibración

En un estudio fitoquímico previo se realizó la purificación del extracto ceroso de *C. aconitifolius*, obteniéndose tres componentes puros y dos mezclas; los productos puros se identificaron como el acetato de α -amirina, el acetato de β -amirina y la amirenona, en tanto que las mezclas obtenidas fueron una de alcanos y otra de α -amirina y β -amirina (Escalante et al. 2004).

Una vez aislados los componentes principales, se procedió a preparar una curva de calibración para cada uno. La curva de calibración del acetato de β -amirina se realizó partiendo de una solución patrón al 3%. De esta solución se tomaron alícuotas de 150, 175, 200, 225 y 250 μ l y se combinaron con 300 μ l del estándar interno (acetato de hecogenina) al 2%. La muestra se aforó a 1 ml y de esta se inyectó 1 μ l al cromatógrafo de gases. Para realizar la curva de calibración de los alcanos se partió de una solución patrón al 5% y se tomaron alícuotas de 300, 325, 350, 375 y 400 μ l, las cuales fueron combinadas con 300 μ l del estándar interno. Las curvas del acetato de α -amirina, amirenona y la mezcla de α -amirina y β -amirina se realizaron partiendo de una solución patrón al 2%, donde se tomaron alícuotas de 150, 175, 200, 225 y 250 μ l y se combinaron con 300 μ l del estándar interno. Cada dilución se inyectó por triplicado y las curvas de calibración se prepararon graficando el promedio de las áreas de cada componente/promedio de las áreas del estándar interno vs concentración del componente/concentración del estándar interno.

3.2.2 Condiciones del cromatógrafo

Las inyecciones se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, utilizando una columna Ultra 2, nitrógeno como gas acarreador y un programa de temperaturas T1=280°C (2 min), T2=300°C (17 min), gradiente= 5°C min. El detector utilizado fue el de ionización de flama (FID).

3.2.3 Análisis estadísticos

Se realizó una matriz de correlación de Pearson para determinar si la presencia de un componente se correlacionaba con la presencia de otro, así como para determinar el posible efecto de las variables ambientales (temperatura, precipitación y evaporación) sobre cada componente.

Se efectuaron análisis de varianza multivariados (MANOVAS) para evaluar las diferencias globales en todos los componentes mayoritarios, entre las poblaciones y entre los individuos de cada población.

De igual forma se aplicaron ANOVAS anidados (Zar, 1984) para determinar la variación a diferentes niveles jerárquicos: entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y dentro de los individuos (i.e. entre hojas de un individuo). Estos análisis se llevaron a cabo con el procedimiento GMLH del paquete estadístico SYSTAT, ver. 10.0 (SYSTAT 2000). Finalmente se llevó a cabo un análisis de comparación de medias de Tukey para determinar entre que poblaciones existió una diferencia significativa y entre cuales no (Zar, 1984).

El muestreo del material vegetal se llevó a cabo en las cuatro poblaciones de estudio con la metodología descrita en el capítulo 2. Los datos ambientales fueron proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CNA).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que todas las correlaciones entre los componentes principales de *C. aconitifolius* eran positivas aunque no todas significativas. En el cuadro 3.3.1 se puede observar de manera general que todos los triterpenos (amirenona, α -amirina, β -amirina, acetato de α -amirina y acetato de β -amirina) están relacionados entre sí, indicando que si aumenta uno, aumentan todos; esto es de esperarse ya que estos componentes poseen el mismo esqueleto principal y provienen de la misma ruta biosintética (Mann, 1986; fig 3.3.1). De los alcanos no se puede decir lo mismo ya que no se conoce su estructura general.

Cuadro 3.3.1 Matriz de correlación de Pearson entre los componentes químicos de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius*.

	Alcano 1	Alcano 2	amirenona	α-amirina	β-amirina	AcO. α-amirina	AcO. β-amirina
Alcano 1	1.000						
Alcano 2	0.883*	1.000					
amirenona	0.323*	0.238	1.000				
α-amirina	0.309	0.136	0.612*	1.000			
β-amirina	0.428*	0.318*	0.675*	0.746*	1.000		
AcO. α-amirina	0.620*	0.445*	0.465*	0.605*	0.669*	1.000	
AcO. β-amirina	0.435*	0.342*	0.750*	0.719*	0.759*	0.739*	1.000

(*significativo, $p \leq 0.05$; N=38)

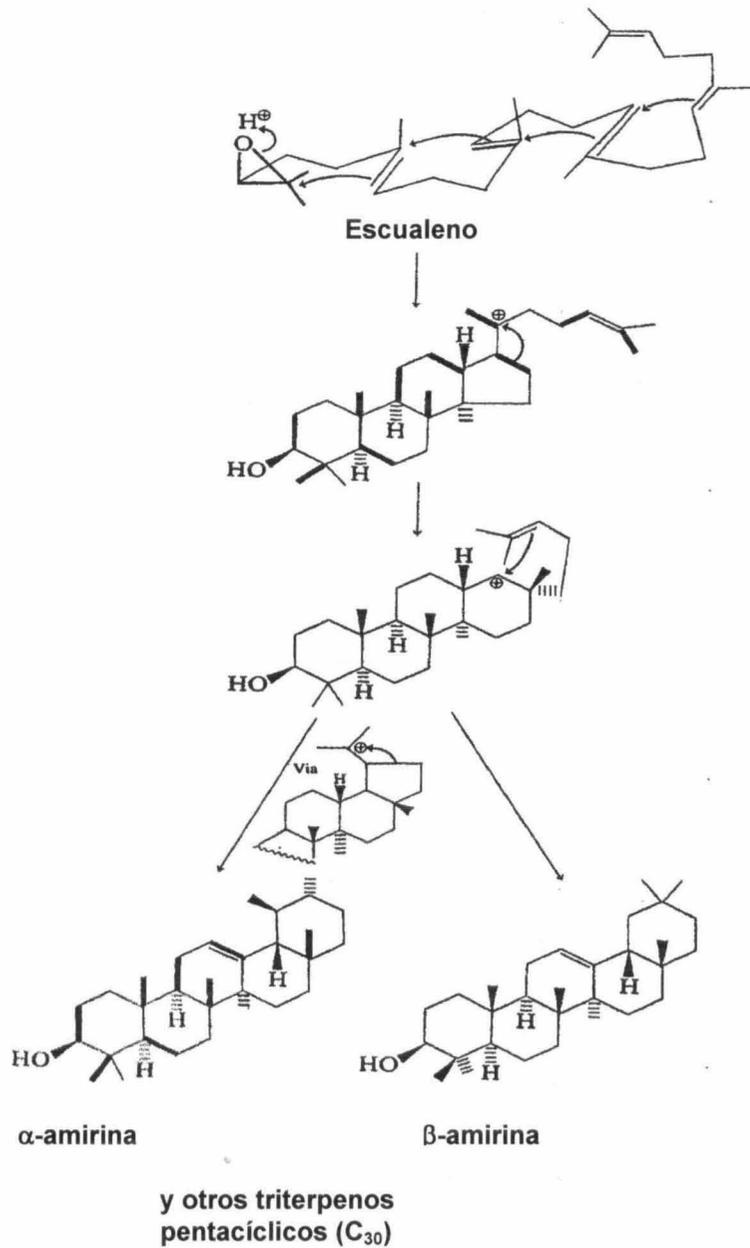


Fig. 3.3.1 Ruta biosintética de las amirinas (tomado de Mann, 1986).

Existen pocos estudios sobre los cambios en la composición química de las ceras epicuticulares bajo diferentes condiciones ambientales (Sheperd et al. 1995). Se ha reportado en *Brassica oleraceae* que las temperaturas elevadas estimulan la conversión de ciertos metabolitos secundarios en otros (Sheperd et al. 1995) o en *Hordeum vulgare* afectan el largo de la cadena hidrocarbonada (Nodskov, 1975) pero solo cuando se comparan condiciones ambientales extremas (Baker, 1974).

En este caso los resultados indicaron (Cuadro 3.3.2) que la temperatura no tiene ninguna influencia sobre la concentración de los componentes químicos de las ceras de *C. aconitifolius*; de manera contraria, la precipitación mostró una correlación negativa con la concentración de los componentes principales, sugiriendo que una mayor precipitación, resulta en una disminución de la concentración de los componentes cerosos principales. La evaporación por otra parte mostró una correlación positiva, es decir que a una mayor evaporación los componentes principales de esta especie aumentan. Lo anterior sugiere que los individuos de *C. aconitifolius*, al estar expuestos a estrés hídrico, ya sea por la poca precipitación o por una elevada evaporación sintetizan una mayor cantidad de los componentes principales. Esto coincide con los reportes de que un mayor estrés hídrico promueve una mayor producción de metabolitos secundarios evitando de esta manera una pérdida excesiva de agua (Lambers, et al. 1998). Por ejemplo, en el tabaco (*Nicotiana tabacum*) las concentraciones de alcaloides aumentan cuando las plantas experimentan stress hídrico; así mismo las especies del género *Phaseolus* aumentan su concentración de ésteres cerosos en las hojas, hasta 20 veces, bajo condiciones de estrés hídrico (Lambers, et al. 1998; Anderson et al. 1984).

Cuadro 3.3.2 Matriz de correlación de Pearson entre la concentración de los componentes químicos de las ceras epicuticulares y la precipitación, temperatura máxima y evaporación (para el mes de septiembre) de los sitios de estudio.

	Alcano 1	Alcano 2	amirenona	α -amirina	β -amirina	AcO. α -amirina	AcO. β -amirina
Precipitación	-0.51*	-0.391*	-0.638*	-0.342*	-0.354*	-0.383*	-0.566*
Temp. Máx.	-0.06	-0.078	-0.056	0.156	0.276	0.272	0.100
Evaporación	0.532*	0.405*	0.667*	0.375*	0.398*	0.428*	0.606*

(*significativo, $p \leq 0.05$; N=38)

El análisis multivariado muestra que globalmente existen diferencias significativas en la concentración de los componentes mayoritarios entre las cuatro poblaciones de estudio (λ de Wilks=0.054, $F=179.77$, $g.l.=7, 72$, $p < 0.001$) y entre individuos dentro de cada población (λ de Wilks=0.002, $F=3.03$, $g.l.=252, 508$, $p < 0.001$).

Por su parte los análisis univariados confirmaron las diferencias significativas en la concentración de cada uno de los componentes en las cuatro poblaciones, así como entre individuos dentro de las poblaciones, pero no en las hojas de cada individuo (Cuadro 3.3.3).

Cuadro 3.3.3 Análisis de varianza anidados de las diferencias entre poblaciones, entre individuos dentro de las poblaciones y entre hojas dentro de los individuos, en la concentración de los componentes mayoritarios* de las ceras epicuticulares de *Cnidoscopus aconitifolius*.

Fuente de variación	g.l	Estadístico F	P
Alcano 1			
población	3	28.276	0.000
Individuos (población)	36	4.495	0.000
Hojas (individuo)	20	0.912	0.574
Error	58		
Alcano 2			
población	3	10.569	0.000
Individuos (población)	36	3.676	0.000
Hojas (individuo)	20	0.998	0.479
Error	58		
Amirenona			
Población	3	70.783	0.000
Individuos (población)	36	4.109	0.000
Hojas (individuo)	20	0.861	0.633
Error	58		
α-amirina			
Población	3	20.670	0.000
Individuos (población)	36	2.222	0.000
Hojas (individuo)	20	1.237	0.260
Error	58		
β-amirina			
Población	3	64.923	0.000
Individuos (población)	36	4.855	0.000
Hojas (individuo)	20	0.557	0.926
Error	58		
AcO. α-amirina			
Población	3	27.301	0.000
Individuos (población)	36	1.668	0.000
Hojas (individuo)	20	0.767	0.739
Error	58		
AcO. β-amirina			
población	3	47.127	0.000
Individuos (población)	36	1.969	0.000
Hojas (individuo)	20	0.988	0.49
Error	58		

Se ha reportado en *Isocoma coronopifolia* y *Larrea tridentata* variación en la cantidad de ceras epicuticulares totales entre individuos de una misma población debido a variaciones en las características cuticulares (Mayeux, et al. 1981; Hull, et al. 1971).

En *C. aconitifolius* los resultados mostraron variación entre individuos en la concentración de los componentes químicos, estas diferencias pueden deberse a diferentes factores. Es probable que la variación pueda deberse a la variación microambiental en la que los individuos se desarrollan, por ejemplo, diferencias en la cantidad de luz, temperatura, agua y nutrimentos. También puede deberse a la presión que ejercen los herbívoros en los diferentes individuos y que esté estimulando la síntesis de metabolitos secundarios en algunas plantas para su protección y en otras no. En condiciones naturales generalmente las plantas están inmersas en un ambiente altamente heterogéneo en escalas espaciales que pueden ser pequeñas. Estas diferencias microambientales pueden ejercer diferencias notables entre individuos de una misma población. Por ejemplo, respecto a la interacción planta-herbívoro se ha reportado que los diferentes niveles de daño dentro de una misma población, están correlacionados con factores como el nivel de exposición a la luz (Marquis, 1992).

En específico para *C. aconitifolius* es necesario explorar detalladamente la correlación que pueda existir entre las diferencias microambientales en factores físicos, como en la frecuencia de la interacción con sus herbívoros (y la correlación entre estos factores), para determinar el papel que cada uno de los mismos juega en la determinación de la composición química de las ceras a esta escala (capítulo 4).

Los resultados a escala de comparación entre poblaciones mostraron que las poblaciones Hobonil 1 y Hobonil 2 (que presentaron una mayor precipitación y una menor evaporación en septiembre; fig 2.3.2, capítulo 2) tuvieron en general una menor concentración de alcanos y amirinas en comparación con las otras poblaciones (fig. 3.3.2 a-g). Asimismo, y como era de esperarse, las poblaciones de Hobonil no

mostraron diferencias significativas en la concentración de los componentes, debido posiblemente a su cercanía.

Por otra parte en la población de Cuxtal (que presentó menor precipitación y mayor evaporación en septiembre; fig 2.3.2, capítulo 2) la concentración de la mayoría de los componentes (alcano 1, alcano 2, amirenona, β -amirina y acetato de β -amirina) fue mayor (Fig. 3.3.2 a-d, g) en comparación con las otras tres poblaciones.

La población de Dzemul presentó concentraciones intermedias en los componentes principales en comparación con las altas concentraciones encontradas en la población de Cuxtal y las bajas concentraciones detectadas en las poblaciones de Hobonil. Lo anterior puede deberse a que la precipitación y la evaporación en Dzemul presentó valores similares a los de Hobonil pero que estas diferencias mínimas en precipitación y evaporación entre las dos poblaciones pueden desencadenar cambios significativos en la concentración de los componentes químicos de *C. aconitifolius*. Esto explica que sólo se encontraran diferencias significativas en la amirenona, β -amirina y acetato de β -amirina entre las poblaciones de Dzemul y Hobonil (Fig. 3.3.2 c, d y g).

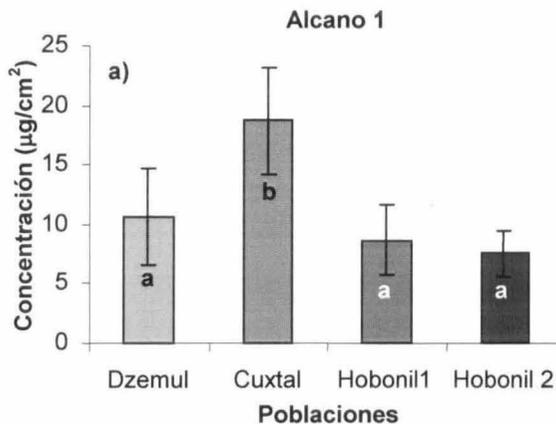
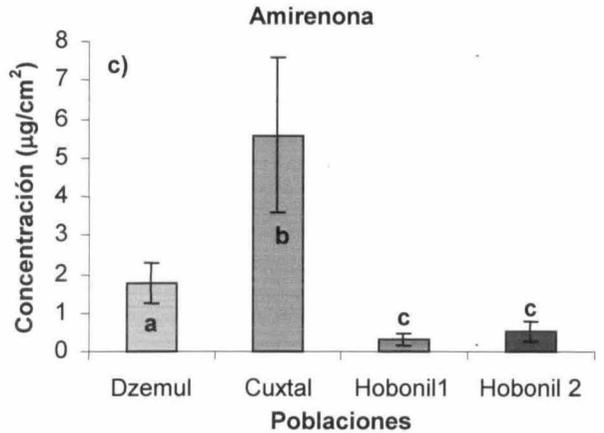
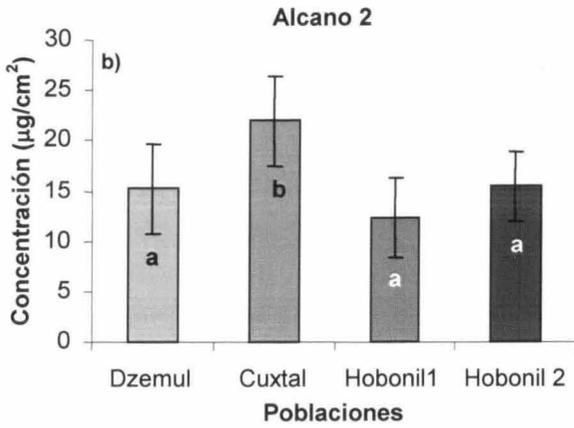
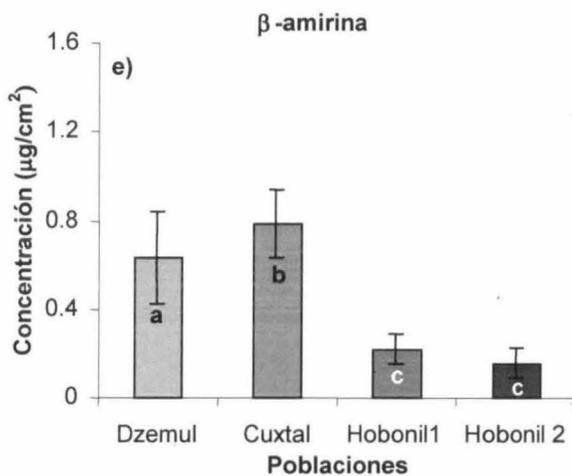
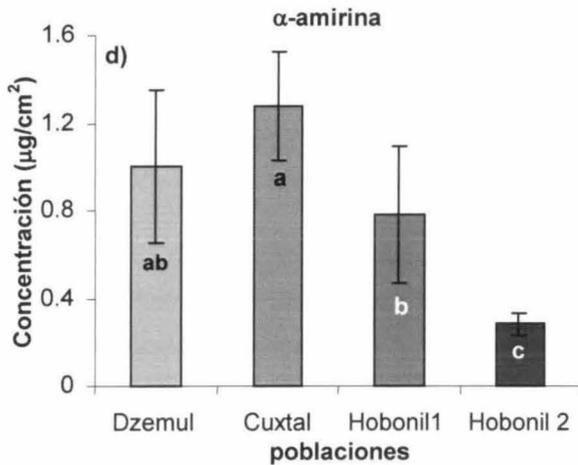


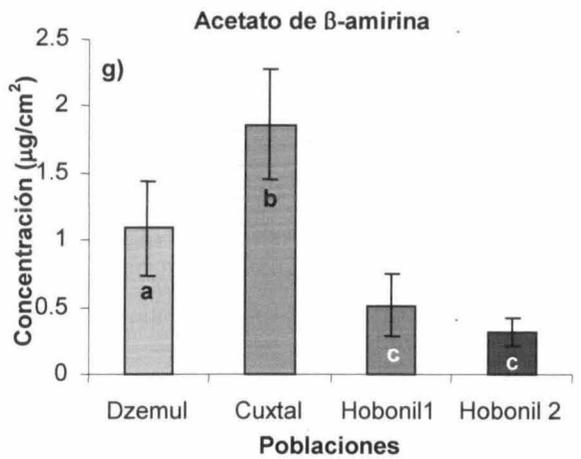
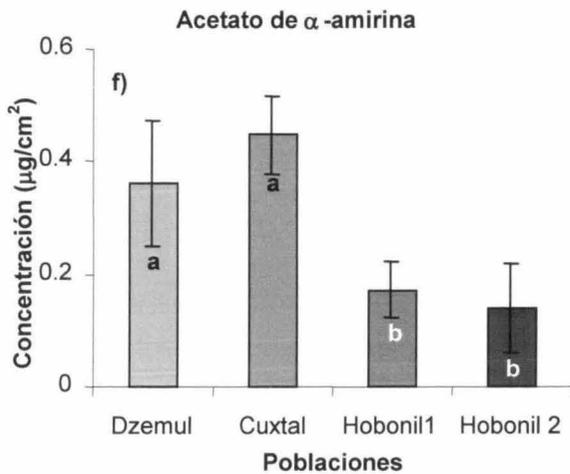
Fig. 3.3.2 Concentración de los componentes alcano 1 (a), alcano 2 (b), amirenona (c), α -amirina (d), β -amirina (e), acetato de α -amirina (f), y acetato de β -amirina (g) en las cuatro poblaciones de estudio.



Cont. Fig. 3.3.2 Concentración de los componentes alcano 1 (a), alcano 2 (b), amirenona (c), α -amirina (d), β -amirina (e), acetato de α -amirina (f), y acetato de β -amirina (g) en las cuatro poblaciones de estudio.



Cont. Fig. 3.3.2 Concentración de los componentes alcano 1 (a), alcano 2 (b), amirenona (c), α -amirina (d), β -amirina (e), acetato de α -amirina (f), y acetato de β -amirina (g) en las cuatro poblaciones de estudio.



Cont. Fig. 3.3.2 Concentración de los componentes alcanos 1 (a), alcanos 2 (b), amirenona (c), α -amirina (d), β -amirina (e), acetato de α -amirina (f), y acetato de β -amirina (g) en las cuatro poblaciones de estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de alcanos y triterpenos es mayor cuando la precipitación disminuye y la temperatura mensual promedio aumenta; esto coincide con reportes que sugieren que estos metabolitos actúan como una barrera física para prevenir la penetración de agua y la deshidratación de las hojas y para filtrar o reflejar la luz incidente (Faini et al. 1999; Baker, 1974).

Se observó en las poblaciones de Hobonil 1 y 2, una mayor producción de ceras epicuticulares (capítulo 2) y una menor concentración de los componentes principales y las poblaciones de Cuxtal y Dzemul, que presentaron un menor contenido de ceras, una mayor concentración de los componentes principales. Esto sugiere que un aumento en la producción de ceras no implica necesariamente un aumento en la producción de los componentes principales; sino que el metabolismo relacionado con los componentes de la cera epicuticular puede estar desviándose hacia otro tipo de productos que no corresponden a los considerados como principales y que su presencia (cualitativa y cuantitativa) es de naturaleza plástica y por tanto altamente dependiente del ambiente.

Dado que la colecta de material vegetal se llevó a cabo el en mismo mes en el que se determinaron las condiciones de las variables ambientales, las correlaciones entre la concentración de los componentes mayoritarios de las ceras y las variables ambientales, sugieren una respuesta a corto plazo de *C. aconitifolius* a las condiciones ambientales en las que se encuentra. Esto confirma evidencias reportadas que demuestran que *C. aconitifolius* presenta una alta capacidad de respuesta en plazos cortos de tiempo, sugiriendo que se trata de una especie altamente plástica (Abdala, 2003; Parra-Tabla et al. 2004).

3.4 CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la concentración de los componentes principales fue diferente entre poblaciones. Teniendo las poblaciones de Hobonil 1 y 2 (selva mediana), una menor concentración de los componentes principales, las población de Cuxtal (selva baja) concentraciones altas de los componentes principales y Dzemul, (selva baja caducifolia espinosa) concentraciones intermedias de los componentes químicos.

Los factores ambientales que mostraron una correlación con la concentración de los componentes principales fueron la precipitación y la evaporación, sugiriendo que estos metabolitos contribuyen de manera importante en la función de las ceras como barrera física para prevenir condiciones adversas del ambiente.

3.5 REFERENCIAS

- Abdala, L.** 2003. Variación geográfica e inducción de tricomas como respuesta a la defoliación en tres poblaciones de *Cnidoscolus aconitifolius* (MILL) I.M John (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Anderson, W., Gellerman, J. & H. Schlenk.** 1984. Effect of drought on phytol wax esters in *phaseolus* leaves. *Phytochemistry*, **23**(11): 2695-2696.
- Baker, E. A.** 1974. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* Var. Gemmifera. *New Phytologist*, **73**: 955-966.
- Berenbaum, M.** 1995. *Chemical Ecology: The chemistry of biotic interactions*. National Academy Press. USA. pp. 1-16.
- Escalante, F., Ortegón, I., Parra, V. & L.M. Peña.** 2004. Chemical composition of the epicuticular wax of *Cnidoscolus aconitifolius*. *Revista de la Sociedad Química de México*, **48**: 24,25.
- Faini, F., Labbé, C. & J. Coll.** 1999. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**: 673-679.
- Harborne, J.** 1999. Plant chemical ecology. *In: Comprehensive natural products chemistry*. Barton, D. & Nakanishi, K. (Eds). Elsevier Science Ltd. U.K.
- Hull, H., Morton, H. & R. Saunier.** 1971. Variations in creosotebush (*Larrea divaricata*) epidermis. *Journal of Arizona Academic Science*, **6**: 196-205.
- Lambers, H., Chapin, S. & T. Pons.** 1998. *Plant physiological ecology*. Springer Verlag. New York. pp 540.
- Mann, J.** 1986. *Secondary metabolism*. 2nd ed. Oxford University Press. U.K. pp 374.
- Marquis, R.J.** 1992. The selective impact of herbivores. pp. 301-325. *In* Fritz, R.S, Simms, E.L (eds), *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution and genetics*. University of Chicago press, Chicago, USA.
- Mayeux, Jr. H. & W. Jordan.** 1984. Variations in amounts of epicuticular wax on leaves of *Prosopis glandulosa*. *Botanical Gazette*, **145**(1): 26-32.
- Nodskov, B.** 1975. Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry*, **14**: 921-929.

Parra- Tabla, V., Rico-Gray, V. & M. Carbajal. 2004. Effect of defoliation on leaf growth sexual expression and reproductive success of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). *Plant Ecology*, **173**: 153-160.

Post- Beittenmiller, D. 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 405-430.

Sheperd, T., Robertson, G., Griffiths, D., Birch, A. & G. Duncan. 1995. Effects of Environment on the composition of epicuticular wax from Kale and Swede. *Phytochemistry*, **40**:407-417.

SYSTAT 10. 2000. Statistic I. SPSS Inc. Chicago.

Whitecross, M. & D. Armstrong. 1971. Environmental effects on epicuticular waxes of *Brassica napus*. L. *Australian Journal of Botany*, **20**:87-95.

Zar, J. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey.

CAPITULO 4

RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS CERAS EPICUTICULARES CON LA HERBIVORÍA

4.1 INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que una de las funciones ecológicas de las ceras epicuticulares es mediar las interacciones planta-insecto (Eigenbrode & Espelie, 1995; Chapman & Bernays, 1989). Esta protección puede darse de manera física, impidiendo la fijación y movilidad de los insectos, o de manera química, por medio de la acción de los metabolitos secundarios presentes en las ceras, algunos de los cuales confieren un efecto tóxico, deterrente o antialimentario a los herbívoros (Harborne, 1999; Eigenbrode & Espelie, 1995).

El modo y el grado en que las plantas individuales interactúan con las comunidades potenciales de herbívoros varían en función de diferentes factores y a diferentes escalas. La herbivoría es una interacción antagonista en la que la planta al perder tejido vegetal o estructuras reproductivas, reduce sus probabilidades de sobrevivencia y reproducción lo que repercute de manera directa en su adecuación (Crawley, 1983).

El daño producido por herbívoros en plantas puede variar de manera interespecífica e intraespecífica, dentro de un mismo hábitat o entre hábitats, y en diferentes escalas latitudinales y altitudinales, así como entre años. Algunos individuos y especies escapan del ataque, mientras que otros son constantemente masticados, raspados y perforados (Marquis, 1992). Se han descrito numerosas adaptaciones físicas (i.e. presencias de espinas y tricomas urticantes), químicas (i.e. producción de metabolitos secundarios) y de asociaciones mutualistas (i.e. hormigas defensoras), que las plantas han desarrollado para minimizar el impacto negativo causado por los herbívoros (Karban & Baldwin, 1997; Fritz & Simms, 1992).

Dentro de las defensas químicas se ha sugerido que las ceras epicuticulares pueden tener también, como función ecológica, el mediar las interacciones entre los insectos herbívoros y las plantas. Sin embargo, a diferencia de otro tipo de defensas el papel de las ceras epicuticulares como mecanismo defensivo ha sido poco explorado, a pesar de que se ha reportado que la estructura física de las ceras epicuticulares, así como los extractos de las mismas o sus componentes lipídicos individuales disuaden o intensifican la oviposición, y afectan el movimiento y la alimentación de insectos herbívoros (Eigenbrode & Espelie, 1995).

La mayoría de los estudios se han llevado a cabo en cultivos de importancia económica en condiciones controladas. En contraste en condiciones naturales prácticamente no existen trabajos (Sheperd et al. 1999; Eigenbrode & Pillai, 1998; Balsdon et al. 1995; Eigenbrode & Espelie, 1995; Eigenbrode et al. 1991; Walton, 1990; Woodhead, 1983). El entendimiento del papel de las ceras en condiciones naturales permitiría comprender de manera integral las causas que determinan la importancia de su producción y características químicas específicas.

Existen una gran variedad de factores que deben ser considerados cuando se propone un papel de defensa para un grupo de metabolitos secundarios. Es importante saber cuál de ellos, uno de los constituyentes mayoritarios o minoritarios de la planta, es el responsable de la actividad y cómo su concentración puede variar durante la vida de la planta. La localización de estos metabolitos también es importante, debido a que los productos en la superficie son detectados más rápidamente por los insectos fitófagos. La distribución de los metabolitos secundarios dentro de las diferentes partes de la planta es también un factor de significancia, por lo que la defensa química puede estar limitada a los tejidos más vulnerables (e.g. hojas jóvenes) (Harborne, 1999; Karban & Baldwin, 1997).

Los metabolitos secundarios tienen diferentes efectos sobre los insectos herbívoros, estos pueden ser antialimentarios, disuasivos o perjudiciales en el desarrollo reproductivo. En ocasiones la producción de metabolitos defensivos se incrementa por inducción, como consecuencia del apacentamiento (Harborne, 1999)

En este capítulo se explora la relación entre el rendimiento total y los componentes principales de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius* y el nivel de herbivoría, para cada población y para el conjunto de poblaciones. La predicción específica que se planteó fue que un mayor rendimiento y concentración de los componentes principales de las ceras tendrían un efecto defensivo en *Cnidocolus aconitifolius*, por lo que deberían relacionarse con los niveles de herbivoría a nivel individual y poblacional.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La estimación de la herbivoría se llevó a cabo en todas las poblaciones descritas en los capítulos anteriores. En cada población se evaluó el daño causado por herbívoros en los mismos 10 individuos en los que se tomaron las muestras para la cuantificación y caracterización de las ceras epicuticulares. En las poblaciones de Dzemul y Hobonil se registro la herbivoría de todas las hojas de los 10 individuos de estudio; en la población de Cuxtal se registró la herbivoría de 10 hojas elegidas aleatoriamente de cada individuo, debido a que en esta población usualmente los individuos producen una gran cantidad de flores.

La herbivoría se estimó visualmente tomando en cuenta agujeros, manchas, mordidas y otra disrupción física superficialmente evidente (Crawley, 1983). El daño causado por insectos herbívoros fue registrado por un solo observador usando las siguientes categorías: 0, sin daño; 1 \leq 5% del área foliar dañada o removida; 2, 6-10%; 3, 11-25%; 4, 26-50%; 5, 51-75%; y 6, 76-100%. Se calculó un índice de daño (ID) como:

$$ID = \sum (ni)(n_i) / N$$

donde:

n_i = número de hojas en la categoría de daño

N = número de hojas muestreadas.

Esta metodología ha sido usada en diferentes especies de plantas debido a que proporciona una representación precisa y rápida de la intensidad de la herbivoría en condiciones naturales (Parra-Tabla & Bullock, 1998; Alonso & Herrera, 1996; Núñez-Farfán & Dirzo, 1994).

4.2.1 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza univariado para determinar diferencias en el índice de herbivoría entre las cuatro poblaciones de estudio. Se llevó a cabo un análisis de comparación de medias de Tukey para determinar entre cuales poblaciones existieron diferencias significativas y entre cuales no. Finalmente se realizaron correlaciones lineales entre el índice de herbivoría con el rendimiento y con la concentración de cada componente principal de *C. aconitifolius* para cada población y para el conjunto de poblaciones (Zar, 1984). Todos los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SYSTAT ver. 10 (SYSTAT 2000).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que entre las cuatro poblaciones de estudio el índice de herbivoría fue significativamente diferente (Cuadro 4.3.1) obteniéndose dos grupos: el formado por las poblaciones de Dzemul y Cuxtal y el grupo formado por la población de Hobonil 2. La población de Hobonil 1 no fue significativamente diferente de las demás poblaciones (Fig. 4.3.1).

Cuadro 4.3.1 Análisis de varianza univariado del índice de herbivoría entre las cuatro poblaciones de *cridoscolus aconitifolius*.

Fuente de variación	Estadístico				
	S. C	g.l	C.M	F	p
Población	0.144	3	0.048	7.149	0.001
Error	0.236	35	0.007		

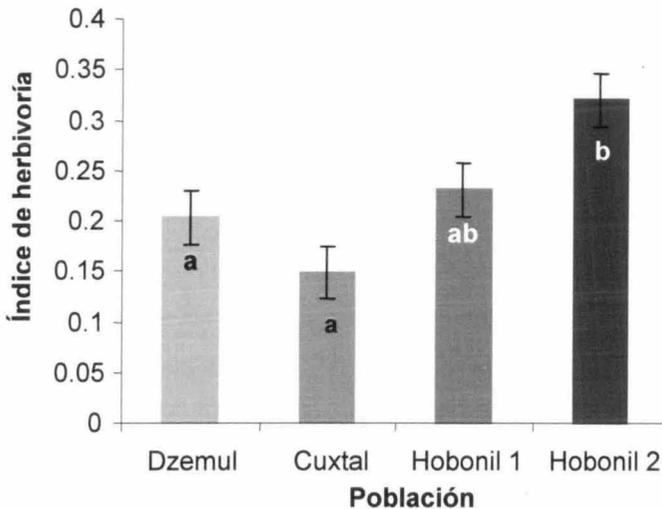


Fig. 4.3.1 Índice de herbivoría ($\bar{x} \pm D.E$) en las cuatro poblaciones de estudio. Letras diferentes indican diferencias entre poblaciones ($p > 0.05$).

Las diferencias observadas en el nivel de herbivoría entre poblaciones se pueden deber a diversos factores. Uno de estos factores es la posible existencia de variaciones importantes en la cantidad y diversidad de insectos herbívoros presentes en cada zona, que puede estar relacionado a su vez con las diferencias de temperatura y precipitación descritas en el capítulo 3. Así, estas características ambientales a pesar de no afectar quizá de manera directa la producción de ceras, probablemente la afecte de manera indirecta a través de su efecto en los patrones de distribución y abundancia de los herbívoros.

Se han reportado a larvas de lepidópteros y ortópteros como los principales herbívoros de *C. aconitifolius* (Parra-Tabla et al, 2004; Abdala, 2003; Carbajal, 1998) en el estado de Yucatán. Estos herbívoros son comunes en zonas tropicales y aún cuando no se han descrito patrones de distribución espacial, para el caso de larvas de lepidópteros existen diferencias aparentes entre sitios como Dzemul y Cuxtal (Rodríguez, 2004). Sin embargo, tanto en la población de Cuxtal como en la zona de

Hobonil, se han observado eventos de defoliación total en plantas de *C. aconitifolius* (Parra-Tabla et al, 2004). Lo anterior sugeriría que las diferencias en la distribución espacial de los herbívoros puede no ser necesariamente la causa de las diferencias observadas en el nivel de herbivoría entre las poblaciones. Sin embargo, evidentemente es necesario contar con estudios específicos donde se estime la abundancia e identidad de los principales herbívoros de *C. aconitifolius* en las poblaciones estudiadas.

Otra causa probable de las diferencias observadas en los niveles de herbivoría entre sitios, es la cantidad de recursos vegetales disponibles para los herbívoros; estos recursos dependen de las condiciones ambientales de los sitios de estudio y éstas a su vez pueden reflejarse en diferencias de las defensas estructurales y químicas de las plantas (Coley & Barone, 1996; Marquis, 1992; Coley et al, 1985). En sitios en los cuales la precipitación no es un factor limitante se esperaría una mayor cantidad de herbívoros debido a la mayor disponibilidad de recursos vegetales (Coley et al, 1985); sin embargo, en este estudio los resultados no mostraron el patrón esperado, ya que las poblaciones de Hobonil 2 y Dzemul presentaron una precipitación similar en el mes de septiembre (Fig. 2.3.3, cap. 2) pero diferencias significativas en herbivoría (Fig. 4.3.1).

Recientemente, al comparar los niveles de herbivoría en individuos de la especie herbácea *Anthurium schlendentalii*, ubicados en poblaciones de Hobonil con los ubicados en Dzemul, se encontró un mayor nivel de daño en Hobonil (Canto, 2004). En este caso, las diferencias se atribuyeron a la mayor cantidad y calidad de nutrimentos en las hojas de los individuos de Hobonil, y a la mayor abundancia de herbívoros en la misma población (Canto et al. 2004).

Las correlaciones lineales realizadas para relacionar el índice de herbivoría con el rendimiento total de ceras epicuticulares para cada población no fueron significativas, con excepción de Hobonil 2 en el cual la correlación resultó ser negativa (Cuadro 4.3.2). Estos resultados sugieren que la herbivoría observada a nivel individual en esta población esta correlacionada con una menor producción de ceras.

Cuadro 4.3.2 Regresiones lineales entre el rendimiento de *C. aconitifolius* y el índice de herbivoría para cada una de las poblaciones.

Población	Estadístico		
	r	p	g.l.
Dzemul	0.086	0.814	9
Cuxtal	-0.176	0.627	9
Hobonil 1	0.271	0.45	9
Hobonil 2	-0.715	0.03*	8

Sin embargo, es interesante mencionar que el coeficiente de correlación entre el índice de herbivoría considerando a todos los individuos, de todas las poblaciones, muestra que existe una asociación positiva con el rendimiento total de ceras ($r=0.352$, $p<0.05$, $N=39$; fig. 4.3.2); lo anterior indica que cuando los individuos de *C. aconitifolius* presentan una mayor herbivoría, la cantidad de ceras epicuticulares por cm^2 de área foliar se incrementa.

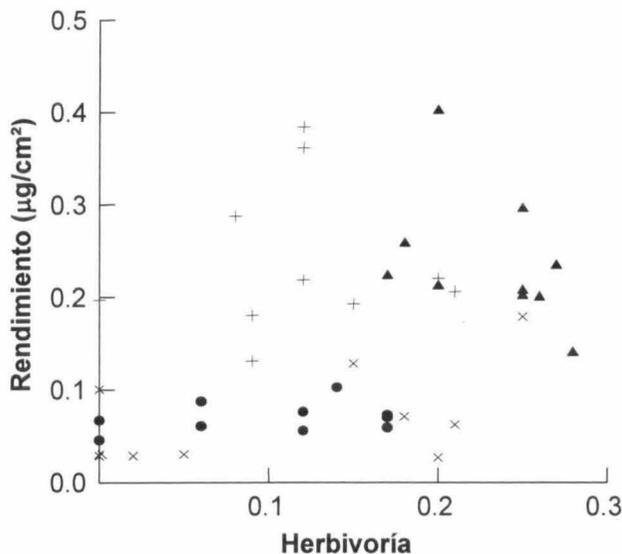


Fig. 4.3.2 Correlación entre el índice de herbivoría con el rendimiento total de ceras para el conjunto de poblaciones (X Dzemul, O Cuxtal, + Hobonil 1, Δ Hobonil 2).

En este análisis de correlación se asume que todos los individuos pertenecen a una misma "población" y se refleja la variación posible en los niveles de herbivoría asociados a *C. aconitifolius* en su rango de distribución en el estado de Yucatán.

El resultado positivo de esta correlación, sugiere que la actividad de los insectos herbívoros estimula la producción de ceras epicuticulares en *C. aconitifolius*. Existen numerosas evidencias de que las plantas responden al ataque de los herbívoros incrementando sus defensas tanto físicas como químicas (Harborne, 1999; Hick, et al, 1999; Agrawal & Rutter, 1998; Espinosa & Delgado, 1998; Marquis, 1992); a este tipo de respuesta se le conoce como "respuesta inducida". En general, se ha definido la respuesta inducida como cualquier cambio de la planta en respuesta al daño o estrés; esta respuesta estimula el fenotipo defensivo que puede producir un ambiente impredecible para los herbívoros (Agrawal & Rutter, 1998; Karban y Baldwin, 1997; Fritz & Simms, 1992). Los cambios inducidos pueden incrementar la "resistencia" de la planta a un ataque posterior, reduciendo su preferencia ante los herbívoros o teniendo un efecto directo sobre éstos. Estos cambios pueden también considerarse "defensas inducidas" (Pilson & Decker, 2002; Karban et al, 1997; Wold & Marquis, 1997; Karban & Myers, 1989; Karban & Carey, 1984). En particular en *C. aconitifolius* se ha comprobado que esta especie responde de muchas formas a la herbivoría (Parra-Tabla et al, 2004), pero en especial se ha observado que la herbivoría induce a una mayor producción de tricomas foliares (Abdala, 2003). Estas evidencias sugieren que la relación positiva observada en la producción de ceras y el nivel de herbivoría, pueden estar reflejando una respuesta de defensa inducida en *C. aconitifolius*.

Los resultados obtenidos en el capítulo 2, muestran que los factores ambientales aparentemente no son tan determinantes en la producción de ceras epicuticulares en las diferentes poblaciones de estudio, ya que ni la precipitación, ni la evaporación estuvieron correlacionados con el rendimiento total de las ceras, aunque si la temperatura. Estas evidencias sugieren fuertemente que en *C. aconitifolius* existe una posible relación causal entre el nivel de herbivoría y la producción de ceras

epicuticulares, que en términos de importancia relativa, la herbivoría presenta una importancia mayor como factor de explicación.

Lo anterior se puede observar con claridad en las poblaciones de Hobonil 2 y Dzemul. La población de Hobonil 2 presentó el nivel de herbivoría mas alto (32%) y una concentración elevada de ceras ($7.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) comparada con la población de Dzemul que mostró una herbivoría menor (20%) y una concentración de ceras también menor ($2.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Sin embargo las dos poblaciones presentaron una precipitación similar en el mes de septiembre (250mm), lo que sugiere que los niveles de precipitación no son importantes en la producción de ceras, pero sí la herbivoría.

Todo lo anterior sugiere que en respuesta al daño causado por los herbívoros *C. aconitifolius* produce un mayor rendimiento total de ceras, posiblemente para tratar de disminuir el costo directo de la herbivoría en la reproducción. En estudios previos, se ha detectado una disminución en la reproducción de *C. aconitifolius* mediante una disminución en el número de flores y de frutos por efecto de la defoliación (Abdala, 2003; Carbajal, 1998).

Al evaluar las posibles correlaciones entre la concentración de los diferentes componentes principales y el índice de herbivoría, se encontró que éstas no fueron significativas dentro de las poblaciones (Cuadro 4.3.3; Fig. 4.3.3), debido posiblemente al limitado número de muestras. Sin embargo, al evaluar las correlaciones de los diferentes componentes con las poblaciones en conjunto, todos los componentes mostraron relaciones negativas y tres de ellos, el acetato de α -amirina, el acetato de β -amirina y la amirenona mostraron una relación significativa con la herbivoría (Cuadro 4.3.4). Estos resultados sugieren que a una mayor concentración de los componentes principales, el índice de herbivoría disminuye en el conjunto de poblaciones.

Cuadro 4.3.3 Regresiones lineales entre la concentración de los componentes principales de *C. aconitifolius* y el índice de herbivoría para cada una de las poblaciones.

Componente/ Población	Dzemul		Cuxtal		Hobonil 1		Hobonil 2	
	Estadístico							
	r	P	r	p	r	p	r	p
Alcano 1	0.039	0.914	-0.387	0.270	0.261	0.466	-0.012	0.975
Alcano 2	-0.070	0.847	-0.486	0.154	0.170	0.639	0.479	0.192
Amirenona	0.304	0.393	0.265	0.459	0.230	0.522	0.539	0.134
α -amirina	0.527	0.117	0.515	0.127	0.467	0.206	-0.192	0.595
β -amirina	0.118	0.746	0.559	0.093	0.322	0.364	-0.328	0.389
Aco. de α - amirina	0.100	0.784	-0.118	0.746	0.320	0.367	-0.184	0.635
Aco. de β - amirina	-0.113	0.757	0.071	0.846	0.221	0.540	-0.335	0.337

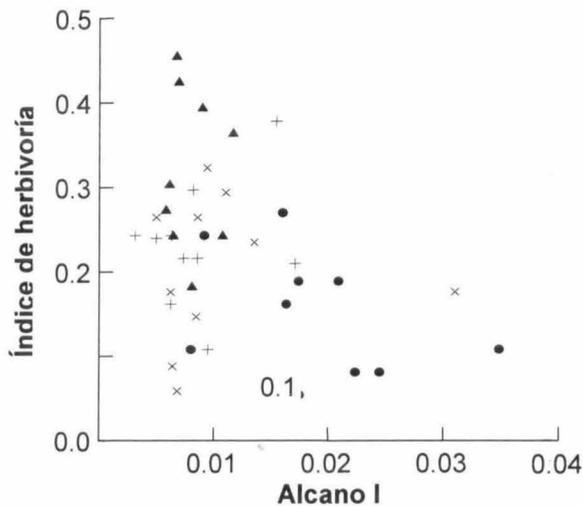
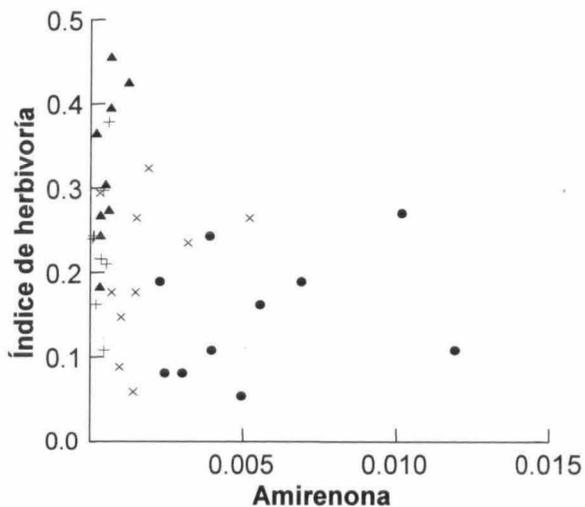
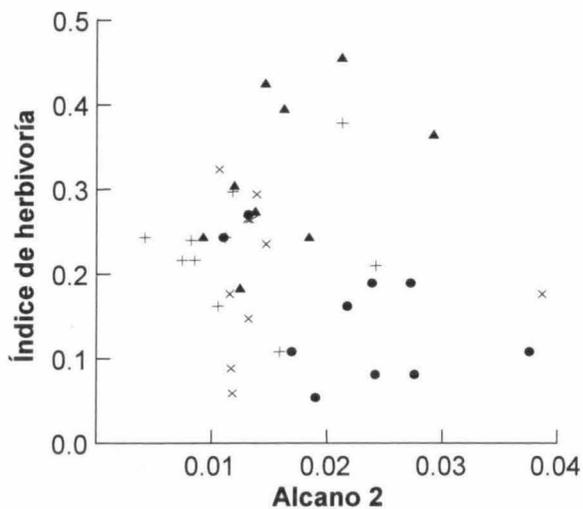
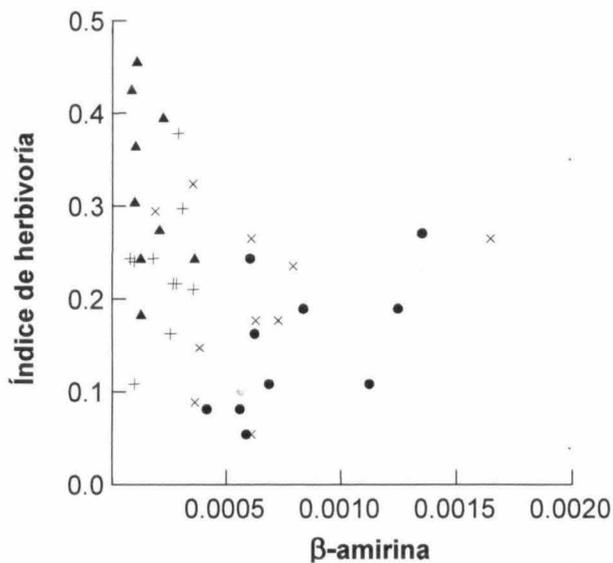
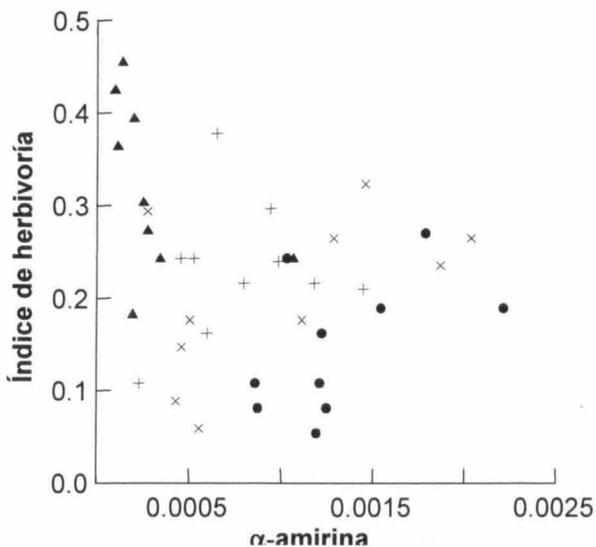


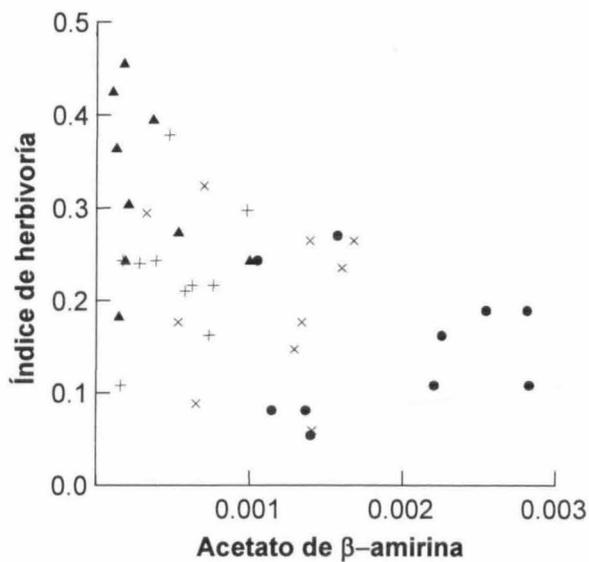
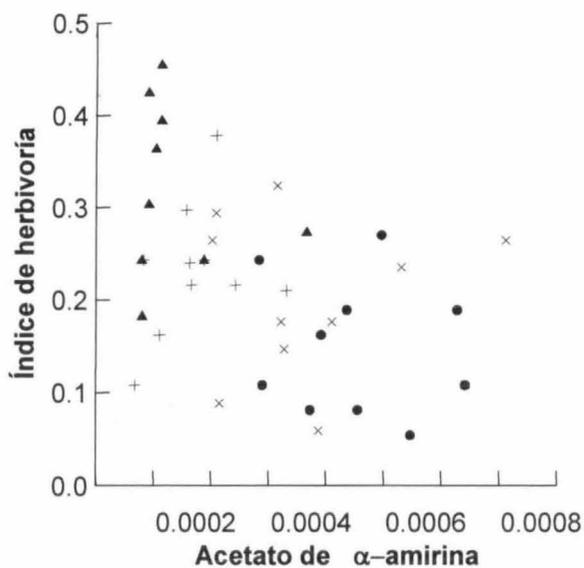
Fig. 4.3.3 Correlaciones entre el índice de herbivoría y los diferentes componentes principales de *C. aconitifolius* en las cuatro poblaciones de estudio. (X Dzemul, O Cuxtal, + Hobonil 1, Δ Hobonil 2)



Cont. Fig. 4.3.3 Correlaciones entre el índice de herbivoría y los diferentes componentes principales de *C. aconitifolius* en las cuatro poblaciones de estudio. (X Dzemul, O Cuxtal, + Hobonil 1, Δ Hobonil 2)



Cont. Fig. 4.3.3 Correlaciones entre el índice de herbivoría y los diferentes componentes principales de *C. aconitifolius* en las cuatro poblaciones de estudio. (X Dzemul, O Cuxtal, + Hobonil 1, Δ Hobonil 2)



Cont. Fig. 4.3.3 Correlaciones entre el índice de herbivoría y los diferentes componentes principales de *C. aconitifolius* en las cuatro poblaciones de estudio. (X Dzemul, O Cuxtal, + Hobonil 1, Δ Hobonil 2)

En el cuadro 4.3.4 se incluyen los componentes que presentaron una correlación significativa, e.g. el alcano 1, el acetato de α -amirina y el acetato de β -amirina.

Cuadro 4.3.4 Regresiones lineales entre la concentración de los componentes principales de *C. aconitifolius* y el índice de herbivoría en el conjunto de poblaciones.

Componente	Estadístico	
	r	p
Alcano 1	-0.347	0.031*
Alcano 2	-0.155	0.347
Amirenona	-0.277	0.088
α-amirina	-0.234	0.151
β-amirina	-0.289	0.074
Acetato de α-amirina	-0.411	0.009*
Acetato de β-amirina	-0.469	0.003*

Los alcanos son componentes comunes en las ceras epicuticulares de las plantas y han sido reportados como estimulantes de la alimentación y como deterrentes en especies de importancia económica (Sheperd et al. 1999; Eigenbrode & Pillai, 1998; Eigenbrode & Espelie, 1995; Eigenbrode et al. 1991; Woodhead, 1983; Klingauf et al. 1978). Se ha demostrado que las respuestas conductuales de los herbívoros dependen de la abundancia y del largo de la cadena hidrocarbonada (Eigenbrode & Espelie, 1995). Por ejemplo, se ha observado que en especies como *Brassica oleraceae* (col) (Eigenbrode & Pillai, 1998; Eigenbrode et al. 1991), *Rubus idaeus* (frambuesa) (Sheperd et al. 1999) y *Sorghum bicolor* (sorgo) (Woodhead, 1983), una elevada concentración de alcanos de cadena corta (C_{19} , C_{21} , C_{23}) actúa como deterrente contra sus herbívoros específicos (*Plutella xylostella*, *Amphorophora idaei* y *Locusta migratoria*, respectivamente). Por el contrario, se ha encontrado que en *Vicia faba* (frijol), una gran abundancia de alcanos de cadena larga (C_{27} , C_{29} , C_{31} , C_{33}) promueve la exploración y la herbivoría y posiblemente la oviposición por parte de *Acyrtosiphon pisum* (áfido) (Klingauf et al. 1971).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que en *C. aconitifolius*, el alcano 1 presente en gran abundancia podría ser de cadena corta debido a su correlación negativa con la herbivoría. Los terpenoides, desde los volátiles

(monoterpenos) hasta los no volátiles (triterpenos), son ampliamente defensivos contra la herbivoría en plantas. No solo los componentes individuales son tóxicos o antialimentarios, sino también las mezclas de metabolitos con estructuras relacionadas frecuentemente se combinan para producir un efecto tóxico o deterrente (Harborne, 1999). Los triterpenos más comúnmente reportados como componentes de las ceras epicuticulares en una gran variedad de plantas son la α -amirina y la β -amirina (Sheperd et al. 1999; Eigenbrode & Pillai, 1998; Balsdon et al. 1995; Eigenbrode & Espelie, 1995; Eigenbrode et al. 1991; Walton, 1990; Woodhead, 1983; Baker, 1974). Se ha observado que estas amirinas, a altas concentraciones, tienen un efecto negativo en la herbivoría; en estudios realizados con sorgo (*Sorghum bicolor*) se observó que 165 μ g/g de una mezcla de α -amirina y β -amirina confiere resistencia contra *Locusta migratoria* (Woodhead, 1983). Igualmente altas concentraciones de estos dos triterpenos confieren resistencia a *Rhododendron spp* (Azalea) contra *Stephanitis pyriodes* (Balsdon et al. 1995) y a *Rubus occidentalis* contra *Amphorophora idaei* (áfido) (Robertson et al. 1991) e inhiben la alimentación de *Plutella xylostella* en la especie vegetal *Brassica oleraceae* (col) (Eigenbrode & Pillai, 1998; Eigenbrode et al. 1991).

En este trabajo fueron los acetatos de α -amirina y β -amirina, los componentes que mostraron una correlación significativa y negativa con la herbivoría. Es de esperarse que su efecto sea similar al de los alcoholes correspondientes, ya que se ha reportado que el esqueleto triterpenoide característico de todos estos productos es lo que confiere el principio "amargo" en algunas plantas (Harborne, 1999). Por otro lado, aunque la relación entre la amirenona y la herbivoría mostró un valor marginalmente significativo, sería conveniente explorar el posible papel de este componente en torno a la resistencia. Para esto se sugiere incrementar el tamaño de muestra.

En general, las relaciones negativas entre los componentes observados y la herbivoría, así como el cúmulo de evidencias reportadas en otras especies, sugieren que efectivamente la herbivoría juega un papel importante en la naturaleza química de

las ceras. Sin embargo, se debe considerar el papel directo e indirecto de los factores ambientales para comprender a fondo las causas determinantes de la producción de ceras en las plantas.

4.4 CONCLUSIONES

Los resultados reportados en este capítulo sugieren que la actividad de los insectos herbívoros estimula la producción de ceras epicuticulares en *C. aconitifolius*, lo cual probablemente constituye una respuesta inducida por la herbivoría.

Los resultados muestran que el índice de herbivoría disminuye cuando la concentración de los componentes principales se incrementa, particularmente el de los compuestos alcano 1 y los acetatos de α -amirina y β -amirina.

Se sugiere llevar a cabo un análisis experimental que compruebe el efecto de los componentes principales como deterrentes en los principales herbívoros de *C. aconitifolius*.

4.5 REFERENCIAS

- Abdala, L.** 2003. variación geográfica e inducción de tricomas como respuesta a la defoliación en tres poblaciones de *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill) I.M: John (Euphorbiaceae). Tesis de licenciatura. FMVZ-UADY. Mérida, Yucatán.
- Agrawal, A. & M. Rutter.** 1998. Dynamic anti-herbivore defense in ant-plants: the role of induced responses. *Oikos*, **83**: 227-236.
- Alonso, C. & C.M. Herrera.** 1996. Variation in herbivory within and among plants of *Daphne laureola* (Thymelaeaceae): correlation with plant size and architecture. *Journal of Ecology*, **84**: 495-502.
- Baker, E. A.** 1974. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* Var. Gemmifera. *New Phytologist*, **73**: 955-966.
- Balsdon, J., Espelie, K. & S. Braman.** 1995. Epicuticular lipids from azalea (*Rhododendron* spp) and their potential role in host plant acceptance by azalea lace bug, *Stephanitis pyrioides* (Heteroptera: Tingidae). *Biochemistry, Systematics and Ecology*, **23**:477-485.
- Canto, A.** 2004. Ecología evolutiva de la herbivoría de *Anthurium Schlendentalii* subsp. *Schlendentalii* Kunth (Araceae) en ambientes heterogéneos. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz.
- Canto-Aguilar, A., Parra-Tabla, V. & García-Franco, J.** 2004. Variation in growth and floral display of *Anthurium schlechtendalii* (Araceae) in response to herbivory and environment. *Functional Ecology* (en prensa).
- Carbajal, M.** 1998. Biología reproductiva y efectos de la herbivoría foliar en la expresión sexual y el éxito reproductivo en la planta gimnomoica *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill) I.M: John (Euphorbiaceae). Tesis de Licenciatura. FMVZ-UADY. Mérida, Yucatán.
- Chapman, R. & E. Bernays.** 1989. Insect behavior at the leaf surface and learning as aspects of host plant selection. *Experientia*, **45**: 215-222.
- Coley, P. & J. Barone.** 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**: 305-335.
- Coley, P., Bryant, J. & F. Stuart.** 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**(4728):895-899.

- Crawley, J.** 1983. Herbivory, the dynamics of plant-animal interactions. Blackwell Scientific Publications. U.K.
- Eigenbrode, S. & Espelie, K. & A. Shelton.** 1991. Behavior of neonate diamondback moth larvae [*Plutella xylostella* (L.)] on leaves and on extracted leaf waxes of resistant and susceptible cabbages. *Journal of Chemical Ecology*, **17**(8):1691-1704.
- Eigenbrode, S. & K. Espelie.** 1995. Effects of plant epicuticular lipids on insects herbivores. *Annual Review of Entomology*, **40**: 171-194.
- Eigenbrode, S. & S. Pillai.** 1998. Neonate *Plutella xylostella* responses to surface wax components of a resistant cabbage (*Brassica oleraceae*). *Journal of Chemical Ecology*, **24** (10):1611-1627.
- Espinosa, F. & G. Delgado.** 1998. Relationship between ecology of plant defense and the prospection of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. *Revista Latinoamericana de Química*, **26**(1): 13-26.
- Fritz, R. & E. Simms.** 1992. Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution and genetics. University of Chicago Press. pp. 590.
- Harborne, J.** 1999. Plant chemical ecology. *In*: Comprehensive natural products chemistry. Barton, D. & Nakanishi, K. (eds). Elsevier Science Ltd. U.K.
- Hick, A., Luszniak, M. & J. Pickett.** 1999. Volatile isoprenoids that control insect behaviour and development. *Natural Products Report*, **16**: 39-54.
- Karban, R., Agrawal, A. & M. Mangel.** 1997. The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology*, **78** (5): 1351-1355.
- Karban, R. & I. Baldwin.** 1997. Induced responses to herbivory. University of Chicago Press. Chicago, USA. pp 319.
- Karban, R. & J. Myers.** 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **20**: 331-348.
- Karban, R. & J. Carey.** 1984. Induced resistance of cotton seedlings to mites. *Science*, **225** (4657): 53,54.

- Klingauf, F., Nöcker, K. & W. Klein.** 1971. Einfluss einiger Wachskomponenten von *Vicia faba* L. auf das Wirtswahlverhalten von *Acyrtosiphon pisum* (Harris)(Homoptera: Aphididae): In **Eigenbrode, S. & S. Pillai.** 1998. Neonate *Plutella xylostella* responses to surface wax components of a resistant cabbage (*Brassica oleraceae*). Journal of Chemical Ecology, **24** (10):1611-1627.
- Marquis, R.J.** 1992. The selective impact of herbivores. pp. 301-325. In Fritz, R.S, Simms, E.L (eds), Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution and genetics. University of Chicago press, Chicago, USA.
- Núñez-Farfán, J. & R. Dirzo.** 1994. Responses to herbivory and increased plant performance. Evolution, **48**(423): 392-425.
- Parra- Tabla, V., Rico-Gray, V. & M. Carbajal.** 2004. Effect of defoliation on leaf growth sexual expression and reproductive success of *Cnidoscopus aconitifolius* (Euphorbiaceae). Plant Ecology, **173**: 153-160.
- Parra- Tabla, V. & S. Bullock.** 1998. Factors limiting fecundity of the tropical tree *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae) in a Mexican tropical dry forest. Journal of Tropical Ecology, **14**: 615-627.
- Pilson, D. & K. Decker.** 2002. Compensation for herbivory in wild sunflower: response to simulated damage by the head-clipping weevil. Ecology, **83** (11): 3097-3107.
- Robertson, G. W., Griffiths, D. W., Birch, A. N. E., Jones, A. T., McNicol, J. W. & J. E. Hall.** 1991. Further evidence that resistance in raspberry to virus vector aphid, *Amphorophora idaei*, is related to the chemical composition of the leaf surface. Annual Applied Biology, **119**:443-449.
- Rodríguez, F. P.** 2004. Estudio comparativo de poblaciones de *Cnidoscopus aconitifolius* (Mill) I.M: John (Euphorbiaceae) de Yucatán, México: fenología, gremio de polinizadores, éxito reproductivo y estructura genética. Tesis de licenciatura. FMVZ-UADY. Mérida, Yucatán.
- Sheperd, T., Robertson, G., Griffiths, D. & A. Birch.** 1999. Epicuticular wax composition in relation to aphid infestation and resistance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). Phytochemistry, **52**:1239-1254.
- SYSTAT 10.** 2000. Statistic I. SPSS Inc. Chicago.
- Walton, T. J.** 1990. Waxes, cutin and suberin, pp. 105-158, In: Methods in plant biochemistry. P.M. Dey & J.B. Harborne (eds). Academic Press. USA.

Wold, E. & R. Marquis. 1997. Induced defense in white oak: effects on herbivores and consequences for the plant. *Ecology*, **78** (5): 1356-1369.

Woodhead, S. 1983. surface chemistry of *Sorghum bicolor* and its importance in feeding by *Locusta migratoria*. *Physiological Entomology*, **8**:345-352.

Zar, J. 1984. Biostatistical analysis. Prentice Hall. New Jersey.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados sugieren que el rendimiento y la composición química de las ceras epicuticulares de *C. aconitifolius* no están ligados de manera determinante a los factores ambientales, aún cuando la temperatura podría considerarse como un factor importante pero con una importancia relativa menor. Al mismo tiempo, los resultados obtenidos muestran que, tanto la producción de ceras como el contenido de los metabolitos principales, son inducidos por la presión de los herbívoros.

También, los resultados demuestran que una baja producción de ceras epicuticulares puede ser compensada por una alta concentración de metabolitos secundarios con actividad deterrente, en tanto que la producción de una mayor cantidad de ceras epicuticulares, utilizada como una barrera física contra los herbívoros, requiere de una menor concentración de productos mayoritarios.

Finalmente, interacciones bióticas, como es el caso de las interacciones planta-herbívoro, dependen de las condiciones temporales y espaciales específicas en donde ocurre dicha interacción. Por esta razón, estudios como el presente en el que se considera una respuesta específica de una o más poblaciones de plantas a un posible factor biótico en un contexto de heterogeneidad ambiental, resultan de especial importancia para comprender la complejidad dinámica involucrada en este tipo de interacciones.

PERSPECTIVAS

Los avances obtenidos en el presente trabajo demuestran la importancia del estudio de las ceras epicuticulares y su relación con los herbívoros en poblaciones naturales.

Las correlaciones encontradas entre la cantidad y composición química de las ceras epicuticulares con los factores abióticos nos demuestran que éstas son continuamente modificadas por el ambiente. Por lo tanto, resultaría interesante evaluar, ya sea en condiciones experimentales específicas o con muestreos más intensos, el nivel y rapidez de respuesta en términos de la producción y composición de las ceras epicuticulares en las hojas de *C. aconitifolius*. Para el primer caso se podrían establecer experimentos de riego artificial *in situ* o diferentes intensidades de luz, mientras que en el segundo caso se podría evaluar en una misma población, los cambios temporales en condiciones naturales que incluyeran diferentes situaciones ambientales (e.g. temporada de lluvias vs. temporada de secas).

Aún cuando se reconoce que una de las funciones principales de las ceras epicuticulares es evitar la pérdida excesiva de agua en plantas, la relación entre el rendimiento de éstas con la herbivoría, en el conjunto de poblaciones de estudio sugiere otra posible función. Sería interesante realizar estudios adicionales en los que se incremente el tamaño de la muestra con el fin de determinar la consistencia de la correlación entre la herbivoría y el rendimiento total de ceras y el rendimiento y la composición de las mismas. De igual forma, es importante hacer una evaluación de la comunidad de herbívoros con el fin de conocer más profundamente su diversidad, sus características y el efecto de la cantidad y estructura de las ceras epicuticulares sobre su conducta (modo de alimentación y movimiento) y sobretodo, confirmar si la inducción de ceras epicuticulares por herbívoros es posible.

Asimismo, sería conveniente evaluar en experimentos controlados, el efecto de los principales componentes hacia los herbívoros, así como el efecto de los componentes que fueron marginalmente significativos y de las mezclas de los mismos.

Finalmente, sería interesante llevar a cabo la identificación de los metabolitos producidos en mayor abundancia en las ceras epicuticulares de las poblaciones de Hobonil.