

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biología Ambiental**

**Variación genética en la concentración de fenoles totales y
densidad de tricomas asociados a la defensa en chile silvestre
Capsicum annuum var. *glabriusculum***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Carlo Germán González Vera

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por

Carlo Germán González Vera

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Maria Clara Arteaga Uribe
Co-Directora de tesis

Dr. Rafael Bello Bedoy
Co-Director de tesis

Dra. Fadia Sara Ceccarelli

Dr. Ernesto García Mendoza



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Carlo Germán González Vera © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Carlo Germán González Vera** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental.

Variación genética en la concentración de fenoles y densidad de tricomas asociados a la defensa en chile silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*

Resumen aprobado por:

Dra. María Clara Arteaga Uribe

Co-Directora de tesis

Dr. Rafael Bello Bedoy

Co-Director de tesis

Las especies de plantas que tienen una amplia distribución geográfica están expuestas a diferentes ambientes a lo largo de su distribución, lo que a su vez repercute en las diferentes interacciones biológicas y estrategias defensivas de la planta. *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, tiene una amplia distribución en México, y se espera que aquellas poblaciones que se encuentran más cercanas entre sí, sean más parecidas tanto genéticamente como en la producción de caracteres defensivos. Se realizó un experimento de jardín común donde se evaluó la variación en la defensa e inducción en 31 líneas maternas de chile silvestre. Como indicador de la producción de defensas químicas se utilizó la concentración de fenoles totales, y para defensas físicas, se utilizó densidad de tricomas foliares. Para evaluar la inducción de defensa, se realizaron dos tratamientos: daño mecánico, y daño mecánico adicionando secreciones orales del herbívoro *Lema daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). Se encontró una gran variación tanto en la defensa constitutiva como inducida en chile silvestre, lo cual sugiere variabilidad genética en relación a caracteres defensivos. Los tratamientos de daño presentaron diferente efecto en la defensa química y física, y la respuesta a los tratamientos de daño fue diferente al control solo en el caso de la densidad de tricomas. La ausencia de un trade-off entre contenido total de fenoles y densidad de tricomas sugiere que para el chile silvestre *C. a.* var. *glabriusculum*, las defensas química y física tienen la capacidad de evolucionar independientemente.

Palabras clave: Defensa, chile silvestre, chiltepín, densidad de tricomas, fenoles, México, resistencia

Abstract of the thesis presented by **Carlo Germán González Vera** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Environmental Biology.

Genetic variation in total phenolic content and trichome density associated to defense in wild chili
Capsicum annuum var. *glabriusculum*

Abstract approved by:

Dra. Maria Clara Arteaga Uribe

Co-Directora de tesis

Dr. Rafael Bello Bedoy

Co-Director de tesis

Plant species with a wide geographic distribution are exposed to different environments throughout their distribution, which in turn affect the different biological interactions and defensive strategies of the plant. *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, wild chili, has a wide distribution in Mexico, and it is expected that those populations that are closer to each other, to be more similar both genetically and in the production of defensive traits. A common garden experiment was conducted to evaluate the variation in defense and induction in 31 dam lines of wild chili. As an indicator of the production of chemical defenses, total phenolic content was used, and for physical defenses, density of foliar trichomes was used. To evaluate the induction of defense, two treatments were used: mechanical damage, and mechanical damage adding oral secretions of the herbivore *Lema daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). Considerable variation was found in both constitutive and induced defense in wild chili, which suggests genetic variability in relation to defensive traits. Damage treatments had different effects on chemical and physical defense, and it was observed that the response to damage treatments was different from control only in the case of trichome density. The absence of a trade-off between total phenolic content and trichome density suggests that for wild chili *C. a.* var. *glabriusculum*, chemical and physical defenses have the capacity to evolve independently.

Keywords: Defence, chiltepín, Mexico, phenolics, resistance, trichome density, wild chili

Dedicatoria

A mis padres.

Siempre me han apoyado y han confiado en mí. Por permitirme crecer y ayudarme a mejorar todos los días.

A mi hermano.

Por ser un modelo a seguir, y siempre estar conmigo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento al proyecto: Variación genética de la defensa constitutiva e inducida contra herbívoros y patógenos en chile silvestre *Caspicum annuum* var *glabriusculum* (Clave 225331), del cual es parte este trabajo de tesis. Así como por el apoyo económico brindado a través de la beca que me fue otorgada, la cual fue instrumental en poder llevar a cabo mis estudios de maestría dentro del programa de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), y al posgrado en ciencias de la Vida, por brindarme un lugar donde llevar a cabo mis estudios, el apoyo otorgado para participar en el VII Congreso Mexicano de Ecología de la Sociedad Científica Mexicana de Ecología (SCME) y el apoyo económico que me permitió finalizar la escritura de esta tesis. De igual forma, a todo el personal administrativo que me ha ayudado a resolver las cosas eficientemente.

Al departamento de Biología de la Conservación, por el espacio brindado, así como el apoyo académico.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por el apoyo brindado, así como el uso de instalaciones para poder llevar a cabo mi trabajo experimental.

Al Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución de la UABC, por brindarme un espacio para trabajar y donde llevar a cabo mi experimento para el trabajo de tesis.

A mis directores de tesis, Dr. Rafael Bello Bedoy y Dra. Maria Clara Arteaga Uribe, por permitirme ser parte de su proyecto, y tener la confianza de llevar a término esta investigación. Su orientación fue instrumental en aprender a llevar a cabo un trabajo de investigación de manera adecuada.

A los miembros del sínodo, Dra. Fadia Sara Ceccarelli y Dr. Ernesto García Mendoza, por su tiempo y comentarios que me permitieron mejorar mi trabajo.

A los miembros del laboratorio de Genética de la Conservación, por sus enseñanzas y ayuda en el trabajo de laboratorio.

A los miembros del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, por su ayuda en la toma de datos y apoyo cuidando las plantas. Asimismo, por las invaluable discusiones que ayudaron a enfocar este trabajo.

A mis padres y mi hermano, que me han apoyado en todo mi trabajo y me impulsan a mejorar cada día.

A Juan Carlos Vásquez Vera, quien diseño y elaboró herramientas que fueron instrumentales en poder procesar mis muestras de manera eficiente.

A mis compañeros y amigos. Rocío, Ketzaly, Edgar, Leonardo, Diego, Adolfo, Mateo, Joel, Atziri, Carlos, Carlos, Haran, Juan, Roberto, Diego, Ariadna, Cipatli, Eric, Alberto, Rodrigo, Anaid, Alejandro, Leslie, Norma, Judith, Manuel, Ramiro, Rodrigo. Por su compañía y apoyo.

A Rocío, por todo.

Tabla de Contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Antecedentes.....	4
1.2 Justificación	5
1.3 Hipótesis	5
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1 Objetivo general	6
1.4.2 Objetivos específico.....	6
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Sistema de Estudio.....	7
2.2 Material Vegetal.....	8
2.3 Diseño Experimental.....	10
2.3.1 Germinación.....	10
2.3.2 Experimento de jardín común.....	10
2.3.3 Cuantificación de fenoles totales en función de tiempo.....	11
2.3.4 Tratamientos de daño foliar.....	11
2.3.5 Prensado de hojas.....	12
2.3.6 Cuantificación de fenoles totales.....	13
2.3.7 Conteo de tricomas foliares.....	15
2.3.8 Análisis estadístico.....	16
2.3.9 Genotipificación.....	17

Capítulo 3. Resultados

3.1 Concentración de fenoles totales: Peso seco vs Peso húmedo.....	21
3.2 Respuesta temporal ante daño.....	21
3.3 Concentración de fenoles totales en respuesta al daño.....	22
3.4 Número de tricomas foliares en respuesta al daño.....	24
3.5 Trade-off entre concentración de fenoles totales vs densidad de tricomas.....	27
3.6 Genotipificación.....	27

Capítulo 4. Discusión

4.1 Variación genética de la resistencia.....	30
4.2 Concentración de fenoles totales.....	31
4.3 Densidad de tricomas.....	32
4.4 Trade-off defensivo.....	34

Capítulo 5. Conclusiones..... 36**Literatura citada.....** 37

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Mapa de los sitios de recolecta de las semillas de las 31 líneas maternas utilizadas en el experimento de jardín común.....	8
2	Diagrama esquemático del experimento de inducción de defensa en <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	12
3	Curva de calibración para determinar concentración de fenoles totales utilizando ácido gálico como estándar	14
4	Representación gráfica del área de conteo de tricomas.....	16
5	Variación temporal en la concentración de fenoles totales foliares en respuesta a daño.....	22
6	Variación de 31 líneas maternas de chile silvestre en la concentración de fenoles totales.....	23
7	Inducción en la concentración de fenoles totales.....	24
8	Microfotografías mostrando el intervalo de densidad de tricomas foliares para <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	25
9	Promedio del número de tricomas para el tratamiento control, daño mecánico y daño mecánico + SO de <i>Lema daturaphila</i>	25
10	Variación de 31 líneas maternas de chile silvestre en la densidad de tricomas foliares.....	26
11	Inducción en la densidad de tricomas foliares.....	26

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Coordenadas geográficas de las 31 líneas maternas utilizadas en el experimento de jardín común.....	9
2 Concentración de reactivos utilizada para mezcla de PCR.....	19
3 Marcadores de cloroplasto, y protocolo de PCR utilizado para cada uno.....	19
4 Análisis de varianza de concentración de fenoles totales en relación al tiempo y al tratamiento para el experimento con <i>Spodoptera frugiperda</i>	22
5 Análisis de varianza de concentración de fenoles totales en respuesta a tiempo y tratamiento de daño para el experimento con <i>Lema daturaphila</i>	22
6 Análisis de varianza de concentración de fenoles totales para las 31 líneas maternas, el tratamiento y su interacción.....	23
7 Análisis de varianza de densidad de tricomas foliares para las 31 líneas maternas, el tratamiento y su interacción.....	25
8 Tamaño promedio obtenido para cada región de cloroplasto amplificada, así como el número total de polimorfismos encontrados para cada uno.....	28

Capítulo 1. Introducción

La herbivoría es una interacción frecuente en ambientes naturales y agrícolas. Los herbívoros causan daño al consumir las plantas, reduciendo su supervivencia, crecimiento y adecuación (Carmona et al., 2011). Para evitar el efecto negativo del consumo por herbívoros, las plantas han evolucionado mecanismos de defensa físicos y químicos, que reducen o minimizan el impacto causado por los herbívoros (Gong y Zhang, 2014; Howe y Schaller, 2008; Kessler y Kalske, 2018). A pesar de la relevancia que tienen los rasgos defensivos de las plantas, es común detectar variación en la cantidad de estructuras físicas o químicas dentro y entre poblaciones (Agrawal, 2007; Hahn et al., 2018; Hahn y Maron, 2016; Karban, 2011), sugiriendo que hay condiciones genéticas y ambientales implicadas en el nivel defensivo. Por ejemplo, los ambientes de herbivoría pueden variar espacialmente debido a la diferencia en abundancia y/o tipo de herbívoros resultando en diferencias en la intensidad de daño (Castillo et al., 2014; Glassmire, 2017; Moore et al., 2014). Dado que la presencia de herbívoros depende en parte de las condiciones abióticas de cada sitio, habrá una presión diferencial ejercida en las plantas de cada uno. La presencia de herbívoros favorece la inversión de energía en defensa (Agrawal, 1999; Erb, 2018), mientras que en ausencia de ellos, la inversión de recursos en estructuras defensivas no es tan importante. Como resultado, la inversión de recursos en defensa puede generar una disyuntiva entre defensa, crecimiento y/o reproducción (i.e., Trade-off) (Koricheva *et al.*, 2004; Leimu y Koricheva, 2006; Neilson *et al.*, 2013), lo que debería de favorecer a plantas con menor nivel defensivo. Esto resulta en la formación de un mosaico espacio temporal en la magnitud de la interacción planta-herbívoro, con poblaciones que tienen diferente nivel de resistencia contra herbívoros (Kessler, 2016; Thompson, 1999).

La resistencia es la capacidad de las plantas para evitar o reducir el daño causado por herbívoros o patógenos (Simms y Rausher, 1987). La resistencia está conformada por estructuras químicas como fenoles o alcaloides, y físicas, como tricomas y espinas (Stenberg y Muola, 2017), las cuales pueden representar un costo energético elevado para la planta (Agrawal, 2011). Para invertir menos recursos en ambientes de herbivorismo impredecible, las plantas han desarrollado estrategias de defensa que se expresan solamente después de que ha ocurrido daño (Agrawal, 1998; Barton, 2016; Frost et al., 2008). Las estructuras defensivas que se encuentran continuamente en las plantas se conocen como constitutivas, en contraste con las inducidas, que son aquellas que se producen o incrementan una vez que ocurre daño por herbívoros (Gatehouse, 2002; Schultz et al., 2000). En principio, al tener defensas inducibles, las plantas invierten pocos recursos en defensa inicialmente, y una vez que el daño ocurre se incrementa la producción de mecanismos que reducen su incidencia (Kempel et al., 2011). Una planta sujeta a daño frecuente se beneficiaría de producir defensas constitutivas, mientras que una planta con

menor presión por depredación tendrá preferencialmente defensas inducibles (Rasmann et al., 2015; Wittstock y Gershenzon, 2002). Asimismo, las defensas constitutivas suelen caracterizarse por ser efectivas contra una amplia gama de herbívoros y patógenos, y funcionan como protección de organismos no especializados (Kessler, 2015; Vermerris y Nicholson, 2006b; Wittstock y Gershenzon, 2002), mientras que las inducidas pueden presentar patrones de respuesta específicas al herbívoro que causó el daño (Agrawal, 2000, 2011).

Tanto las defensas químicas y físicas contra herbívoros pueden ser constitutivas o inducidas. Las defensas físicas son un barrera mecánica contra los herbívoros y estas pueden ser espinas, dureza de las hojas, y tricomas (Howe y Schaller, 2008). En diversos estudios se ha demostrado que los tricomas reducen el daño por herbívoros, indicando un papel defensivo (Holeski et al., 2010; Karkkainen et al., 2004; Kwon et al., 2006; Peter et al., 1995), especialmente contra insectos (Levin, 1973). Además, se ha registrado una relación positiva entre la variación en número/densidad de tricomas y la adecuación de las plantas, indicando que los herbívoros ejercen una presión selectiva que favorece la producción de tricomas (Valverde et al., 2001). Finalmente, se ha demostrado que el número de tricomas incrementa en respuesta al daño en muchas plantas, y que este incremento reduce significativamente la tasa de consumo por herbívoros (Dalin et al., 2008; Kariyat et al., 2017; Tian et al., 2012).

La síntesis de metabolitos secundarios es otro mecanismo de defensa de las plantas contra herbívoros. Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios implicados en la defensa, entre ellos fenoles, alcaloides y terpenos. Los fenoles son uno de los grupos más diversos y numerosos (Bi et al., 1997; Cheyner et al., 2013; Close y Mcarthur, 2002; Cooper-Driver et al., 1998; Lattanzio et al., 2012; Özek, 1999). Estos se caracterizan por poseer uno o más anillos aromáticos hidroxilados (Boudet, 2007; Vermerris y Nicholson, 2006b, 2006a), encontrándose en casi todas las plantas, y tienen diversas funciones, tal como soporte estructural, señalización y protección (Castro y Demarco, 2008; Li et al., 2010; Mandal et al., 2010; Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Tohge et al., 2013; Vermerris y Nicholson, 2006b). De igual forma, en plantas, son parte de diversas rutas metabólicas en respuesta a estrés, tanto biótico como abiótico (Close y Mcarthur, 2002; Cooper-Driver et al., 1998; Harborne, 1994; Özek, 1999). En relación a la defensa, los fenoles confieren protección contra herbívoros y patógenos (Bennett y Wallsgrove, 1994; Boudet, 2007; del Campo et al., 2013; Kariño-Betancourt, 2018; Lattanzio et al., 2006; Mazid et al., 2011; War et al., 2012).

Los fenoles se sintetizan por dos rutas metabólicas, las rutas del ácido shikímico y por la ruta del ácido malónico, sin embargo, la ruta del ácido malónico se considera de mayor importancia en hongos y

bacterias (Özeker, 1999; Taiz y Zeiger, 2010). A partir de la ruta del ácido shikímico, se sintetizan los aminoácidos fenilalanina y tirosina, precursores de los compuestos fenólicos (Herrmann, 1995; Santos-Sánchez et al., 2019). Las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y tirosina amonio liasa (TAL) convierten a los aminoácidos fenilalanina y tirosina en ácido cinámico y ácido cumárico respectivamente. Estas moléculas son posteriormente modificadas para dar origen a la diversidad de fenoles producidos por las plantas (Deng y Lu, 2017; Giebel, 1973; Tohge et al., 2013). Una vez que se sintetizan, los fenoles se almacenan en vacuolas dentro de la célula vegetal, y estos se liberan después de un evento de daño o estrés. Una vez liberados, estos pueden funcionar como defensa, o reaccionar por medio de diversos mecanismos de acción (Beckman, 2000; Kefeli et al., 2003; Lattanzio et al., 2012; Takahama, 2004).

Variación geográfica de la resistencia

La variación en el daño por herbívoros entre y dentro poblaciones es un fenómeno común en plantas. Entre otros factores, se ha encontrado que una de las causas que explica las diferencias en el tipo y/o intensidad de daño es la defensa de las plantas, ya que esta varía entre poblaciones (Martínez-Díaz et al., 2015; McGovern y Hellberg, 2002; Moreira et al., 2014; Wahyuni et al., 2011). De acuerdo con la teoría del mosaico geográfico de la coevolución es posible entender las diferencias en los niveles de defensa entre poblaciones si se considera que 1) la presión selectiva que ejercen los herbívoros sobre las plantas es heterogénea, y 2) que la presión selectiva depende de las interacciones bióticas entre dos o más especies y las condiciones ambientales particulares donde estas ocurren. Dado que estas condiciones tenderán a variar geográficamente, esto da como resultado un mosaico geográfico que difiere en la presencia y magnitud de la selección, reflejándose en las estrategias defensivas de las plantas del sitio (Glassmire et al., 2016; Kariño-Betancourt, 2018; Kessler, 2015, 2016; Moore et al., 2014; Thompson, 1999). Por ejemplo, se ha encontrado que en poblaciones vegetales donde se ha reducido la incidencia de herbívoros también se reduce rápidamente la producción de compuestos defensivos (Kessler, 2015). Por su parte, Castillo *et al.*, (2014) detectaron que en *D. stramonium* L. la diferencia entre poblaciones en la concentración de alcaloides está asociada a la presencia de diferentes herbívoros.

El patrón de variación de defensa también se ha asociado con la distribución de la variación genética de las poblaciones, pues los genes implicados en la defensa muestran diferenciación en función de la localidad (Garrido et al., 2012; Stackpole et al., 2011; Züst et al., 2012). Asimismo, un proceso de selección diferencial se observa en el genotipo de las poblaciones, pues se ha encontrado que los polimorfismos genéticos están asociados a la presencia de diferentes comunidades de herbívoros (Johnson y Agrawal, 2005; Züst et al., 2012).

Se ha encontrado que una mayor variabilidad genética se relaciona con una mayor capacidad de resistir ante organismos antagonistas, tanto herbívoros como patógenos (Abdala-Roberts et al., 2015; Berny-Mier y Teran et al., 2013). Dado que los caracteres defensivos están bajo el control de varios genes, la diversidad genética promueve diferentes niveles de respuesta y por ende diferente adecuación al ambiente (Berenbaum y Zangerl, 2012; Harvell, 1990). Es por esta razón que se considera que la variación intraespecífica es necesaria para que una especie pueda responder ante los cambios que puedan ocurrir en sus poblaciones, así como como dentro de ellas (Züst et al., 2012).

1.1 Antecedentes

Capsicum annuum L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser y Pickergill, 1975, es el ancestro silvestre de los chiles domesticados (Aguilar-Meléndez et al., 2009; González-Jara et al., 2011; Hayano-Kanashiro et al., 2016; Montes-Hernández, 2010). En contraste a la importancia culinaria y cultural de *C. annuum* L. en México, se conoce muy poco de su historia natural, ecología y evolución. Algunos estudios han demostrado que la capsicina tiene un papel defensivo, protegiendo a las semillas de infección por hongos debido a su actividad fungicida (Tewksbury et al., 2006). Además, el picor que causa la capsicina del fruto evita la depredación, protegiendo a las semillas (Tewksbury y Nabhan, 2001). Para el caso de su interacción planta-herbívoro, recientemente se han demostrado que existe variación en el daño foliar entre poblaciones que se distribuyen en La Sierra de Laguna, Baja California Sur. Dipp-Alvarez (2015) encontró que en poblaciones que se distribuyen en La Sierra de Laguna, aquellas con mayor densidad de tricomas en las hojas mostraban menos daño foliar en relación a poblaciones que presentan menor densidad de tricomas foliares, indicando que los tricomas son un componente de la resistencia contra herbívoros en esta especie. Asimismo, reportó que la tasa de herbivoría en estas poblaciones varía entre 7 y 12%. Sin embargo, es posible que haya compuestos químicos que expliquen parte de la variación en el daño observado en estas poblaciones. Si la relación entre el daño y la adecuación varía entre las poblaciones o regiones geográficas, esto podría determinar la evolución diferencial de estrategias defensivas en cada una de sus poblaciones.

El papel defensivo de los compuestos químicos foliares de *C. a. var. glabriusculum* contra herbívoros ha sido poco estudiado. Este aspecto de la química defensiva igualmente se desconoce para otras especies dentro del mismo género. Lo poco que se ha estudiado, sugiere que los fenoles confieren defensa contra insectos en *Capsicum* L. (Vijaya y Rani, 2017a). Se ha encontrado que los niveles de fenoles incrementan ante el ataque por el herbívoro generalista *Spodoptera litura* Fabricius, 1775 (Vijaya y Rani, 2017b, 2017a).

Por otra parte, en experimentos donde se ha infectado *Capsicum* con el hongo patógeno *Phytophthora capsici* Leonian, 1922 se han observado diversos patrones: variación en la resistencia al patógeno por parte de los diferentes cultivos inoculados; incremento en la cantidad de fenoles producidos; o reducción en la producción de fenoles iniciales, pero la producción de una nueva mezcla de fenoles (Candela et al., 1995; Lizzi et al., 1995).

1.2 Justificación

Hasta ahora, no hay estudios comparativos que permitan conocer las concentraciones fenólicas entre poblaciones de chile silvestre y si estas presentan un patrón similar a la densidad de tricomas foliares. De igual forma, se desconoce si hay una respuesta defensiva diferencial ante daño por parte de plantas de chiltepín provenientes de diferentes ambientes.

Por tanto, se desconoce si la concentración de fenoles totales foliares, así como la densidad de tricomas en las plantas de chile silvestre *Capsicum annum* var. *glabriusculum* varía entre genotipos dentro de la especie. Asimismo, se desconoce si hay una respuesta tras un evento de daño por herbívoro, y si esta respuesta es diferente entre los diferentes genotipos.

1.3 Hipótesis

Las poblaciones de especies de plantas con una amplia distribución geográfica están expuestas a diferentes condiciones bióticas y abióticas a lo largo de su distribución. Si difiere la intensidad de daño causado por herbívoros, esta variación puede generar una presión selectiva divergente, promoviendo variación en el nivel defensivo de las plantas. Con base en este patrón, se espera variación en el nivel defensivo de las poblaciones de *Capsicum annum* var. *glabriusculum* en la concentración de fenoles totales foliares y densidad de tricomas foliares. Se esperaría que las plantas con mayor defensa fueran aquellas donde la presión por herbívoros fuera menor, y que este patrón fuera independiente de su historia filogenética o de su distribución geográfica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la ocurrencia de variación poblacional en caracteres asociados a la defensa contra herbívoros en chile silvestre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.

1.4.2. Objetivos específicos

- ↪ Cuantificar la concentración de fenoles totales foliares constitutivos e inducidos por herbívoros en *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.
- ↪ Cuantificar la densidad de tricomas foliares constitutivos e inducidos por herbívoros en *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.
- ↪ Evaluar si existe un *trade-off* entre la concentración de fenoles totales y densidad de tricomas foliares de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.
- ↪ Estimar las relaciones filogenéticas intraespecíficas de poblaciones de *C. annuum* var. *glabriusculum* provenientes de diferentes localidades y regiones de México, empleando marcadores genéticos de cloroplasto.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Sistema de estudio

Capsicum annuum var. *glabriusculum* es una planta con una amplia variabilidad morfológica, y con un amplio rango de distribución. Es arbustiva, con tallos delgados, y con 4 metros de altura máxima. Suele tener hojas de 1 a 4 cm de ancho y 2 a 6 cm de largo. Las flores son solitarias y la corola de color blanco. Los frutos al madurar se tornan de color rojo, y poseen capsicina, el alcaloide que les da su picor (Hayano-Kanashiro et al., 2016). Se distribuye desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta el norte de Colombia, en una gran variedad de ambientes (González-Jara et al., 2011; Hayano-Kanashiro et al., 2016; Votava et al., 2002). Presenta variación intraespecífica para diferentes caracteres morfológicos (altura, diámetro del tallo, tamaño de hojas) entre sus poblaciones silvestres, tanto en condiciones naturales como en aquellas germinadas dentro de un ambiente común (López-España et al., 2016). Asimismo, hay gran variación en defensas mecánicas y químicas, y presentan inducción por acción de patógenos y herbívoros (Ballina-Gómez et al., 2013; Kim et al., 2012; Lemos et al., 2019; Lizzi et al., 1995; Van Cleef, 2016).

Los escarabajos pertenecientes a la familia Chrysomelidae son considerados como herbívoros defoliadores de importancia económica (Clark et al., 2004; Tejas et al., 2017). Algunos de estos escarabajos tienen una relación estrecha con plantas de la familia Solanaceae (Hsiao, 1986), y se consideran una de las plagas más dañinas para el cultivo de chile (López-Martínez et al., 2007). El escarabajo crisomélido *Lema daturaphila* Kogan y Goeden, 1970 es un especialista que se alimenta de solanáceas. Se ha reportado que esta especie ha sido encontrada alimentándose en plantas del género *Capsicum* (Clark et al., 2004). *Spodoptera frugiperda* Smith y Abbot, 1797 es un herbívoro generalista, conocido comúnmente como cogollero del maíz. La lista de especies de las cuales se alimenta es extensa, sin embargo, dentro de esta se encuentra *C. annuum* (Casmuz et al., 2010; Montezano et al., 2018). Asimismo, se han utilizado especies del mismo género en diversos estudios para evaluar el efecto de las defensas de *Capsicum spp.* contra el ataque de herbívoros, y su efecto en el insecto (Ahn et al., 2011; Vijaya y Rani, 2017a; Vijaya et al., 2018).

2.2 Material vegetal

Para este estudio, se germinaron semillas de *C. a. var. glabriusculum*, derivadas de la colección de germoplasma del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución de la Facultad de Ciencias, UABC. Se emplearon plantas producidas a partir de semillas provenientes de las regiones Noroeste y Sureste de México, de 9 Localidades, con un total de 31 líneas maternas (Tabla 1). Estas se mantuvieron dentro del invernadero de la Facultad de Ciencias, UABC. Las macetas fueron etiquetadas indicando su localidad y el número de planta asignado, con la finalidad de mantener la identidad de las mismas.

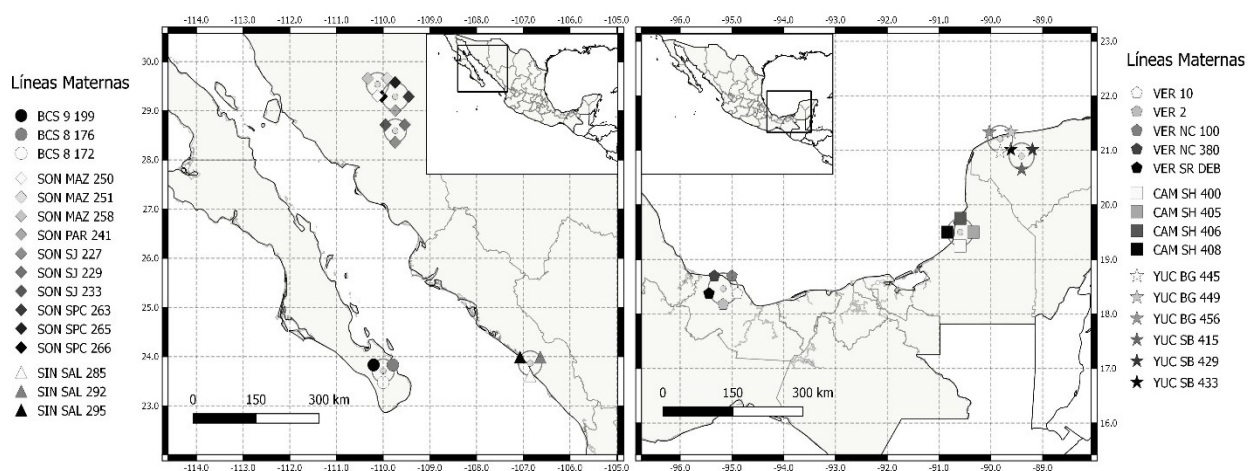


Figura 1: Mapa de los sitios de recolección de las semillas de las 31 líneas maternas utilizadas en el experimento de jardín común. Los marcadores conectados por un círculo se ubican en la misma coordenada, marcada en el centro del mismo; 16 líneas maternas corresponden a la región denominada Noroeste, y 15 a la región denominada Sureste.

Tabla 1: Coordenadas geográficas de las 31 líneas maternas utilizadas en el experimento de jardín común.

Región	Población	Localidad	Longitud	Latitud	Accesión
Noroeste	La paz	La paz	-109.999805	23.715472	BCS 8 172
Noroeste	La paz	La paz	-109.999805	23.715472	BCS 8 176
Noroeste	La paz	La paz	-109.999805	23.715472	BCS 9 199
Noroeste	Sonora	San Javier	-109.7419576	28.5951908	SON SJ 227
Noroeste	Sonora	San Javier	-109.7419576	28.5951908	SON SJ 229
Noroeste	Sonora	San Javier	-109.7419576	28.5951908	SON SJ 233
Noroeste	Sonora	Parcela	-109.7425	29.2885	SON PAR 241
Noroeste	Sonora	Mazocahui	-110.1234632	29.5379954	SON MAZ 250
Noroeste	Sonora	Mazocahui	-110.1234632	29.5379954	SON MAZ 251
Noroeste	Sonora	Mazocahui	-110.1234632	29.5379954	SON MAZ 258
Noroeste	Sonora	San Pedro de la Cueva	-109.7425	29.2885	SON SPC 263
Noroeste	Sonora	San Pedro de la Cueva	-109.7425	29.2885	SON SPC 265
Noroeste	Sonora	San Pedro de la Cueva	-109.7425	29.2885	SON SPC 266
Noroeste	Sinaloa	Saladito	-106.8540969	23.8676289	SIN SAL 285
Noroeste	Sinaloa	Saladito	-106.8540969	23.8676289	SIN SAL 292
Noroeste	Sinaloa	Saladito	-106.8540969	23.8676289	SIN SAL 295
Sureste	Veracruz	Veracruz	-95.169825	18.465149	VER 2
Sureste	Veracruz	Veracruz	-95.169825	18.465149	VER 10
Sureste	Veracruz	Ney Camp	-95.169824	18.465096	VER NC 100
Sureste	Veracruz	Ney Camp	-95.169824	18.465096	VER NC 380
Sureste	Veracruz	Santa Rosa	95.169824	18.465096	VER SR DEB
Sureste	Campeche	Siho	-90.5933472	19.5011103	CAM SH 400
Sureste	Campeche	Siho	-90.5933472	19.5011103	CAM SH 405
Sureste	Campeche	Siho	-90.5933472	19.5011103	CAM SH 406
Sureste	Campeche	Siho	-90.5933472	19.5011103	CAM SH 408
Sureste	Yucatán	San Bernardino	-89.4076436	20.8927771	YUC SB 415
Sureste	Yucatán	San Bernardino	-89.4076436	20.8927771	YUC SB 429
Sureste	Yucatán	San Bernardino	-89.4076436	20.8927771	YUC SB 433
Sureste	Yucatán	Banco Germoplasma	-89.822049	21.2125809	YUC BG 445
Sureste	Yucatán	Banco Germoplasma	-89.822049	21.2125809	YUC BG 449
Sureste	Yucatán	Banco Germoplasma	-89.822049	21.2125809	YUC BG 456

2.3 Diseño experimental

2.3.1 Germinación

Para la germinación, se remojaron 50 semillas de cada línea materna en una solución de ácido giberélico (GA3; 500ppm), esto debido a que las semillas de *C. annuum* var. *glabriusculum* presentan un periodo de latencia (Ballina-Gómez et al., 2013; Cano-Vázquez et al., 2015; Hernández-Verdugo et al., 2019). Posteriormente, las semillas de cada línea materna se sembraron en macetas de 1 L llenas con suelo comercial Berger BM2. Las semillas se regaron diariamente hasta su germinación. Una vez que las plántulas tuvieron 2-4 hojas bien desarrolladas, se trasplantaron a macetas individuales de 6 pulgadas llenas con suelo comercial Berger BM2, y regadas *ad libitum*.

Las plantas germinadas a partir de las semillas de una misma planta parental se denominaron líneas maternas. Estas plantas comparten un mínimo de $\frac{1}{4}$ de su material genético, dado que provienen de los óvulos de una misma planta, pero se desconoce si son producto de fertilización cruzada o de autofertilización (Cheplick, 2015).

En total, se incluyeron 31 líneas maternas provenientes de 9 localidades que abarcan la distribución de *C. annuum* var. *glabriusculum* en las zonas noroeste y sureste de México. Para cada localidad se utilizaron semillas provenientes de un mismo fruto (líneas maternas), las cuales representan réplicas de un mismo genotipo, siendo esta la unidad que se evaluó estadísticamente (Cheplick, 2015). De cada una de las líneas maternas se incluyeron entre 11-12 plantas, lo que resultó en un tamaño de muestra de 362 plantas

2.3.2 Experimento de jardín común

Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante todo el experimento, a temperatura ambiente, con riego y fertilización semanal con 2 5mL de una solución de 2 g/L de fertilizante N-P-K, 19:19:19. Una vez que produjeron la 4ta hoja verdadera, se separaron 11-12 individuos de talla similar de cada línea materna para el experimento. La elección de plantas de talla similar se hace con la finalidad de reducir la variación asociada con el efecto materno (Cheplick, 2015).

Para analizar la variación constitutiva e inducida del contenido total de fenoles y densidad de tricomas foliares en las diferentes líneas maternas de *C. annuum* var. *glabriusculum* se realizó un experimento de jardín común dentro de un invernadero. Este diseño permite reducir la variación ambiental a un mínimo sobre cualquier carácter fenotípico de la defensa (e.g., concentración de fenoles totales y densidad de tricomas) y atribuir las diferencias encontradas entre genotipos y/o poblaciones a la varianza genética de cada línea genética dentro de las poblaciones (Antonovics y Primack, 1982; Cheplick, 2015; Garrido et al., 2012; Hahn y Maron, 2016; López-España et al., 2016).

2.3.3 Cuantificación de fenoles totales en función de tiempo

Para examinar el tiempo de respuesta de las plantas una vez que son dañadas, se hicieron dos experimentos, uno con *Spodoptera frugiperda* y otro con *Lema daturaphila*. El experimento con *S. frugiperda* consistió en 3 tratamientos de daño: Daño mecánico, daño mecánico + secreciones orales de *S. frugiperda*, y dos larvas de *S. frugiperda* alimentándose libremente. El experimento con *L. daturaphila* consistió en 3 tratamientos: Control, daño mecánico, y daño mecánico + secreciones orales de *Lema daturaphila*. En ambos casos, las hojas se recolectaron a los 30, 60, 240, 720, y 1440min después de realizarse el daño. Las hojas dañadas fueron recolectadas y se prensaron para la cuantificación de fenoles totales utilizando la reacción de Folin-Ciocalteu.

2.3.4 Tratamientos de daño foliar

Para evaluar el efecto del daño foliar mecánico y mecánico + secreción oral de un insecto sobre la concentración total de fenoles y densidad de tricomas foliares, 12 plantas de cada línea materna se separaron en 3 tratamientos: 4 Control, 4 daño mecánico, y 4 daño mecánico + la secreción oral de larva del escarabajo *Lema daturaphila* Kogan y Goeden, 1970 (Chrysomelidae), en lo sucesivo denominado daño + SO. En el experimento se utilizaron dos hojas completamente desarrolladas de la zona apical. Las plantas del tratamiento control no tuvieron daño alguno. El daño mecánico se realizó utilizando un sacabocados de área 38 mm², correspondiente a ≈25% del área de una hoja individual. Las plantas del tratamiento de herbívoro tuvieron el mismo proceso que aquellas del tratamiento de daño mecánico, e inmediatamente

después se aplicaron secreciones orales de *L. daturaphila* en el sitio de la lesión utilizando un pincel (Figura 2).

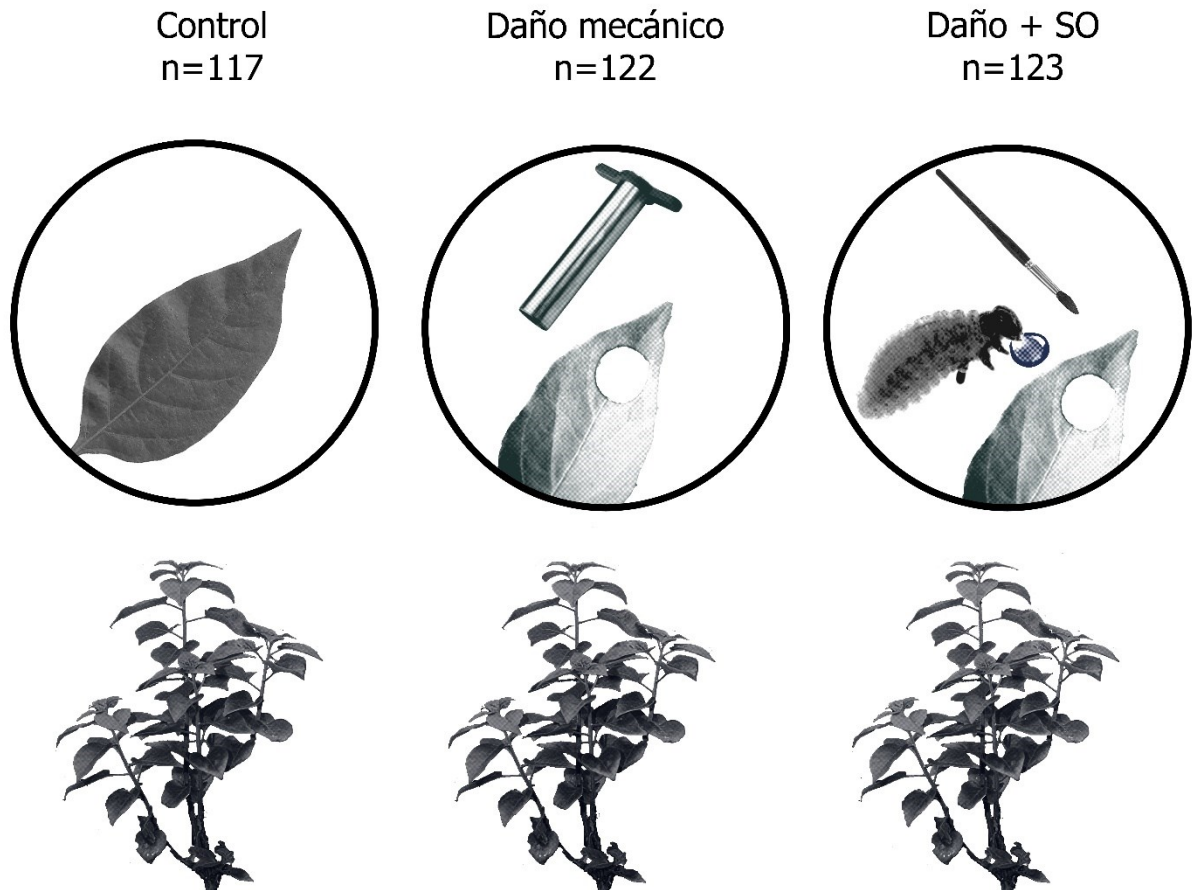


Figura 2: Diagrama esquemático del experimento de inducción de defensa en *Capsicum annum* var. *glabriusculum*. Las plantas se asignaron a 3 tratamientos, control, daño mecánico y daño mecánico + secreciones orales de *Lema daturaphila*. Para cuantificación de fenoles totales, las hojas dañadas se recolectaron 1h después del daño. Para cuantificar densidad de tricomas foliares, se tomaron 3 hojas maduras producidas después del tratamiento.

2.3.5 Prensado de hojas

Una hora después de los tratamientos de daño, se recolectaron las hojas de los tres tratamientos para cada planta de cada línea materna. Se utilizó el tratamiento de una hora ya que se observó que los fenoles foliares de *C. annum* var. *glabriusculum* muestran un cambio después de este tiempo una vez que son dañadas (Figura 5B). Las hojas recolectadas se colocaron entre dos hojas de papel dentro de una prensa para herborizar para transportarlas al laboratorio. La prensa con el material vegetal herborizado se colocó en un horno de convección VWR a 30°C por 5 días, o hasta que las hojas estuvieran completamente

deshidratadas. Las muestras se mantuvieron en el horno hasta su procesamiento, para evitar que absorbieran humedad del ambiente. Las hojas mantuvieron el mismo color verde de cuando fueron recolectadas, indicando de que no hubo degradación de fenoles (Li et al., 2018).

Para determinar la presencia de algún efecto del secado sobre la cantidad de fenoles totales en las hojas de chile, se llevó a cabo la cuantificación de fenoles totales en hojas frescas, y prensadas. Las hojas frescas se utilizaron directamente en la reacción de Folin-Ciocalteu. Las hojas prensadas se pesaron antes y después del secado, para determinar su contenido de agua, y ajustar al momento de llevar a cabo la comparación entre hojas frescas y secas. Se utilizó materia seca dado que cuando la muestra está húmeda, la enzima polifenol oxidasa esta activa, por lo que cambia la concentración de fenoles totales en la muestra (R. Li et al., 2018; Vega-Gálvez et al., 2009). Asimismo, se ha reportado que los compuestos fenólicos de muestras secas mantienen una actividad constante después de un largo tiempo en almacenamiento (Mediani et al., 2014).

2.3.6 Cuantificación de fenoles totales

Una vez que las hojas prensadas fueron deshidratadas, se pesaron, maceraron y suspendieron individualmente en 1 mL de solución hidrometanólica (MeOH:H₂O 80:20 v/v). Después de 24h, el extracto se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min para precipitar los restos de hoja. Se utilizó el sobrenadante para la reacción Folin-Ciocalteu para cuantificación de fenoles totales.

Se tomaron 20 µL del extracto hidrometanólico obtenido y se añadieron a un tubo de microcentrífuga con 1ml de agua. Se adicionaron 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. Posteriormente se agregaron 300 µL de NaCO₃, lo que provoca que la solución se tiña de un color azulado proporcional a la cantidad de fenoles disueltos. La cantidad total de fenoles total se cuantificó utilizando un ensayo colorimétrico, utilizando el espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific) con $\lambda=765$ nm, usando ácido gálico como estándar (Ainsworth y Gillespie, 2007).

Se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar (Figura 3). El ácido gálico es utilizado como un estándar debido a que es un fenol simple y está presente en una gran variedad de plantas (Lattanzio et al., 2006), incluyendo *C. annuum* var. *glabriusculum* (Hayano-Kanashiro et al., 2016). Las concentraciones de ácido gálico utilizadas fueron 2000, 1500, 1000, 500, 250, 150, 100, 50 y 0 mg/L.

Utilizando estas soluciones, se llevó a cabo la reacción Folin-Ciocalteu utilizando el método anteriormente mencionado. Con los valores de absorbancia obtenidos y las concentraciones conocidas, se calculó una fórmula para determinar la concentración de equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras procesadas. Dicha fórmula se ajustó a tener una ordenada al origen de 0, dado que la concentración de fenoles totales solo puede tomar valores mayores a 0.

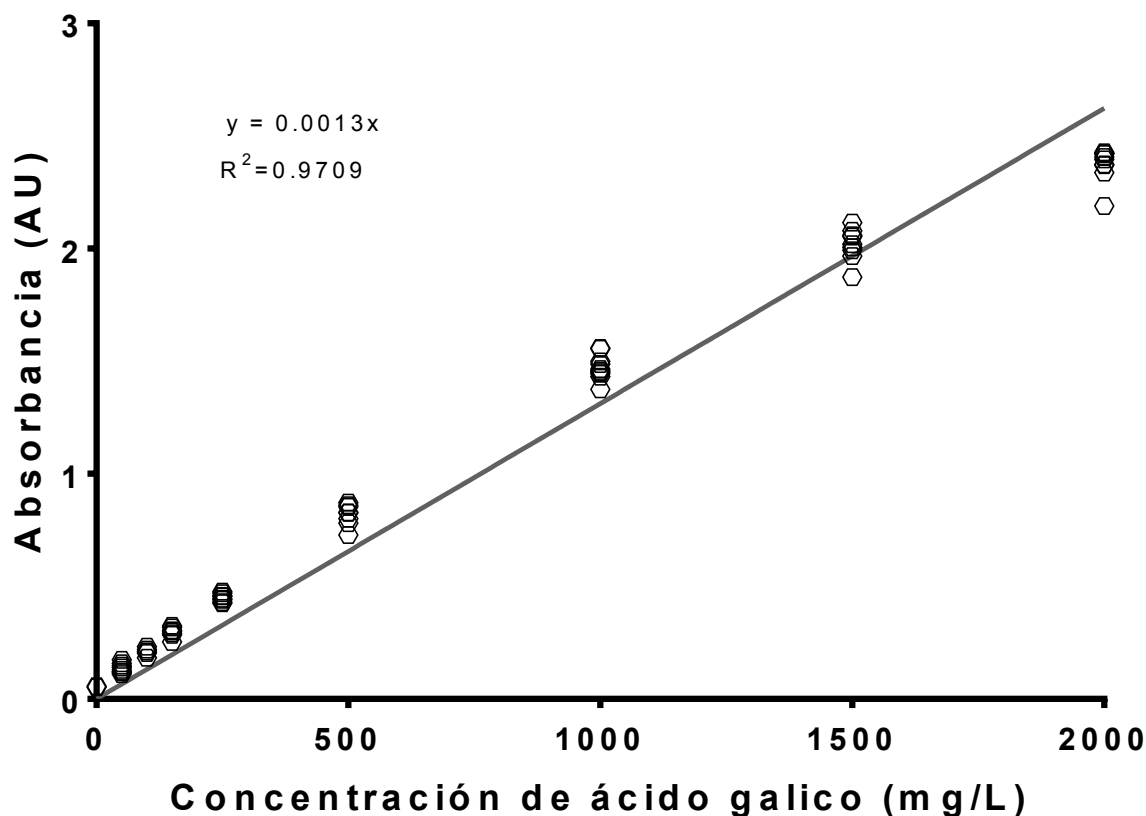


Figura 3: Curva de calibración para determinar concentración de fenoles totales utilizando ácido gálico como estándar. La regresión lineal se ajustó a pasar por el origen ($x=0, y=0$), dado que la concentración de fenoles totales no puede tomar valores negativos.

Los valores obtenidos de concentración de ácido gálico a partir de la curva de calibración, junto con el volumen del extracto y la masa de la hoja se utilizaron para calcular el contenido de fenoles en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por cada g de masa seca (Alara et al., 2017; Siddiqui et al., 2017).

$$C = \varphi * V * m^{-1} \quad (1)$$

Donde C = Contenido total de fenoles en GAE mg/g, φ = Concentración de ácido gálico establecido en la curva de calibración (GAE mg/ml), V = Volumen del extracto (mL), m = masa seca de la hoja (g).

2.3.7 Conteo de tricomas foliares

Para obtener la densidad de tricomas foliares por planta, se recolectaron 3 hojas de las mismas plantas empleadas en la cuantificación de fenoles totales. Se esperó a que las plantas produjeran hojas nuevas después del evento de daño, y una vez que estas estaban completamente expandidas, se prensaron para posteriormente realizar el conteo de tricomas foliares. Las hojas se consideraron completamente expandidas cuando alcanzaron el tamaño y coloración de las hojas completamente desarrolladas (Van Volkenburgh, 1999). Igualmente, se recolectaron 3 hojas de cada una de las plantas del tratamiento control.

Utilizando un microscopio estereoscópico Stemi 2000C (Zeiss), ajustado con una cámara Axiocam ICc5 conectados a una computadora Dell Optiplex 7010 i7, se tomaron fotografías de tres hojas maduras de cada planta de Chile utilizadas en el experimento. El aumento utilizado fue de 25X. Utilizando la luz del estereoscopio apagada y con un tiempo de exposición largo (e.g., > 480 ms), fue posible observar los tricomas foliares de manera clara. Se realizó el conteo de tricomas en función del área definida por la cámara (22.540 mm²) en la cara adaxial de la hoja, en el área posterior a la segunda venación secundaria, en dirección del peciolo a la punta. Para hojas con un tamaño reducido, donde no se podía observar el área completa, se definió un área y se calculó el porcentaje del área total. El total se expresó en número de tricomas por mm² (Figura 4).

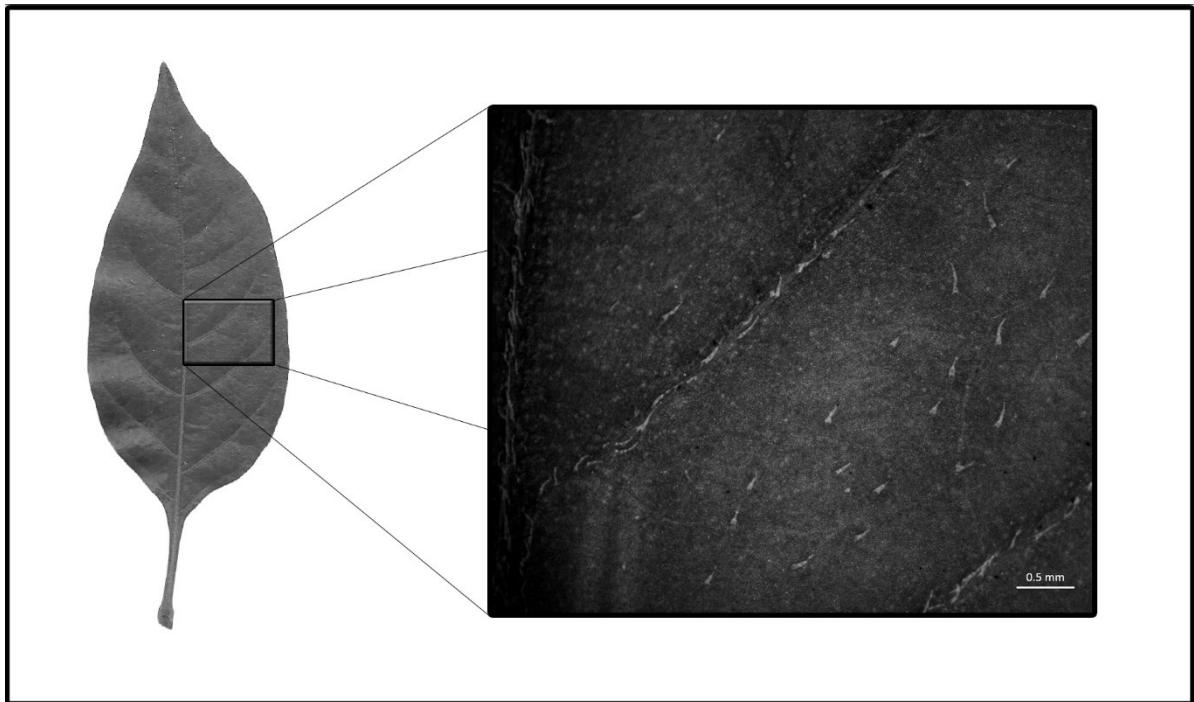


Figura 4: Representación gráfica del área de conteo de tricomas. El conteo se realizó en la parte superior de la segunda venación del lado derecho de la cara adaxial de la hoja. La densidad de tricomas se expresó en $\#/mm^2$.

2.3.8 Análisis estadístico

Para evaluar si existen diferencias entre líneas maternas y tratamientos de daño foliar (i.e., inducción) sobre la cantidad de fenoles totales y número de tricomas, se llevó a cabo un análisis de varianza de dos vías. El ANOVA incluyó los factores fijos *línea materna*_(random) y *tratamiento* y la interacción *línea materna*_(random) \times *tratamiento*. Las variables de respuesta fueron la concentración de fenoles totales foliares y la densidad de tricomas foliares. Un efecto significativo de la *línea materna* indica que las poblaciones difieren en la cantidad de fenoles o de tricomas, mientras que la inducción es indicada por un efecto significativo del *tratamiento*. Finalmente una interacción *línea materna* \times *tratamiento* indica que varía el efecto del daño foliar sobre la concentración de fenoles totales o densidad de tricomas entre las diferentes líneas maternas. Para examinar cuales son las líneas maternas que difieren se llevó a cabo una prueba de bondad y ajuste de Tukey.

Se utilizó un índice de resistencia para calcular la magnitud de la inducción de respuesta en la concentración de fenoles totales y densidad de tricomas después de los tratamientos de daño mecánico y

daño + SO de *Lema daturaphila*. Este índice se calculó de acuerdo a lo descrito por Cisneros-Silva et al. (2017).

$$R_i = \frac{\bar{D}_{Tratamiento} - \bar{D}_{Control}}{\bar{D}_{Control}} \quad (2)$$

Donde R_i = Índice de resistencia, $\bar{D}_{Control}$ = promedio del valor constitutivo para la línea materna de fenoles totales o densidad de tricomas, $\bar{D}_{Tratamiento}$ = promedio del valor para la línea materna de fenoles totales o densidad de tricomas después de los tratamientos de daño mecánico y daño + SO de *Lema daturaphila*.

Para examinar si existe un trade-off entre la concentración de fenoles totales y el número de tricomas, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson (r) entre ambas variables (Koricheva et al., 2004; Moreira et al., 2014; Parker et al., 2010). Las correlaciones hechas utilizando los valores de todas las plantas corresponden a las correlaciones fenotípicas. Las correlaciones hechas utilizando los valores promedio por familia del tratamiento control corresponden a las correlaciones genéticas. Por otra parte, las correlaciones hechas con los promedios de las líneas maternas tras los tratamientos de inducción fueron realizadas para determinar si hay un cambio en la correlación entre fenoles totales y tricomas en respuesta al daño. Un valor negativo de la correlación ($r < 0$) y significativo indica la presencia de un trade-off entre fenoles y tricomas, mientras que un valor positivo ($r > 0$) indica una asignación simultánea a ambos caracteres.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico JMP 7 (SAS Institute Inc., 2007).

2.3.9 Genotipificación

Se cortó una hoja (masa promedio $\approx 0.2g$) de plantas de 4 localidades (2 NO; 2 SE), y en un mortero se maceraron utilizando N_2 (l). Se realizó la extracción de ADN utilizando el método de sales descrito por Aljanabi y Martinez (1997).

1. Las hojas se maceraron en un mortero utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.

2. Se pesó el material obtenido, y se transfirieron 0.03 – 0.05 g de tejido a un tubo de microcentrífuga.
3. Se agregaron 400µL de buffer de homogenización y 40 µL de SDS.
4. El tubo se colocó en vortex por 15 s.
5. Las muestras se incubaron a 65 °C por 1.5 h.
6. Se añadieron 350 µL de solución de NaCl 5 M y se llevó al vortex por 30 s.
7. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 30 min.
8. Se transfirieron 700 µL de sobrenadante a un tubo limpio.
9. Se agregó un volumen igual al del paso anterior de isopropanol frío (-20 °C).
10. Se incubó durante toda la noche.
11. Se centrifugó a 13,000 rpm, a 4 °C, por 20 min.
12. Se descartó el sobrenadante, manteniendo el pellet.
13. Se lavó con 300 µL de etanol 70% frío (-20 °C).
14. Se centrifugó a 13,000 rpm, a 4 °C, por 10 min.
15. Se descartó el etanol.
16. Se lavó con 300 µL de etanol 70% frío (-20 °C).
17. Se centrifugó a 13,000 rpm, a 4 °C, por 10 min.
18. Se descartó el etanol.
19. El pellet se secó a temperatura ambiente ≈3 h.
20. Se re suspendió el pellet en 50 µL de agua.

Para confirmar que se extrajo ADN, se mezcló 1 µL de buffer con 3 µL de muestra de extracción y se colocó en un gel de agarosa al 1%, a 100 V por 30 min. Este se observó con ayuda de un transiluminador y el software ImageLab (Bio-Rad, 2014).

Una vez que se confirmó que se tenía ADN con buena calidad/cantidad, se procedió a amplificar 5 marcadores universales del cloroplasto. Los 5 marcadores corresponden a regiones intergénicas no codificantes, con excepción de *trnL-trnF*, que corresponde a una región intergénica no codificante + un exón (Dong et al., 2012; Shaw et al., 2005; Shaw et al., 2007; Taberlet et al., 1991), utilizando un volumen final de reacción de 25 µL para cada marcador (Tablas 2 - 3).

Tabla 2: Concentración de reactivos utilizada para mezcla de PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)
Agua		12.9
Green Buffer	1x	5
MgCl ₂	1.5 mM	1.5
dNTP	0.16 mM	0.4
Forward	0.4 μM	1
Reverse	0.4 μM	1
Taq polimerasa	1 U	0.2
ADN		3
	Total:	25

Tabla 3: Marcadores de cloroplasto, y protocolo de PCR utilizado para cada uno.

Marcador	Fw	Rv	Protocolo PCR	Referencia
trnL-trnF	CGAAATCGGTA GACGCTACG	ATTGAACTG GTGACACGAG	94°C 5min; 35X(94°C 30s; 59°C 30s; 72°C 30s); 72°C 8 min	(Shaw et al., 2005; Taberlet et al., 1991)
petA-psbJ	AACARTTYGARA AGGTTCAATT	ATAGGTACTG TARCYGGTATT	94°C 5min; 35X(94°C 40s; 55°C 40s; 72°C 80s); 72°C 8 min	(Shaw et al., 2007)
TC-TD	AAAGTGGGTTTT TATGATCC	TAAAAAGCCG AGTACTCTACC	94°C 5min; 35X(94°C 40s; 55°C 40s; 72°C 80s); 72°C 8 min	(Shaw et al., 2007)
rpl32-trnL	CAGTTCCAAAA AACGTAATTC	CTGCTTCCTAA GAGCAGCGT	80°C 5min; 30X(95°C 1min; 50°C 1 min; rampa 0.3°C/min hasta 65°C; 65°C 4min); 65°C 5min	(Shaw et al., 2007)
psbA-trnH	GTTATGCATGAA CGTAATGC	CGCGCATGGT GGATTCACA	80°C 5min; 30X(95°C 1min; 50°C 1 min; rampa 0.3°C/min hasta 65°C; 65°C 4min); 65°C 5min	(Shaw et al., 2005)

Después de la amplificación, se mezclaron 2μL de cada producto de PCR con 1μL de buffer y se colocaron en un gel de agarosa al 2%, a 70V por 50 minutos. Posteriormente se reveló utilizando un transiluminador.

Las muestras de la amplificación se purificaron utilizando un kit de purificación de QIAGEN. Esto se hizo con el propósito de asegurar la calidad de la muestra para su secuenciación, y eliminar productos no deseados.

1. En un tubo de microcentrífuga, se mezclaron 10 μ L de producto de PCR con 50 μ L de Buffer PB.
2. Se colocó la columna QIAquick en el tubo recolector.
3. La muestra se llevó a la columna y se centrifugó por 60s a 13,000rpm. Se descartó el líquido del tubo recolector.
4. Se agregaron 750 μ L de Buffer PE a la columna y se centrifugó por 60s a 13,000rpm. Se descartó el líquido del tubo recolector.
5. La columna se centrifugó nuevamente por 60s a 13,000rpm, para eliminar el buffer residual.
6. La columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5ml limpio.
7. Para eluir, se utilizaron 30 μ L de buffer de elución y se dejó reposar por 1min. La columna se centrifugó por 60s a 13,000rpm.
8. La muestra se analizó en un gel de agarosa para determinar la integridad del producto.

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a la compañía privada SeqXcel Inc. en Estados Unidos de Norteamérica para su secuenciación.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Concentración de fenoles totales: Peso seco vs Peso húmedo

Utilizando un ANOVA no se detectó un efecto significativo para la concentración de fenoles totales entre hojas deshidratadas y hojas frescas ($F_{1, 15}=0.07$; $p=0.7$; $n =16$). La concentración promedio de fenoles totales foliares del tratamiento de secado fue de 0.13 GAE mg/g ($EE \pm 0.01$ GAE mg/g), mientras que la del tratamiento de hojas frescas fue 0.13 GAE mg/g ($EE \pm 0.01$ GAE mg/g).

3.2 Respuesta temporal ante daño

Para el experimento utilizando *Spodoptera frugiperda*, el ANOVA detectó un efecto significativo del tratamiento de daño, tiempo de respuesta, y de la interacción tratamiento x tiempo de respuesta, en la concentración de fenoles totales (Tabla 4). La concentración promedio de fenoles totales para el tratamiento control fue de 28.37 GAE mg/g, para el tratamiento de daño mecánico fue de 29.95 GAE mg/g, para el tratamiento de daño mecánico + secreciones orales de *S. frugiperda* fue de 30.38 GAE mg/g, y para el tratamiento con larva de *S. frugiperda* fue de 36.69 GAE mg/g. Además, la interacción tratamiento x tiempo para la concentración de fenoles totales también fue significativa, indicando que la variación en la respuesta difiere con el tiempo (Figura 5A). La mayor diferencia con respecto al control se observó a las 12h, donde el tratamiento de daño mecánico mostro un incremento de 18%, el de daño mecánico + secreciones del herbívoro un incremento del 19%, y el tratamiento con larva tuvo un incremento del 83%. En todos los casos, se detectó una disminución en la concentración de fenoles totales 24h después del tratamiento de daño (Figura 5A).

Para el experimento utilizando *Lema daturaphila*, el ANOVA detectó un efecto significativo de tiempo de respuesta, y de la interacción tratamiento x tiempo de respuesta, en la concentración de fenoles totales (Tabla 5). La concentración promedio de fenoles totales para el tratamiento control fue de 25.12 GAE mg/g, para el tratamiento de daño mecánico fue de 29.70 GAE mg/g, y para el tratamiento de daño mecánico + SO de *L. daturaphila* fue de 33.52 GAE mg/g. A pesar de que no fue significativa, los tratamientos de daño mecánico y daño mecánico + SO tuvieron un decremento de 16% y de 25% respectivamente después de una hora (Figura 5B).

Tabla 4: Análisis de varianza de concentración de fenoles totales en relación al tiempo y al tratamiento para el experimento con *Spodoptera frugiperda*.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	F	Significancia
Tratamiento	2	2052.33	13.23	<0.0001*
Tiempo	5	3548.61	9.15	<0.0001*
Tratamiento x Tiempo	10	2415.79	3.11	0.0010*

Tabla 5: Análisis de varianza de concentración de fenoles totales en respuesta a tiempo y tratamiento de daño para el experimento con *Lema daturaphila*.

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	F	Significancia
Tratamiento	2	212.389	1.17	0.3133
Tiempo	5	1294.383	2.86	0.019*
Tiempo x Tratamiento	10	1914.191	2.12	0.0307*

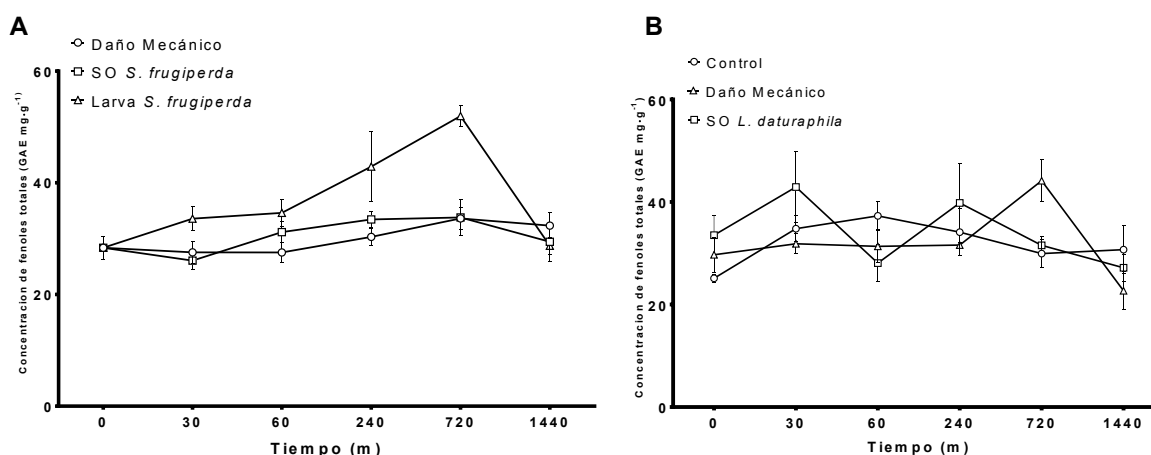


Figura 5: Variación temporal en la concentración de fenoles totales foliares en respuesta a daño. A: Respuesta en la concentración de fenoles totales en respuesta a daño mecánico, daño mecánico + SO de *S. frugiperda*, y dos larvas de *S. frugiperda* alimentándose libremente. El control se midió en el tiempo inicial. B: Respuesta en la concentración de fenoles totales en respuesta a daño mecánico y daño mecánico + SO de *L. daturaphila*. El control se midió en cada punto de muestreo.

3.3 Concentración de fenoles totales en respuesta al daño

La concentración de fenoles totales mostro una amplia variación entre y dentro de las líneas maternas así como entre los tratamientos para cada familia. El ANOVA indicó diferencias significativas entre líneas maternas y su inducción ante los tratamientos (Figura 6). El valor promedio de la concentración de fenoles

totales foliares del tratamiento control fue de 32.12 GAE mg/g (20.57 – 52.14 GAE mg/g). Las líneas maternas que presentaron mayor concentración de fenoles totales foliares fueron YUC SB 429 (Yucatán; SE) con 52.14 GAE mg/g (EE \pm 4.11 GAE mg/g) y VER 10 (Veracruz; SE) con 47.83 GAE mg/g (EE \pm 4.11 GAE mg/g), y las de menor concentración fueron BCS8 176 (Baja California Sur; NO) con 20.57 GAE mg/g (EE \pm 4.11 GAE mg/g) y BCS9 199 (Baja California Sur; NO) con 21.42 GAE mg/g (EE \pm 4.11 GAE mg/g). Aunque el efecto del tratamiento de daño no fue significativo, la interacción familia x tratamiento de daño fue significativa (Tabla 5), indicando que el tratamiento afectó de forma diferencial a las familias (Figura 7).

Tabla 6: Análisis de varianza de concentración de fenoles totales para las 31 líneas maternas, el tratamiento y su interacción. N = 362. R^2_{adj} = 0.65

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F	Significancia
Línea Materna (Random)	30	26383.9	879.463	2.1563	0.0057*
Tratamiento	2	836.12	418.06	1.0286	0.3637
Tratamiento x Línea Materna (Random)	60	24506.7	408.445	6.0444	<.0001*

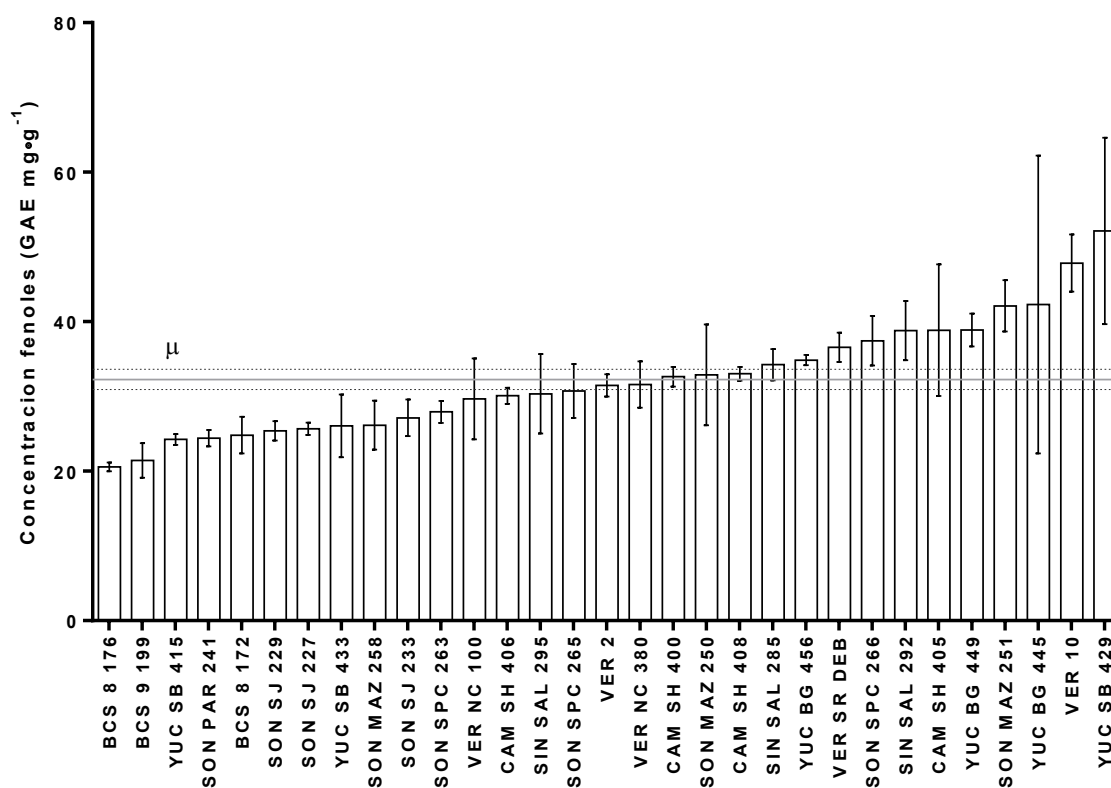


Figura 6: Variación de 31 líneas maternas de chile silvestre en la concentración de fenoles totales. Se indica la media global \pm ES.

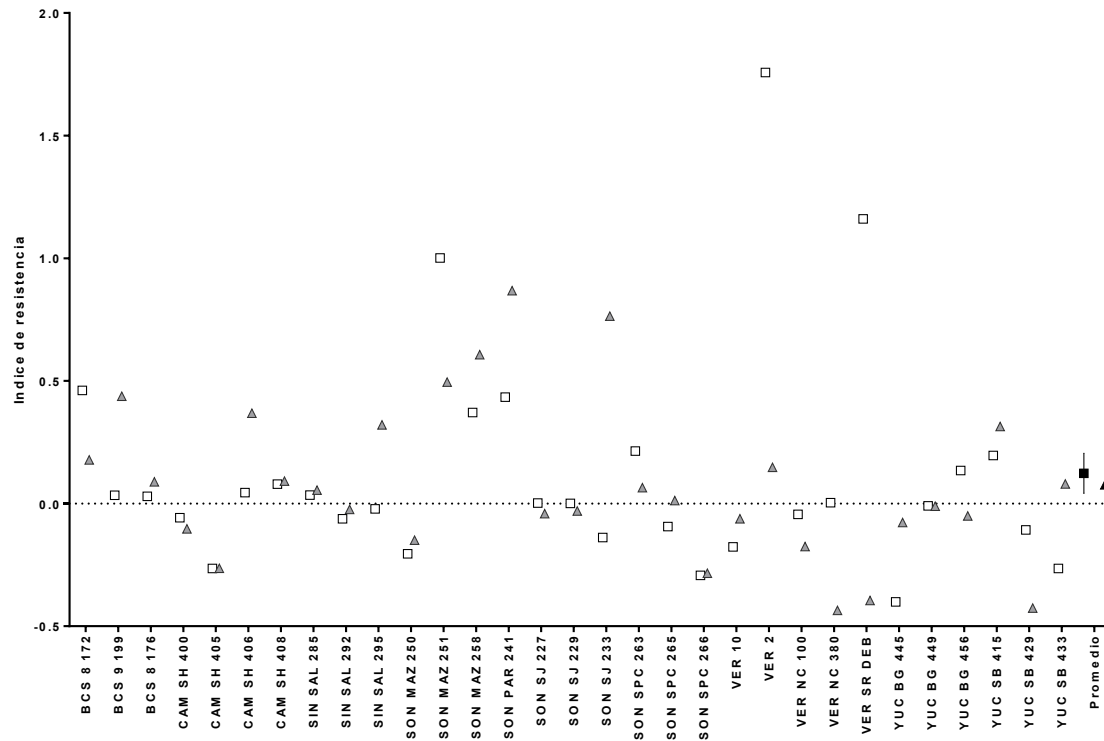


Figura 7: Inducción en la concentración de fenoles totales. Se representa utilizando un Índice de resistencia al daño en líneas maternas de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. La línea en 0 (cero), indica el valor constitutivo de defensa. Valores positivos indican una inducción positiva de la defensa, mientras que valores negativos indican inducción negativa. Los cuadros blancos indican inducción por daño mecánico y el promedio con un cuadro negro. Los triángulos grises indican la inducción por daño mecánico + SO y el promedio con un triángulo negro.

3.4 Número de tricomas foliares en respuesta al daño

La densidad de tricomas foliares muestra una amplia variación entre familias maternas y dentro y entre los tratamientos para cada familia. El ANOVA detectó diferencias significativas entre líneas maternas y su inducción ante los tratamientos (Figura 8). El valor promedio de la densidad de tricomas foliares del tratamiento control fue de 1.63 tricomas/mm² (0.47 – 4.79 tricomas/mm²). Las líneas maternas que presentaron mayor densidad de tricomas foliares fueron SON SJ 233 con 4.79 tricomas/mm² (EE ± 0.95 tricomas/mm²) y SON PAR 241 con 3.45 tricomas/mm² (EE ± 0.63 tricomas/mm²), y las de menor densidad de tricomas fueron YUC SB 433 con 0.47 tricomas/mm² (EE ± 0.06 tricomas/mm²) y SON SPC 266 con 0.48 tricomas/mm² (EE ± 0.05 tricomas/mm²). Tanto el tratamiento de daño mecánico como el tratamiento de daño + secreciones orales difirieron significativamente del tratamiento control, sin embargo, no difirieron significativamente entre sí (Tukey post hoc, $\alpha = 0.05$; Figura 9).

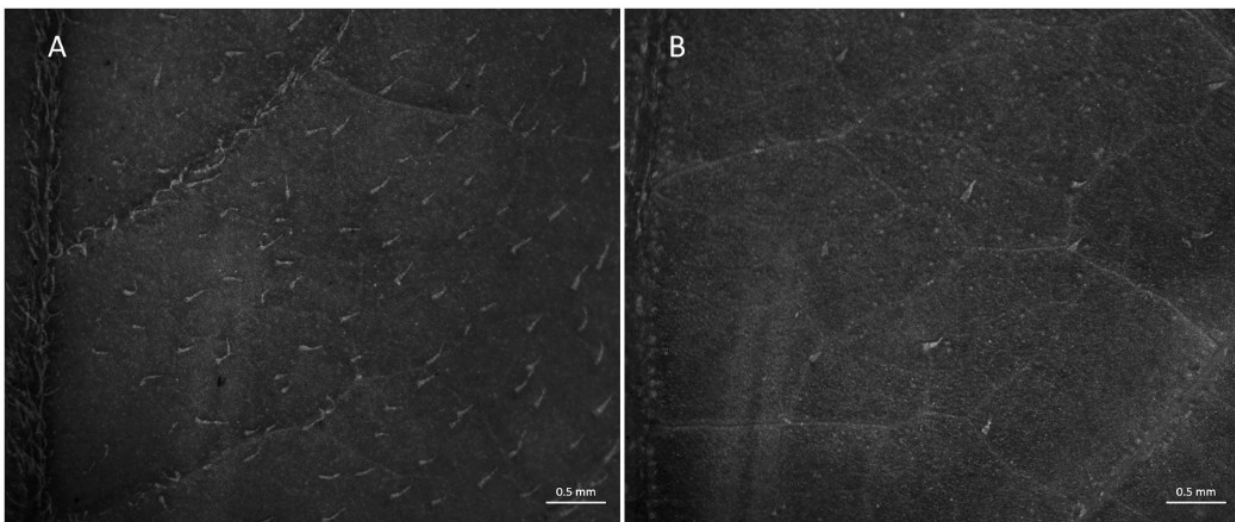


Figura 8: Microfotografías mostrando el intervalo de densidad de tricomas foliares para *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. A: SON SJ 233 con una densidad de 4.79 tricomas/mm². B: YUC SB 433, con una densidad de 0.47 tricomas/mm².

Tabla 7: Analisis de varianza de densidad de tricomas foliares para las 31 líneas maternas, el tratamiento y su interaccion. N = 361. R²_{adj}= 0.73

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Media cuadrática	F	Significancia
Línea Materna (Random)	30	413398	13779.9	10.1443	<.0001*
Tratamiento	2	36178.5	18089.2	13.3515	<.0001*
Tratamiento x Línea Materna (Random)	60	81605.9	1360.1	2.6885	<.0001*

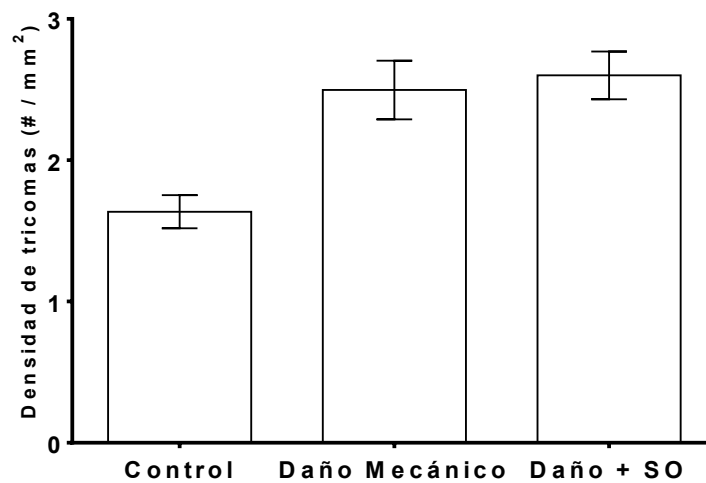


Figura 9: Promedio del número de tricomas para el tratamiento control, daño mecánico y daño mecánico + SO de *Lema daturaphila*. N_{total}=362.

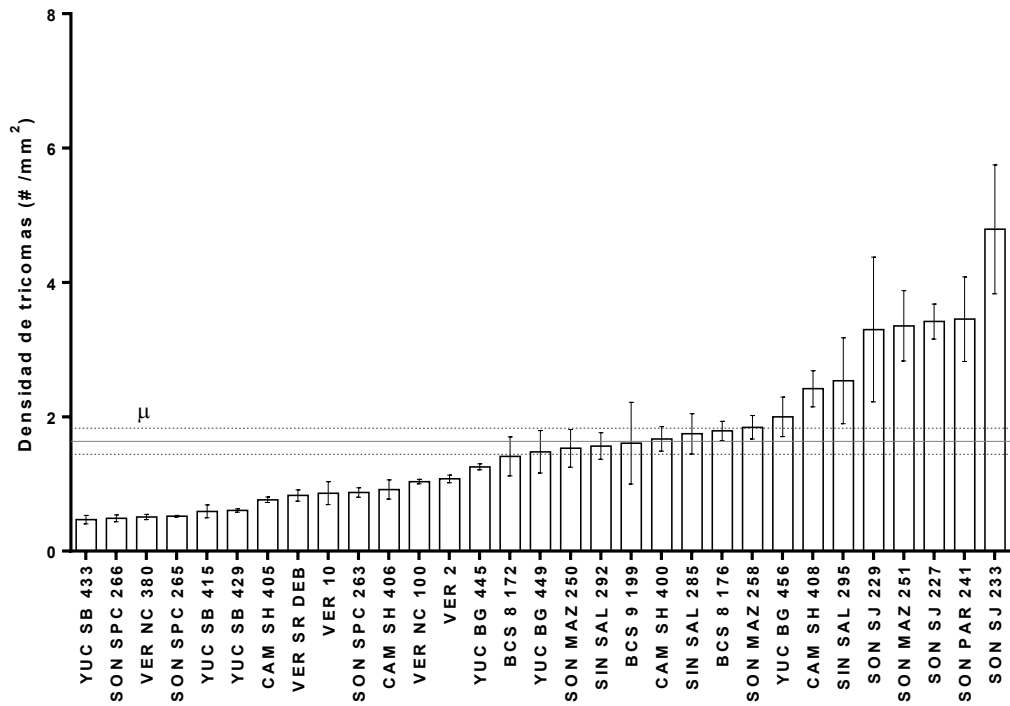


Figura 10: Variación de 31 líneas maternas de chile silvestre en la densidad de tricomas foliares. Se indica la media global ± ES.

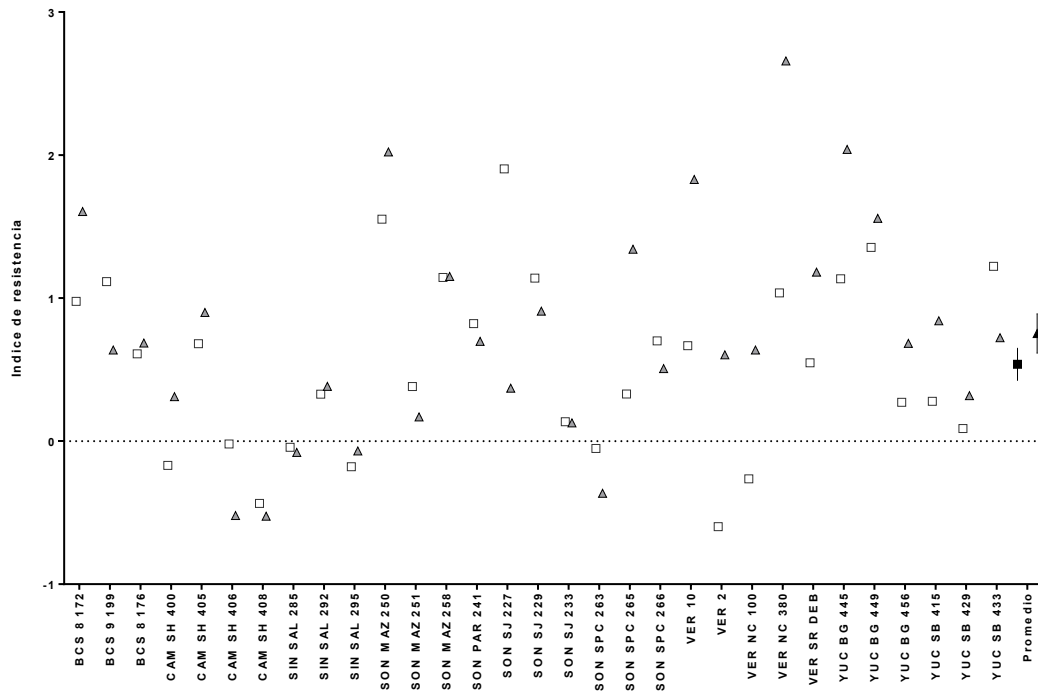


Figura 11: Inducción en la densidad de tricomas foliares. Se indica utilizando un Índice de resistencia al daño en líneas maternas de *Capsicum annuum* var. *glabrusculum*. La línea en 0 (cero), indica el valor constitutivo de defensa. Valores positivos indican una inducción positiva de la defensa, mientras que valores negativos indican inducción negativa. Los cuadros blancos indican inducción por daño mecánico y el promedio con un cuadro negro. Los triángulos grises indican la inducción por daño mecánico + SO y el promedio con un triángulo negro.

3.5 Trade-off entre concentración de fenoles totales vs densidad de tricomas

El análisis de correlación de Pearson (r) detectó una correlación fenotípica significativa entre la concentración de fenoles totales y la densidad de tricomas foliares para las plantas del tratamiento control. El coeficiente de correlación fenotípico para las plantas control fue de $r = -0.18$ ($p=0.046$), mientras que el coeficiente de correlación de Pearson de la correlación genética fue de $r = -0.27$ ($p=0.14$), pero no fue estadísticamente significativa. Para las plantas del tratamiento de daño mecánico, no se encontraron valores significativos, ni para el coeficiente de correlación fenotípico $r = -0.13$ ($p=0.16$), ni para el coeficiente de correlación genética $r = -0.14$ ($p=0.45$), para una disyuntiva entre fenoles y tricomas. Tampoco se encontraron valores significativos para el coeficiente de correlación fenotípico $r = 0.17$ ($p=0.06$), o para el coeficiente de correlación genética $r = 0.26$ ($p=0.15$) para las plantas del tratamiento de daño + secreciones orales.

3.6 Genotipificación

Las secuencias obtenidas se caracterizaron por tener una gran cantidad de ruido de fondo, haciendo difícil la determinación de la secuencia exacta y de sitios polimórficos. Para el marcador *trnL-trnF*, las secuencias obtenidas fueron mayormente idénticas, con 2 sitios polimórficos encontrados en regiones altamente repetitivas o de baja calidad. El marcador *petA-psbJ* fue mayormente idéntico, con 4 sitios polimórficos encontrados en regiones altamente repetitivas o de baja calidad. Para el marcador *TC-TD* no se encontraron sitios polimórficos, y las secuencias obtenidas se caracterizaron por ser de baja calidad. Para el marcador *rp132-trnL* no se encontró variación importante, con un solo sitio polimórfico, encontrado en una región altamente repetitiva. El marcador *psbA-trnH* tuvo un solo sitio polimórfico, encontrado en una región altamente repetitiva. En los casos donde se obtuvo una secuencia limpia, los sitios polimórficos se encontraron en sitios altamente repetitivos, por lo que no se puede determinar claramente si son polimorfismos reales o artefactos de la secuenciación (Tabla 8). No se encontró variación marcada entre las secuencias de las diferentes localidades, por lo que se considera que estas regiones intergénicas del cloroplasto no tienen la resolución necesaria para inferir relaciones filogenéticas a escala fina en *C. annuum* var. *glabriusculum*.

Tabla 8: Tamaño promedio obtenido para cada región de cloroplasto amplificada, así como el número total de polimorfismos encontrados para cada uno.

Marcador	n	Tamaño promedio obtenido	Polimorfismos
trnL-trnF	6	760	2
petA-psbJ	6	650	4
TC-TD	6	650	0
rpl32-trnL	4	950	1
psbA-trnH	4	560	1

Capítulo 4. Discusión

La interacción planta-herbívoro, y la ecología y evolución de la defensa, han sido ampliamente estudiadas desde el siglo pasado (Bernays, 1981; Edwards y Wratten, 1983; Feeny, 1970; Fox y Macauley, 1977; Johnson, 1975; Karban y Myers, 1989; Levin, 1976; Levin, 1971; McNaughton, 1983; Price et al., 1980; Rhoades, 1985). Los estudios se han enfocado principalmente en plantas modelo tales como *Arabidopsis* Heynh (Symonds et al., 2005); cultivadas, y silvestres como *Datura* L. spp. (Kant et al., 2015) y *Asclepias* L. spp. (Agrawal y Fishbein, 2006). Sin embargo, la ecología evolutiva de la defensa de las especies silvestres de variedades cultivadas han recibido poca atención, entre ellas, el chile silvestre mexicano, *C. a.* var. *glabriusculum*.

Este trabajo es el primero en mostrar variación genética en caracteres fenotípicos de defensa contra herbívoros (i.e., concentración de fenoles totales y densidad de tricomas), empleando 31 líneas maternas de chile silvestre *C. annuum* var. *glabriusculum*. Los resultados mostraron diferencias en la producción constitutiva e inducida de fenoles y tricomas entre líneas maternas, apoyando la idea de que las líneas maternas poseen una diferente constitución genética para la resistencia. Mientras que las diferencias observadas en el grupo de plantas control indican la variación constitutiva en la defensa de las plantas, la variación genética inducida es explicada por las diferencias en concentración de fenoles y tricomas entre las plantas de los tratamientos de daño mecánico y daño mecánico + secreción oral de *Lema daturaphila*. Además, encontramos variación en el efecto de los tratamientos entre las diferentes líneas maternas, indicando que no todas ellas responden igual, posiblemente por diferencias en su constitución genética. Se encontró una relación negativa entre la producción de fenoles y tricomas a nivel fenotípico, lo que sugiere que se puede generar un conflicto de asignación de recursos entre fenoles y tricomas. Asimismo, se encontró un trade-off entre la producción de fenoles y constitutiva empleando correlaciones genéticas (i.e., valores promedio por línea materna), pero esta no fue significativa. No fueron significativas, ni las correlaciones fenotípicas inducidas, ni las genéticas inducidas de la concentración de fenoles y tricomas. En conjunto, estos resultados indican que las plantas de chile silvestre poseen variación genética en dos caracteres de resistencia contra herbívoros y/o patógenos y la ausencia de disyuntivas sugiere que pueden evolucionar independientemente (Bradshaw, 1965).

4.1 Variación genética de la resistencia

La presencia de variación fenotípica (i.e., rasgos) es imprescindible para que ocurra la evolución por selección natural (Darwin, 1859; Futuyma y Moreno, 1988; Mayr, 1954). Sin embargo, los rasgos que están sujetos a selección no pueden responder a la selección si su expresión no está determinada por la constitución genética del individuo (Falconer y Mackay, 1996). Por ello es relevante determinar que fracción de la variación fenotípica de un carácter de interés es explicada por la variación genética. Los caracteres químicos y físicos que confieren resistencia contra herbívoros en las plantas tienen bases genéticas. Estudios similares a este han reportado variación en *Arabidopsis lyrata* O'Kane y Al-Shehbaz (Karkkainen et al., 2004), *Asclepias* (Agrawal y Fishbein, 2006; Hunter et al., 1996), *Datura Stramonium* L. (Garrido et al., 2012), y *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) Spooner, G.J. Anderson y R.K. Jansen (Sánchez-Peña et al., 2006), indicando que los rasgos defensivos tienen una gran variabilidad y que parte de esta variación es explicada por las diferencias genéticas que existen entre las familias maternas dentro de las poblaciones y entre las poblaciones.

Los resultados del presente estudio muestran variación en la concentración de fenoles totales y densidad de tricomas foliares entre 31 líneas maternas de *Capsicum annuum* var. *glabrisuculum* en 9 localidades a lo largo de su distribución geográfica en México. Ya que las plantas de una línea materna comparten una fracción de la varianza genética (Cheplick, 2015; Falconer y Mackay, 1996), las diferencias observadas entre líneas maternas sugieren la presencia de variación genética asociada a la producción de fenoles y tricomas.

Estudios previos para *C. annuum* var. *glabrisuculum* han detectado una relación positiva entre la producción de tricomas y la adecuación, demostrando que en la naturaleza el daño causado por herbívoros ejerce una presión selectiva que favorece a los individuos con más tricomas (Dipp-Alvarez, 2015). Los resultados de este estudio tienen implicaciones que se pueden discutir en un contexto de evolución adaptativa de la defensa. Por ejemplo, se encontró que hay diferencias en la concentración de fenoles totales y densidad de tricomas tras la inducción por daño mecánico y daño + secreciones orales entre las diferentes líneas maternas. Se ha observado que dentro de una familia de plantas, hay diferente respuesta por parte de dos especies relacionadas ante el ataque del mismo herbívoro (Schmelz et al., 2009; Waterman et al., 2019). El resultado observado en el presente trabajo sugiere que es posible que este patrón también sea intraespecífico.

4.2 Concentración de fenoles totales

La concentración constitutiva de fenoles totales encontrada en la variedad silvestre de *C. annuum* varía de forma similar a la reportada para una variedad de *C. annuum* no especificada (Estiarte et al., 1994). Sin embargo, la concentración de las familias con los valores mayores y menores de concentración de fenoles encontrados en este estudio son 21% mayores y 36% menores en relación a estudios previos (Estiarte et al., 1994). La diferencia en el nivel de fenoles puede deberse al número y tipo de accesiones empleados en cada estudio, pero sugiere que la variación fenotípica para concentración de fenoles totales es más amplia de lo antes considerado. Mientras que este estudio analizó la química fenólica de 31 líneas maternas genéticas que provienen de semillas de 9 poblaciones diferentes recolectadas en estado silvestre, Estiarte *et al.*, (1994) reporta semillas de *C. annuum*, que generalmente se refiere a una variedad domesticada. Dos factores pueden explicar que este estudio haya encontrado mayor variación que la antes reportada, 1) las variedades domesticadas tienden a ser más homogéneas que las silvestres (Brozynska et al., 2016; Mastretta-Yanes et al., 2018); 2) las semillas utilizadas en este estudio provienen de 9 localidades de zonas geográficas alejadas entre sí, lo cual se ha relacionado con diferenciación genética (González-Jara et al., 2011).

La concentración constitutiva de fenoles totales en chile silvestre encontrada varía entre 16.39 – 89.11 GAE mg/g. Este rango es amplio comparado con otras especies en los que se han hecho estudios similares. Por ejemplo, para *Asclepias spp.* se han reportado valores de concentración de fenoles totales entre GAE 2.5 – 8.6 mg/g (Agrawal et al., 2009) y 11.45 – 24.10 GAE mg/g para *Arabidopsis Heynh* (Fiscus et al., 1999). La concentración fenoles totales que se encontró para chile silvestre se asemeja a la de árboles, por ejemplo *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn con 27 – 76 GAE mg/g y *Eucaliptus globulus* Labill con 64 – 98 GAE mg/g (Graça et al., 2005).

A pesar de que no se han llevado a cabo estudios de resistencia inducida por herbívoros con chile silvestre *C. annuum* var. *glabriusculum*, si se han realizado con variedades domesticadas (Latournerie-Moreno et al., 2015; Meena et al., 2008; Vijaya y Rani, 2017a). La variación en la concentración de fenoles totales y su respuesta al daño reportada para cultivares de chile (*C. annuum*) coincide con lo encontrado en este trabajo. Un estudio encontró que 3 de los 4 genotipos utilizados mostraron un incremento en la actividad de la enzima polifenol oxidasa tras daño por mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius, 1889), mientras que uno de ellos, el jalapeño, tuvo un decremento en la actividad de la enzima (Latournerie-Moreno et al., 2015). Por otra parte, otros estudios con *C. annuum* reportan un incremento en acumulación de fenoles totales foliares tras el ataque de un herbívoro, así como tras la infección de un virus (Meena et al., 2008;

Vijaya y Rani, 2017a). Las líneas maternas utilizadas en este estudio muestran respuesta en ambos sentidos, pues se observa que en algunas líneas la concentración de compuestos fenólicos totales incrementa tras los tratamientos de daño mecánico y/o daño mecánico + secreciones orales, en otras disminuye. Que la acción de compuestos fenólicos no son una respuesta generalizada en los diferentes genotipos de *C. annuum* indica que la capacidad de las plantas para responder al daño por herbívoros es específico para cada línea materna. Ya que las plantas estuvieron en un jardín común, donde el ambiente fue el mismo para todas las plantas, las diferencias en la respuesta inducida por los tratamientos de daño apoya la idea de que las líneas maternas tienen una constitución genética que difiere entre ellas (Falconer y Mackay, 1996). Estudios en invernadero han encontrado que los efectos de daño foliar difieren entre líneas maternas, aun cuando la magnitud de daño es igual (Cisneros-Silva et al., 2017; Fornoni et al., 2003).

4.3 Densidad de tricomas

La densidad de tricomas foliares constitutiva en *C. annuum* var. *glabriusculum* se encuentra en un intervalo de 0.47 – 4.79 tricomas/mm². Estos valores se encuentran dentro del rango reportado para variedades de *Capsicum annuum* (Abdala-Roberts et al., 2014; Valenzuela-Apodaca, 2016). Sin embargo, esta densidad es baja comparada con plantas de otros géneros de la familia *Solanaceae*, por ejemplo *Datura stramonium* L. (Castillo et al., 2013), *Solanum carolinense* L. (Kariyat et al., 2013), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Oney y Bingham, 2015) y patata (*Solanum tuberosum* L.) (Kaplan et al., 2009). El papel defensivo de los tricomas en *Capsicum annuum* contra herbívoros ha sido cuestionado (Abdala-Roberts et al., 2014), sugiriendo que otros caracteres son más relevantes en términos de defensa (Vijaya y Rani, 2017b). Sin embargo, en cuatro poblaciones de chile silvestre en Baja California Sur, se encontró una relación negativa entre la densidad de tricomas y el daño foliar (Dipp-Alvarez, 2015). Esto apoya la idea de que los tricomas tienen un papel adaptativo para defensa en poblaciones naturales, y que este puede depender del herbívoro presente (Carmona et al., 2011). En conjunto, la evidencia sugiere que las plantas silvestres de chile poseen variación genética para la producción de tricomas foliares, así como en la inducción al daño (i.e., plasticidad).

La variación encontrada en este estudio puede ser explicada por las diferencias en las comunidades de herbívoros de donde son originarias las plantas, y por las diferencias en la presión selectiva impuesta por los herbívoros sobre los tricomas (Dipp-Alvarez, 2015). Por ejemplo, en poblaciones donde el daño es predecible, se esperaría que las plantas tuvieran niveles de defensa constitutiva mayor, en comparación

con poblaciones en donde el daño es menos predecible, o en sitios donde hay poco daño. De acuerdo Bello-Bedoy (Com. Pers.), las plantas silvestres que se distribuyen en el noroeste de México reciben más daño foliar por herbívoros que aquellas del sureste. La variación observada en este estudio es consistente con lo reportado previamente, pues las plantas de poblaciones del noroeste tienen mayor densidad de tricomas que las del sureste. Este resultado apoya la idea que la mayor presión selectiva por daño foliar en el noroeste favorece una mayor densidad de tricomas, en comparación con plantas del sureste, donde hay menor presión por daño foliar y producen significativamente menos tricomas foliares.

Los tricomas son estructuras físicas las cuales incrementen en número en las hojas posteriores al daño para reducir daños en las hojas nuevas (Schaller, 2008). Evidencia empírica en otras especies ha encontrado que el ácido jasmónico (JA) que se libera después del daño, induce la producción de un mayor número de tricomas en las hojas jóvenes de la planta por medio de la activación de genes relacionados a la defensa (Dalín et al., 2008; León et al., 2001). En este estudio se encontró que los dos tratamientos de daño, mecánico, y daño mecánico + secreciones orales, inducen la producción de tricomas foliares. Esto coincide con la respuesta reportada anteriormente, donde se ha encontrado un incremento en el número de tricomas en las hojas que se desarrollan después de un evento de daño (Agren et al., 2008; Karban y Myers, 1989; Kwon et al., 2006; Oney y Bingham, 2015). La magnitud de la inducción para la producción de tricomas encontrada para *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* se encuentra dentro del rango reportado para 20 familias de plantas (Barton, 2016).

Los cambios en la densidad de tricomas asociados con el tratamiento de daño son difíciles de comprender, ya que se detectaron respuestas positivas y negativas del daño en la producción de tricomas en nuevas hojas. Sin embargo, mientras unas familias consistentemente produjeron más tricomas, y otras menos, los cambios son particulares para las líneas genéticas. Es decir, la magnitud de la inducción para las líneas maternas difiere, lo que es indicativo de que existe variabilidad genética asociada a la plasticidad fenotípica para los caracteres defensivos. La heterogeneidad en las condiciones a las que están sujetas las plantas puede favorecer el desarrollo de estos caracteres plásticos (Schlichting y Pigliucci, 1998) y si el daño por herbívoros es impredecible esto puede generar cambios en la expresión de los tricomas una vez que ocurre el daño. Es necesario realizar experimentos con diferentes herbívoros que nos permitan predecir las trayectorias y explicar la complejidad de las respuestas.

4.4 Trade-off defensivo

La teoría de la defensa en plantas (y otros organismos) ha propuesto históricamente que dos estructuras defensivas redundantes deberían de mostrar un trade-off entre ellos, y se debería de detectar una relación negativa entre ellas, ya que sería poco eficiente asignar energía a dos estructuras que cumplen la misma función (Agrawal, 2011; Agrawal y Fishbein, 2006; Koricheva et al., 2004; Leimu y Koricheva, 2006; Neilson et al., 2013; Roff y Fairbairn, 2007; Traw, 2002). Sin embargo, la detección de trade-off entre estrategias defensivas es poco frecuente, particularmente cuando se estiman los trade-off con valores de correlación genéticos debido a tamaños de muestra bajos (Koricheva, 2002).

Se han sugerido dos cosas que explican la ausencia de trade-off entre caracteres defensivos de las plantas, uno estadístico y uno biológico. El estadístico sugiere que el bajo poder estadístico debido al número reducido de familias empleado en diferentes estudios, dado que reduce la probabilidad de detección de una correlación significativa (Leimu y Koricheva, 2006). Biológicamente se propone que la ausencia de correlaciones ocurre porque se han cuantificado diferentes estructuras de defensa que no antagonizan en su asignación de recursos, como los químicos y físicos (Leimu y Koricheva, 2006). Una alternativa es que la selección favorece la ruptura (i.e., no formación) de correlaciones antagónicas entre caracteres que pueden actuar de forma sinérgica positiva, es decir, que incrementan en conjunto el nivel defensivo de las plantas contra herbívoros. En cambio, para la defensa inducida, el tiempo de respuesta entre diferentes caracteres puede determinar que no se presenten disyuntivas de asignación de recursos, lo que no promovería la ocurrencia de trade-offs (Leimu y Koricheva, 2006).

Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados por otros estudios donde no encuentran un trade-off utilizando correlaciones genéticas entre caracteres constitutivos e inducidos (Cohen et al., 2017; Gardner y Latta, 2007). Este estudio empleó 31 líneas maternas, lo que resulta en un número no tan reducido para detectar una correlación genética, aunque no es posible descartar esta posibilidad en el presente estudio. Ya que si se detectó una relación negativa entre fenoles y tricomas constitutivos usando los valores fenotípicos, emplear un número mayor de rasgos haría posible detectar correlaciones genéticas negativas significativas. Sin embargo, no es posible determinarlo en este estudio.

La ausencia de un trade-off en defensa constitutiva e inducida a nivel genético puede ser explicado por la diferencia en el tiempo de respuesta de los fenoles y los tricomas (Traw, 2003). En este caso, los fenoles totales del chile mostraron un tiempo de respuesta rápido (ver figura 5), en comparación a la respuesta de los tricomas, cuya respuesta se mide 4 hojas después. De esta forma, la oportunidad de detectar un

trade-off entre un rasgo químico y un físico de resistencia contra insectos, que además difiere en tiempo de respuesta, es una explicación plausible a ausencia de un trade-off (Leimu y Koricheva, 2006). Es necesario hacer un experimento que apoye los resultados de este estudio, por ejemplo, evaluar los costos de cada una de las características de defensa físicas y químicas, emplear más líneas maternas genéticas y herbívoros en diferentes estados de desarrollo (Kariyat y Stephenson, 2019).

Para trabajos posteriores, sería de gran utilidad conocer la identidad de los metabolitos secundarios producidos por *C. annuum* var. *glabriusculum*, así como cuantificar si la mezcla de estos varía entre diferentes accesiones. Por otra parte, la variación en la respuesta ante un mismo herbívoro entre genotipos de una misma especie es importante, ya que promueve la búsqueda de variedades que tengan una respuesta adecuada contra herbívoros de importancia económica, y puedan servir para introducir caracteres fenotípicos útiles a las variedades domesticadas del país. Asimismo, es importante considerar al herbívoro, pues muchos de estos tienen asociaciones cercanas con bacterias patógenas que interfieren con las defensas de la planta, por lo que se puede buscar si hay una bacteria que induzca respuesta en la planta o si sea un grupo de ellas. Si es así, es posible proponer un sistema que promueva la defensa en plantas sin la necesidad de aplicar algún otro tipo de daño. Es importante realizar un estudio más a detalle de los diferentes metabolitos secundarios inducidos por la defensa, así como de aquellos que son volátiles. Esto dará una imagen más completa de lo que ocurre en chiltepín como respuesta ante el daño.

Capítulo 5. Conclusiones

Se encontraron diferencias entre familias genéticas en la producción de fenoles totales y densidad de tricomas, apoyando la hipótesis de que hay variación genética en estructuras de defensa contra herbívoros en *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. Además se encontró que el daño por el herbívoro *Lema daturaphila* indujo cambios en la concentración de fenoles totales y densidad de tricomas foliares dependiendo de la línea materna, indicando la presencia de plasticidad fenotípica. La respuesta es diferente para las líneas maternas estudiadas, sugiriendo variación genética en la plasticidad fenotípica entre familias (i.e., norma de reacción; Schlichting y Pigliucci, 1998). La detección de variación genética en dos caracteres de resistencia de *C. annuum* var. *glabriusculum* es importante porque indica que esta especie tiene la capacidad de responder a ambientes selectivos de herbivorismo.

Además, la ausencia de trade-off genético tiene implicaciones evolutivas importantes para la evolución de las defensas, ya que en ausencia de limitantes genéticas o de asignación de recursos, las plantas pueden evolucionar más de un carácter defensivo simultáneamente, confiriendo una gran ventaja evolutiva al ampliarse los mecanismos de defensa (Koricheva et al., 2004). De esta forma *C. annuum* puede tener dos o más estructuras de defensa, pero con diferente capacidad de respuesta para reducir el daño por herbívoros eficientemente, particularmente protegiendo los tejidos jóvenes ante futuros ataques por herbívoros. Un experimento que incluya más de dos caracteres que responden de forma inmediata y tardía podría ayudar a entender si la limitación en la detección de trade-off es debido a la forma de cuantificar la naturaleza de las estructuras físicas y químicas.

Los marcadores moleculares de cloroplasto utilizados no mostraron diferencias importantes entre plantas de diferentes localidades, por lo que no se consideran lo suficientemente sensibles para inferir relaciones a escala intraespecífica para *C. annuum* var. *glabriusculum*. Es necesario obtener información de todo el genoma para poder estimar las relaciones filogenéticas. Además, permitirá estudiar la adaptación local o regional de *C. annuum* var. *glabriusculum* en ambientes bióticos y abióticos.

Literatura citada

- Abdala-Roberts, L., Berny-Mier Y Terán, J. C., Mooney, K. A., Moguel-Ordonez, Y. B., Tut-Pech, F. 2014. Plant traits mediate effects of predators across pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *Ecological Entomology*, 39(3), 361–370. doi:10.1111/een.12107
- Abdala-Roberts, L., Berny-Mier y Terán, J. C., Moreira, X., Durán-Yáñez, A., Tut-Pech, F. 2015. Effects of pepper (*Capsicum chinense*) genotypic diversity on insect herbivores. *Agricultural and Forest Entomology*, 17(4), 433–438. doi:10.1111/afe.12125
- Agrawal, A. A. 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, 279(5354), 1201–1202. de <http://www.sciencemag.org/content/279/5354/1201.abstract>
- Agrawal, A. A. 1999. Induced responses to herbivory in wild radish : effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology*, 80(5), 1713–1723.
- Agrawal, A. A. 2000. Specificity of induced resistance in wild radish: Causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. *Oikos*, 89(3), 493–500. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.890308.x
- Agrawal, A. A. 2007. Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2), 103–109. doi:10.1016/j.tree.2006.10.012
- Agrawal, A. A. 2011. Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology*, 25(2), 420–432. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x
- Agrawal, A. A., Fishbein, M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology*, 87(7 SUPPL.), 132–149. doi:10.1890/0012-9658(2006)87[132:PDS]2.0.CO;2
- Agrawal, A. A., Salminen, J. P., Fishbein, M. 2009. Phylogenetic trends in phenolic metabolism of milkweeds (*Asclepias*): Evidence for escalation. *Evolution*, 63(3), 663–673. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00573.x
- Agren, J., Baldwin, I. T., Barbehenn, R., Bastrup-Spohr, L., Beekwilder, J., Bernards, M. A., Bjorkman, C., Bohlmann, J., Bruinsma, M., Chen, H., Constabel, C. P., Dalin, P., Degenhardt, J., Dicke, M., Dudareva, N., Engelberth, J., Felton, G. W., Ginzberg, I., Damme, E. J. M. Van. 2008. Induced plant resistance to herbivory. En A. Schaller (Ed.), *Springer* (1a ed.). doi:10.1007/978-1-4020-8182-8
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L., Kim, S. C. 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum* ; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190–1202. doi:10.3732/ajb.0800155
- Ahn, S. J., Badenes-Pérez, F. R., Heckel, D. G. 2011. A host-plant specialist, *Helicoverpa assulta*, is more tolerant to capsaicin from *Capsicum annuum* than other noctuid species. *Journal of Insect Physiology*, 57(9), 1212–1219. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.05.015

- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. doi:10.1038/nprot.2007.102
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Olalere, O. A. 2017. Ethanol extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud University - Science*, 1–10. doi:10.1016/j.jksus.2017.08.001
- Aljanabi, S., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693. doi:10.1093/nar/25.22.4692
- Antonovics, J., Primack, R. B. 1982. Experimental ecological genetics in plantago : vi . The demography of seedling transplants of *P. lanceolata*. *Journal of Ecology*, 70(1), 55–75.
- Ballina-Gómez, H., Latournerie-Moreno, L., Ruiz-Sánchez, E., Pérez-Gutiérrez, A., Rosado-Lugo, G. 2013. Morphological characterization of *Capsicum annuum* L. accessions from southern Mexico and their response to the *Bemisia tabaci*-Begomovirus complex. *Chilean journal of agricultural research*, 73(4), 329–338. doi:10.4067/S0718-58392013000400001
- Barton, K. E. 2016. Tougher and thornier: General patterns in the induction of physical defence traits. *Functional Ecology*, 30(2), 181–187. doi:10.1111/1365-2435.12495
- Beckman, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101–110. doi:10.1006/pmpp.2000.0287
- Bennett, R. N., Wallsgrave, R. M. 1994. Tansley review no. 72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617–633.
- Berenbaum, M. R., Zangerl, A. R. 2012. Genetics of secondary metabolism and herbivore resistance in plants. En *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites ecological and evolutionary processes: Vol. 2*. doi:10.1016/B978-0-08-092545-5.50016-X
- Bernays, E. A. 1981. Plant tannins and insect herbivores: an appraisal. *Ecological Entomology*, 6, 353–360. doi:10.1111/j.1365-2311.1981.tb00625.x
- Berny-Mier y Teran, J. C., Abdala-Roberts, L., Durán-Yáñez, A., Tut-Pech, F. 2013. Variation in insect pest and virus resistance among habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) in Yucatán, México. *Agrociencia*, 47(5), 471–482. Recuperado de <https://escholarship.org/uc/item/20t3m28s>
- Bi, J. L., Felton, G. W., Murphy, J. B., Howles, P. A., Dixon, R. A., Lamb, C. J. 1997. Do plant phenolics confer resistance to specialist and generalist insect herbivores? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(11), 4500–4504. doi:10.1021/jf970555m
- Bio-Rad. 2014. ImageLab Software. Bio-Rad, Hercules CA.

- Boudet, A. M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2722–2735. doi:10.1016/j.phytochem.2007.06.012
- Bradshaw, A. D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics*, 13(C), 115–155. doi:10.1016/S0065-2660(08)60048-6
- Brozynska, M., Furtado, A., Henry, R. J. 2016. Genomics of crop wild relatives: Expanding the gene pool for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 14(4), 1070–1085. doi:10.1111/pbi.12454
- Candela, M. E., Alcázar, M. D., Espín, A., Egea, C., Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 44(1), 116–123. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02723.x
- Cano-Vázquez, A., López-Peralta, M. C., Zavaleta-Mancera, H. A., Cruz-Huerta, N., Ramírez-Ramírez, I., Gardea-Béjar, A., González-Hernández, V. A. 2015. Variación en grados de latencia en semillas entre colectas de Chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Botanical Sciences*, 93(1), 175. doi:10.17129/botsci.138
- Carmona, D., Lajeunesse, M. J., Johnson, M. T. J. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology*, 25(2), 358–367. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01794.x
- Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E., Gastaminza, G. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revi. Soc. Entomol. Argent.*, 69(3–4), 209–231.
- Castillo, G., Cruz, L. L., Hernández-Cumplido, J., Oyama, K., Flores-Ortiz, C. M., Fornoni, J., Valverde, P. L., Núñez-Farfán, J. 2013. Geographic association and temporal variation of chemical and physical defense and leaf damage in *Datura stramonium*. *Ecological Research*, 28(4), 663–672. doi:10.1007/s11284-013-1059-4
- Castillo, G., Cruz, L. L., Tapia-López, R., Olmedo-Vicente, E., Carmona, D., Anaya-Lang, A. L., Fornoni, J., Andraca-Gómez, G., Valverde, P. L., Núñez-Farfán, J. 2014. Selection mosaic exerted by specialist and generalist herbivores on chemical and physical defense of *Datura stramonium*. *PLoS ONE*, 9(7), e102478. doi:10.1371/journal.pone.0102478
- Castro, M. M., Demarco, D. 2008. Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications*, 3(8), 1273–1284.
- Cheplick, G. P. 2015. *Approaches to plant evolutionary ecology*. Oxford University Press.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1–20. doi:10.1016/j.plaphy.2013.05.009

- Cisneros-Silva, A., Castillo, G., Chávez-Pesqueira, M., Bello-Bedoy, R., Camargo, I. D., Núñez-Farfán, J. 2017. Light limitation reduces tolerance to leaf damage in *Datura stramonium*. *Evolutionary Ecology Research*, 18(4), 351–362.
- Clark, S. M., Bean, M. L., Ledoux, D. G., Seeno, T. N., Riley, E. G., Gilbert, A. J., Sullivan, J. M. 2004. Host plants of leaf beetle species occurring in the United States and Canada. En *Special Publication of the Coleopterist Society no. 2 (Vol. 2)*.
- Close, D. C., McArthur, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics : protection from photodamage not herbivores? *OIKOS*, 99(1), 166–172.
- Cohen, A. A., Isaksson, C., Salguero-Gómez, R. 2017. Co-existence of multiple trade-off currencies shapes evolutionary outcomes. *PLOS ONE*, 12(12), e0189124. doi:10.1371/journal.pone.0189124
- Cooper-Driver, G. A., Bhattacharya, M., Harborne, J. B. 1998. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 49(5), 1165–1174. doi:10.1016/S0031-9422(98)00054-5
- Dalin, P., Ågren, J., Björkman, C., Huttunen, P., Kärkkäinen, K. 2008. Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. En *Induced Plant Resistance to Herbivory*. doi:10.1007/978-1-4020-8182-8_4
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life. doi:10.5962/bhl.title.68064
- del Campo, M. L., Halitschke, R., Short, S. M., Lazzaro, B. P., Kessler, A. 2013. Dietary plant phenolic improves survival of bacterial infection in *Manduca sexta* caterpillars. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146(3), 321–331. doi:10.1111/eea.12032
- Deng, Y., Lu, S. 2017. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 36(4), 257–290. doi:10.1080/07352689.2017.1402852
- Dipp-Alvarez, M. 2015. Variación fenotípica en resistencia contra herbívoros y éxito reproductivo en cuatro poblaciones silvestres de chiltepín *Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. 28 pp.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., Zhou, S. 2012. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PloS one*, 7(4), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0035071
- Edwards, P. J., Wratten, S. D. 1983. Wound induced defences in plants and their consequences for patterns of insect grazing. *Oecologia*, 59(1), 88–93. doi:10.1007/BF00388079
- Erb, M. 2018. Plant defenses against herbivory: closing the fitness gap. *Trends in Plant Science*, 23(3), 187–194. doi:10.1016/j.tplants.2017.11.005

- Estiarte, M., Filella, I., Serra, J., Peñuelas, J. 1994. Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of pepper and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia*, 99, 387–391.
- Falconer, D. S., Mackay, T. F. C. 1996. Introduction to quantitative genetics. En *Trends in Genetics*.
- Feeny, P. 1970. Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51(4), 565–581.
- Fiscus, E. L., Philbeck, R., Britt, A. B., Booker, F. L. 1999. Growth of *Arabidopsis* flavonoid mutants under solar radiation and UV filters. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 231–245.
- Fornoni, J., Valverde, P. L., Núñez-Farfán, J. 2003. Quantitative genetics of plant tolerance and resistance against natural enemies of two natural populations of *Datura stramonium*. *Evolutionary Ecology Research*, 5(7), 1049–1065.
- Fox, L. R., Macauley, B. J. 1977. Insect grazing on *Eucalyptus* in response to variation in leaf tannins and nitrogen. *Oecologia*, 29(2), 145–162. doi:10.1007/BF00345794
- Frost, C. J., Mescher, M. C., Carlson, J. E., De Moraes, C. M. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology*, 146(3), 818–824. doi:10.1104/pp.107.113027
- Futuyma, D. J., Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19(1988), 207–233.
- Gardner, K. M., Latta, R. G. 2007. Shared quantitative trait loci underlying the genetic correlation between continuous traits. *Molecular Ecology*, 16(20), 4195–4209. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03499.x
- Garrido, E., Andraca-Gómez, G., Fornoni, J. 2012. Local adaptation: simultaneously considering herbivores and their host plants. *New Phytologist*, 193(2), 445–453. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03923.x
- Gatehouse, J. A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, 156(2), 145–169. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x
- Giebel, J. 1973. Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activities in potato roots and their significance in potato resistance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*. doi:10.1163/187529273X00024
- Glassmire, A. E. 2017. Intraspecific phytochemical variation as mosaics of defense in tropical forests. University of Nevada, Reno Intraspecific.
- Glassmire, A. E., Jeffrey, C. S., Forister, M. L., Parchman, T. L., Nice, C. C., Jahner, J. P., Wilson, J. S., Walla, T. R., Richards, L. A., Smilanich, A. M., Leonard, M. D., Morrison, C. R., Simbaña, W., Salagaje, L. A., Dodson, C. D., Miller, J. S., Tepe, E. J., Villamarin-Cortez, S., Dyer, L. A. 2016. Intraspecific phytochemical variation shapes community and population structure for specialist caterpillars. *The New phytologist*, 212(1), 208–219. doi:10.1111/nph.14038

- Gong, B., Zhang, G. 2014. Interactions between plants and herbivores: A review of plant defense. *Acta Ecologica Sinica*, 34(6), 325–336. doi:10.1016/j.chnaes.2013.07.010
- González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., García-Arenal, F. 2011. Impact of human management on the genetic variation of wild pepper, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. *PLoS ONE*, 6(12). doi:10.1371/journal.pone.0028715
- Graça, M. A. S., Bärlocher, F., Gessner, M. O. 2005. Methods to study litter decomposition: A practical guide. En *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*. doi:10.1007/1-4020-3466-0
- Hahn, P. G., Agrawal, A. A., Sussman, K. I., Maron, J. L. 2018. Population variation, environmental gradients, and the evolutionary ecology of plant defense against herbivory. *The American Naturalist*, 193(1), 000–000. doi:10.1086/700838
- Hahn, P. G., Maron, J. L. 2016. A framework for predicting intraspecific variation in plant defense. *Trends in Ecology and Evolution*, 31(8), 646–656. doi:10.1016/j.tree.2016.05.007
- Harborne, J. B. 1994. Do natural plant phenols play a role in ecology? En *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, 1994, 381.
- Harvell, C. D. 1990. The ecology and evolution of inducible defenses. *The Quarterly Review of Biology*, 65(3), 323–340. de <https://www.jstor.org/stable/2832369>
- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., Medina-Juárez, L. Á. 2016. Wild pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1. doi:10.2135/cropsci2014.11.0789
- Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., Vázquez-Yanes, C., Oyama, K. 2019. Los parientes silvestres del chile (*Capsicum spp.*) como recursos genéticos. *Botanical Sciences*, 181(62), 171. doi:10.17129/botsci.1559
- Herrmann, K. M. 1995. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*, 107(1), 7–12. doi:10.1104/pp.107.1.7
- Holeski, L. M., Chase-Alonge, R., Kelly, J. K. 2010. The genetics of phenotypic plasticity in plant defense: Trichome production in *Mimulus guttatus*. *The American Naturalist*, 175(4), 391–400. doi:10.1086/651300
- Howe, G. A., Schaller, A. 2008. Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. En *Induced plant resistance to herbivory*. Springer, Dordrecht. (pp. 7-29).
- Hsiao, T. H. 1986. Specificity of certain chrysomelid beetles for Solanaceae. En W. G. D'Arcy (Ed.), *Solanaceae: Biology and Systematics*. Columbia University Press: New York. pp. 345–363.
- Hunter, M. D., Malcolm, S. B., Hartley, S. E. 1996. Population-level variation in plant secondary chemistry, and the population biology of herbivores. *Chemoecology*, 7(1), 45–56. doi:10.1007/BF01240637

- Johnson, H. B. 1975. Plant pubescence: An ecological perspective. *The Botanical Review*, 41(3), 233–258. doi:10.1007/BF02860838
- Johnson, M. T. J., Agrawal, A. A. 2005. Plant genotype and environment interact to shape a diverse arthropod community on evening primrose (*Oenothera biennis*). *Ecology*, 86(4), 874–885. doi:10.1890/04-1068
- Kant, M. R., Jonckheere, W., Knecht, B., Lemos, F., Liu, J., Schimmel, B. C. J., Villarroel, C. A., Ataíde, L. M. S., Dermauw, W., Glas, J. J., Egas, M., Janssen, A., Van Leeuwen, T., Schuurink, R. C., Sabelis, M. W., Alba, J. M. 2015. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. *Annals of Botany*, 115(7), 1015–1051. doi:10.1093/aob/mcv054
- Kaplan, I., Dively, G. P., Denno, R. F. 2009. The costs of anti-herbivore defense traits in agricultural crop plants: A case study involving leafhoppers and trichomes. *Ecological Applications*, 19(4), 864–872. doi:10.1890/07-1566.1
- Karban, R. 2011. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology*, 25(2), 339–347. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01789.x
- Karban, R., Myers, J. H. 1989. Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 331–348.
- Kariñho-Betancourt, E. 2018. Plant-herbivore interactions and secondary metabolites of plants: Ecological and evolutionary perspectives. *Botanical Sciences*, 96(1), 35. doi:10.17129/botsci.1860
- Kariyat, R. R., Balogh, C. M., Moraski, R. P., De Moraes, C. M., Mescher, M. C., Stephenson, A. G. 2013. Constitutive and herbivore-induced structural defenses are compromised by inbreeding in *Solanum carolinense* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 100(6), 1014–1021. doi:10.3732/ajb.1200612
- Kariyat, R. R., Smith, J. D., Stephenson, A. G., De Moraes, C. M., Mescher, M. C. 2017. Non-glandular trichomes of *Solanum carolinense* deter feeding by *Manduca sexta* caterpillars and cause damage to the gut peritrophic matrix. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1849). doi:10.1098/rspb.2016.2323
- Kariyat, R. R., Stephenson, A. G. 2019. Inbreeding depression: it's not just for population biologists. *American Journal of Botany*, 106(3), 331–333. doi:10.1002/ajb2.1256
- Karkkainen, K., Loe, G., Agren, J. 2004. Population structure in *Arabidopsis lyrata*: Evidence for divergent selection on trichome production. *Evolution*, 58(12), 2831–2836.
- Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., Borsari, B. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2, 13–18.
- Kempel, A., Schädler, M., Chrobok, T., Fischer, M., van Kleunen, M. 2011. Tradeoffs associated with constitutive and induced plant resistance against herbivory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5685–5689. doi:10.1073/pnas.1016508108

- Kessler, A. 2015. The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 47–53. doi:10.1016/j.cois.2015.02.002
- Kessler, A. 2016. The geographic mosaic of plant chemistry and its effects on community and population genetic diversity. *New Phytologist*, 212(1), 8–10. doi:10.1111/nph.14136
- Kessler, A., Kalske, A. 2018. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Reviews*, (49), 115–138. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062406
- Kim, H. J., Seo, E., Kim, J. H., Cheong, H., Kang, B. C., Choi, D. 2012. Morphological classification of trichomes associated with possible biotic stress resistance in the genus *Capsicum*. *Plant Pathology Journal*, 28(1), 107–113. doi:10.5423/PPJ.NT.12.2011.0245
- Koricheva, J. 2002. Meta-analysis of sources of variation in fitness costs. *Ecology*, 83(1), 176–190. doi:10.2307/2680130
- Koricheva, J., Nykänen, H., Gianoli, E. 2004. Meta-analysis of trade-offs among plant antiherbivore defenses: are plants jacks-of-all-trades, masters of all? *The American Naturalist*, 163(4), E64–E75. doi:10.1086/382601
- Kwon, M., Cho, H. M., Ahn, Y. J. 2006. Relationship between feeding damage by beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and leaf trichome density of potato. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 9(4), 361–367. doi:10.1016/S1226-8615(08)60315-5
- Latournerie-Moreno, L., Ic-Caamal, A., Ruiz-Sánchez, E., Ballina-Gómez, H., Islas-Flores, I., Chan-Cupul, W., González-Mendoza, D. 2015. Survival of *Bemisia tabaci* and activity of plant defense-related enzymes in genotypes of *Capsicum annuum* L. *Chilean journal of agricultural research*, 75(1), 71–77. doi:10.4067/S0718-58392015000100010
- Lattanzio, V., Cardinali, A., Linsalata, V. 2012. Plant phenolics: a biochemical and physiological perspective. *Recent advances in Polyphenol Research, Volume 3*, 3, 1–39. doi:10.1002/9781118299753.ch1
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., Amendola, V. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *En Phytochemistry* (Vol. 661).
- Leimu, R., Koricheva, J. 2006. A meta-analysis of tradeoffs between plant tolerance and resistance to herbivores : combining the evidence from ecological and agricultural studies. *Oikos*, 112(1), 1–9.
- Lemos, V. C., Julia Jessica Reimer, Alexandra Wormit. 2019. Color for life: biosynthesis and distribution of phenolic compounds in pepper (*Capsicum annuum*). *Agriculture*, 9(4), 81. doi:10.3390/agriculture9040081
- León, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J. J. 2001. Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 1–9.

- Levin, D A. 1976. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7(1), 121–159. doi:10.1146/annurev.es.07.110176.001005
- Levin, Donald A. 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology*, 48(1, Part 1), 3–15. doi:10.1086/407484
- Levin, Donald A. 1971. Plant phenolics : an ecological perspective. *The American Naturalist*, 105(942), 157–181.
- Li, R., Shang, H., Wu, H., Wang, M., Duan, M., Yang, J. 2018. Thermal inactivation kinetics and effects of drying methods on the phenolic profile and antioxidant activities of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. doi:10.1038/s41598-018-27874-4
- Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. De, Jiang, D. A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933–8952. doi:10.3390/molecules15128933
- Lizzi, Y., Roggero, J. P., Coulomb, P. J. 1995. Behaviour of the phenolic compounds on *Capsicum annuum* leaves Infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology*, 143(10), 619–627. doi:10.1111/j.1439-0434.1995.tb00211.x
- López-España, R. G., Hernández-Verdugo, S., Parra-Terraza, S., Porras, F., Pacheco-Olvera, A., Valdez-Ortiz, A., Osuna-Enciso, T., Muy-Rangel, M. D. 2016. Diferenciación geográfica de poblaciones de Chile silvestre (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) del noroeste de México. *Phyton*, 85(667), 131–141.
- López-Martínez, G., Palacios-Torres, R. E., López-Coronel, D., Bustamante-Ortiz, A. G., Prieto-Baeza, L. A., Ahúja-Mendoza, S., Killough, J. P., Malpica-Pita, J. 2007. Fluctuación poblacional de crisomélidos y minadores y su posible relacion con la virosis en chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq, 1777). *Entomologia Agrícola*, 407–413.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., Dey, S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4), 359–368. doi:10.4161/psb.5.4.10871
- Martínez-Díaz, Y., González-Rodríguez, A., Delgado-Lamas, G., Espinosa-García, F. J. 2015. Geographic structure of chemical variation in wild populations of the fuel crop *Jatropha curcas* L. in Mexico. *Industrial Crops and Products*, 74, 63–68. doi:10.1016/j.indcrop.2015.04.049
- Mastretta-Yanes, A., Acevedo Gasman, F., Burgeff, C., Cano Ramírez, M., Piñero, D., Sarukhán, J. 2018. An initiative for the study and use of genetic diversity of domesticated plants and their wild relatives. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1–7. doi:10.3389/fpls.2018.00209
- Mayr, E. 1954. Change of genetic environment and evolution. En *Evolution as a Process*.
- Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2 Special Issue), 232–249.

- McGovern, T. M., Hellberg, M. E. 2002. Cryptic species, cryptic endosymbionts, and geographic variation in chemical defenses in the bryozoan *Bugula neritina*. *Molecular Ecology*, 12, 1207–1215. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01758.x
- McNaughton, S. J. 1983. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos*, 40(3), 329–336.
- Mediani, A., Abas, F., Tan, C., Khatib, A. 2014. Effects of different drying methods and storage time on free radical scavenging activity and total phenolic content of *Cosmos Caudatus*. *Antioxidants*, 3(2), 358–370. doi:10.3390/antiox3020358
- Meena, R. K., Patni, V., Arora, D. K. 2008. Study on phenolics and their oxidative enzyme in *Capsicum annuum* L. infected with Geminivirus. *Asian J. Exp. Sci*, 22(3), 307–310.
- Montes-Hernández, S. 2010. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México. En Inifap. doi:10.7498/aps.63.104215
- Montezano, D. G., Specht, A., Sosa-Gomez, D. R., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. V., Peterson, J. A., Hunt, T. E. 2018. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, 26(2), 286–300. doi:10.4001/003.026.0286
- Moore, B. D., Andrew, R. L., Külheim, C., Foley, W. J. 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *The New phytologist*, 201(3), 733–750. doi:10.1111/nph.12526
- Moreira, X., Mooney, K. A., Rasmann, S., Petry, W. K., Carrillo-Gavilán, A., Zas, R., Sampedro, L. 2014. Trade-offs between constitutive and induced defences drive geographical and climatic clines in pine chemical defences. *Ecology Letters*, 17(5), 537–546. doi:10.1111/ele.12253
- Neilson, E. H., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., Møller, B. L. 2013. Plant chemical defense: At what cost? *Trends in Plant Science*, 18(5), 250–258. doi:10.1016/j.tplants.2013.01.001
- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, (30), 369–389.
- Oney, M. A., Bingham, R. A. 2015. Effects of simulated and natural herbivory on tomato (*Solanum lycopersicum* var. *esculentum*) leaf trichomes. *Bios*, 85(4), 192–198. doi:10.1893/0005-3155-85.4.192
- Özeker, E. 1999. Phenolic compounds and their importance. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 114–124.
- Parker, J. D., Salminen, J. P., Agrawal, A. A. 2010. Herbivory enhances positive effects of plant genotypic diversity. *Ecology Letters*, 13(5), 553–563. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01452.x
- Peter, A. J., Shanower, T. G., Romeis, J. 1995. The role of plant trichomes in insect resistance: A selective review. *Phytophaga*, 7, 41–63.

- Price, P. W., Bouton, C. E., Gross, P., Bruce, A., Thompson, J. N., Weis, A. E. 1980. Ineteractions among three trophic levels: Influence of Plants on Interactions Between Insect Herbivores and Natural Enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11(1), 41–65.
- Rasmann, S., Chassin, E., Bilat, J., Glauser, G., Reymond, P. 2015. Trade-off between constitutive and inducible resistance against herbivores is only partially explained by gene expression and glucosinolate production. *Journal of Experimental Botany*, 66(9), 2527–2534. doi:10.1093/jxb/erv033
- Rhoades, D. F. . 1985. Offensive-defensive interactions between herbivores and plants: their relevance in herbivore population dynamics and ecological theory. *The American Naturalist*, 125(2), 205–238.
- Roff, D. A., Fairbairn, D. J. 2007. The evolution of trade-offs: Where are we? *Journal of Evolutionary Biology*, 20(2), 433–447. doi:10.1111/j.1420-9101.2006.01255.x
- Sánchez-Peña, P., Oyama, K., Núñez-Farfán, J., Fornoni, J., Hernández-Verdugo, S., Márquez-Guzmán, J., Garzón-Tiznado, J. A. 2006. Sources of resistance to whitefly (*Bemisia spp.*) in wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) spooner G.J. Anderson et R.K. Jansen in Northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 711–719. doi:10.1007/s10722-004-3943-9
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., Villanueva-Cañongo, C. 2019. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. En *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds [Working Title]: Vol. i*. doi:10.5772/intechopen.83815
- SAS Institute Inc. 2007. JMP 7. Cary, NC, USA.
- Schaller, A. 2008. Induced plant resistance to herbivory. *Induced Plant Resistance to Herbivory*, (January), 1–462. doi:10.1007/978-1-4020-8182-8
- Schlichting, C. D., Pigliucci, M. 1998. Phenotypic evolution: a reaction norm perspective. Sinauer Associates Incorporated. doi:10.2307/2419653
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., Tumlinson, J. H., Teal, P. E. A. 2009. Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), 653–657. doi:10.1073/pnas.0811861106
- Schultz, J. C., Arnold, T. M., Agrawal, A. A., Tuzun, S., Bent, E. 2000. Plant multi-tasking. *Ecology*, 81(8), 2350. doi:10.2307/177119
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., Small, R. L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1), 142–166. doi:10.3732/ajb.92.1.142

- Shaw, Joey, Lickey, E. B., Schilling, E. E., Small, R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275–288. doi:10.3732/ajb.94.3.275
- Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., Mahmood, Z. 2017. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(4), 360–363. doi:10.1016/j.jtumed.2016.11.006
- Simms, E. L., Rausher, M. D. 1987. Costs and benefits of plant resistance to herbivory. *The American Naturalist*, 130(4), 570–581.
- Stackpole, D. J., Vaillancourt, R. E., Alves, A., Rodrigues, J., Potts, B. M. 2011. Genetic variation in the chemical components of *Eucalyptus globulus* Wood. *Genes|Genomes|Genetics*, 1(2), 151–159. doi:10.1534/g3.111.000372
- Stenberg, J. A., Muola, A. 2017. How should plant resistance to herbivores be measured? *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 10–13. doi:10.3389/fpls.2017.00663
- Symonds, V. V., Godoy, A. V., Alconada, T., Botto, J. F., Juenger, T. E., Casal, J. J., Lloyd, A. M. 2005. Mapping quantitative trait loci in multiple populations of *Arabidopsis thaliana* identifies natural allelic variation for trichome density. *Genetics*, 169(3), 1649–1658. doi:10.1534/genetics.104.031948
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17(5), 1105–1109. doi:10.1007/BF00037152
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*, (5th ed.) Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates inc., publishers.
- Takahama, U. 2004. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1–2), 207–219. doi:10.1023/B:PHYT.0000047805.08470.e3
- Tejas, R. A., Servín, R., Nieto-Garibay, A., Marín, A. 2017. Registro de *Plagiometriona clavata* (Fabricius 1798) (Coleoptera: Chrysomelidae) en Chile silvestre *Capsicum annum*, de Baja California Sur, México. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 27(1), 201–205. doi:10.21829/azm.2011.271746
- Tewksbury, J. J., Manchego, C., Haak, D. C., Levey, D. J. 2006. Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *Journal of Chemical Ecology*, 32(3), 547–564. doi:10.1007/s10886-005-9017-4
- Tewksbury, J. J., Nabhan, G. P. 2001. Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature*, 412(6845), 403–404. doi:10.1038/35086653
- Thompson, J. N. 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *The American Naturalist*, 153(S5), S1–S14. doi:10.1086/303208

- Tian, D., Tooker, J., Peiffer, M., Chung, S. H., Felton, G. W. 2012. Role of trichomes in defense against herbivores: Comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 236(4), 1053–1066. doi:10.1007/s00425-012-1651-9
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., Fernie, A. R. 2013. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in plant science*, 4(March), 62. doi:10.3389/fpls.2013.00062
- Traw, M. B. 2002. Is induction response negatively correlated with constitutive resistance in black mustard? *Evolution*, 56(11), 2196–2205. doi:10.1111/j.0014-3820.2002.tb00144.x
- Traw, M. B. 2003. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(3), 1367–1375. doi:10.1104/pp.103.027086
- Valenzuela-Apodaca, E. A. 2016. Respuestas en la defensa contra herbívoros inducidas por daño foliar artificial en *Capsicum annuum* var. Serrano. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. 31 pp.
- Valverde, P. L., Fornoni, J., Núñez-Farfán, J. 2001. Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(3), 424–432. doi:10.1046/j.1420-9101.2001.00295.x
- Van Cleef, E. A. C. 2016. Are glandular trichomes of *Capsicum* important for direct and indirect defence? Thesis MSc. Wageningen University.
- Van Volkenburgh, E. 1999. Leaf expansion - An integrating plant behaviour. *Plant, Cell and Environment*, 22(12), 1463–1473. doi:10.1046/j.1365-3040.1999.00514.x
- Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Rodríguez, K., Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., López, J., Perez-Won, M. 2009. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117(4), 647–653. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.066
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006a. Families of phenolic compounds and means of classification. En *Phenolic Compound Biochemistry*. doi:10.1007/978-1-4020-5164-7_1
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006b. The role of phenols in plant defense. En *Phenolic Compound Biochemistry*. doi:10.1007/978-1-4020-5164-7_6
- Vijaya, M., Rani, P. U. 2017a. Defensive responses in *Capsicum annuum* (L) plants, induced due to the feeding by different larval instars of *Spodoptera litura* (F). *Arthropod-Plant Interactions*, 11(2), 193–202. doi:10.1007/s11829-016-9479-z
- Vijaya, M., Rani, P. U. 2017b. Feeding-induced phenol production in *Capsicum annuum* L. influences *Spodoptera litura* F. larval growth and physiology. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 95(1), e21387. doi:10.1002/arch.21387

- Vijaya, M., Rani, P. U., Rajna, S. 2018. Induced indirect defense in chilli plant , *Capsicum annuum* L . due to feeding stress caused by herbivore , *Spodoptera litura* F . Journal of Entomology and Zoology Studies, 6(2), 1264–1270.
- Votava, E. J., Nabhan, G. P., Bosland, P. W. 2002. Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an in situ population and ex situ accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). Conservation Genetics, 3(2), 123–129. doi:10.1023/A:1015216504565
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., Bovy, A. G. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. Phytochemistry, 72(11–12), 1358–1370. doi:10.1016/j.phytochem.2011.03.016
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H. C. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling and Behavior, 7(10). doi:10.4161/psb.21663
- Waterman, J. M., Cazzonelli, C. I., Hartley, S. E., Johnson, S. N. 2019. Simulated herbivory: the key to disentangling plant defence responses. Trends in Ecology and Evolution, 34(5), 447–458. doi:10.1016/j.tree.2019.01.008
- Wittstock, U., Gershenzon, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. Current Opinion in Plant Biology, 5(4), 300–307. doi:10.1016/S1369-5266(02)00264-9
- Züst, T., Heichinger, C., Grossniklaus, U., Harrington, R., Kliebenstein, D. J., Turnbull, L. A. 2012. Natural enemies drive geographic variation in plant defenses. Science, 338(6103), 116–119. doi:10.1126/science.1226397