



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
SISTEMÁTICA

**TRICOMAS DEL GÉNERO *TILIA* EN MÉXICO: DIVERSIDAD Y ONTOGENIA**

**TESIS**

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

PRESENTA:

**CLAUDIA MARYSOL RAMÍREZ DÍAZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. TERESA TERRAZAS SALGADO**, Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ**, FES Iztacala, UNAM

**DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ**, Facultad de Ciencias, UNAM

CD. MX.

NOVIEMBRE, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



OFICIO CPCB/1010/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de Septiembre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RAMÍREZ DÍAZ CLAUDIA MARYSOL** con número de cuenta 306082902 con la tesis titulada **"TRICOMAS DEL GÉNERO TILIA EN MÉXICO: DIVERSIDAD Y ONTOGENIA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO**:

Presidente: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO  
Vocal: DRA. ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA  
Secretario: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ  
Suplente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA  
Suplente: DRA. EVA AGUIRRE HERNÁNDEZ

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de octubre de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad brindada para el desarrollo de mi proyecto de maestría.

Al CONACYT por la beca otorgada (463926) en el periodo 2017-2018.

A los miembros del Comité Tutoral por su invaluable apoyo académico, Dra. Teresa Terrazas Salgado, Dra. Silvia Aguilar Rodríguez y a la Dra. Eva Aguirre Hernández.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

A la Dra. Teresa Terrazas a quien le tengo gran cariño y admiración, por darme la oportunidad de continuar explorando a las tilias. Por su apoyo, confianza y paciencia durante todo este tiempo.

A la Dra. Alicia Rojas Leal por su ayuda y consejos, tanto en el laboratorio como para el escrito de este trabajo.

A mis padres y hermanos por siempre estar e impulsarme a seguir.

A Teo y Einar por su apoyo incondicional

A mis compañeros del cubículo, Ale, Emilio, Dani, Silvia y Paty, por ser buenos compañeros y por los momentos compartidos

A Laura, Luz, Andrei, Mariana y Pilar por estar siempre al pendiente de mí.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	0
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
<i>Género Tilia</i> .....	7
ANTECEDENTES.....	8
Tricomas: ontogenia y variación .....	8
Arquitectura foliar .....	10
Anatomía foliar .....	10
Metabolitos secundarios.....	11
Variación.....	12
OBJETIVOS .....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
En campo .....	15
En laboratorio.....	15
Variables cuantitativas y análisis estadísticos .....	20
RESULTADOS.....	23
Tricomas: ontogenia y diversidad .....	23
Ontogenia de los tricomas .....	23
Diversidad de los tricomas .....	31
Arquitectura foliar .....	34
Anatomía foliar .....	36
Metabolitos secundarios.....	42
Análisis estadísticos .....	44
DISCUSION .....	49
Ontogenia de los tricomas .....	49
Arquitectura foliar .....	51
Anatomía foliar .....	52
Metabolitos secundarios.....	53
Reconocimiento de especies.....	54
CONCLUSIONES .....	58
REFERENCIAS.....	59

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.....	22
Cuadro 2.....	32
Cuadro 3.....	33
Cuadro 4.....	41
Cuadro 5.....	42
Cuadro 6.....	43
Cuadro 7.....	44
Cuadro 8.....	46
Cuadro 9.....	46
Cuadro 10.....	48
Figura 1.....	26
Figura 2.....	27
Figura 3.....	28
Figura 4.....	28
Figura 5.....	29
Figura 6.....	30
Figura 7.....	35
Figura 8.....	37
Figura 9.....	40
Figura 10.....	45
Figura 11.....	47

## RESUMEN

Los tricomas son apéndices epidérmicos que frecuentemente son utilizados en la taxonomía de diversos grupos de plantas. El género *Tilia* pertenece a la familia Malvaceae y el número de especies que se distribuye en México es controversial; con base en características morfológicas de la hoja se han propuesto desde una hasta 15 especies. La finalidad de este trabajo es encontrar caracteres que permitan apoyar o refutar las diferentes propuestas mediante la descripción de la diversidad de los tricomas así como la anatomía, arquitectura foliar y metabolitos secundarios. Se realizaron recolectas de hojas maduras así como de yemas vegetativas en nueve estados de la República Mexicana; las láminas foliares de las yemas vegetativas se incluyeron en glicolmetacrilato para obtener secciones finas que se tiñeron con Violeta de cresilo y otras más se prepararon para MEB. Mediante las observaciones realizadas mediante microscopía de luz y MEB se describió la ontogenia de los tricomas. De hojas maduras se realizaron inclusiones en parafina para obtener secciones transversales y se tiñeron con Safranina-Verde rápido, también se prepararon hojas diafanizadas y se utilizaron dos tipos de tinción, safranina y azul de Toluidina. Además, mediante técnicas cromatográficas (CCF Y HPLC), se caracterizaron los metabolitos secundarios presentes en los tricomas. En las secciones transversales se determinó el tipo de vena media, se describió y midió el ancho del mesofilo y del parénquima en empalizada, así como el grosor de las cutículas. En las transparencias se describió la arquitectura foliar, también se obtuvo la densidad de tricomas por  $\text{mm}^2$ , frecuencia de tricomas estrellados con diverso número de brazos que lo conforman, longitud de los brazos, densidad de areolas por  $\text{mm}^2$ . Se realizaron análisis estadísticos de correspondencia, CANDIS y DISCRIM, además

de correlaciones de Spearman para los datos fitoquímicos. En total, se describió la ontogenia de seis tipos de tricomas, solo uno de ellos unicelular; la ontogenia reveló que todos los tricomas inician su desarrollo a partir de una célula protodérmica y los tricomas multicelulares se distinguen por el tipo y el número de divisiones de la célula protodérmica que les da origen. Se encontraron dos tipos más de tricomas glandulares que los registrados en otros estudios para *Tilia* y no se observaron estadios transicionales entre los distintos tipos de tricomas, lo que permitirá una codificación rigurosa de los mismos en futuros estudios filogenéticos. Para la anatomía foliar, se describió un tipo más de vena media y se observó que algunos tipos pueden tener variaciones como la presencia de fibras gelatinosas; se identificaron cinco tipos y, el arreglo tipo tres se encuentra únicamente en individuos del estado de Tamaulipas. Los tricomas estrellados son los que presentan mayor variación, con cuatro hasta doce brazos, siendo los de ocho brazos los más abundantes. Los fitoquímicos identificados fueron principalmente flavonoides (apigenina, rutina, florizidina, mirecetina, quercetina, naringenina, floretina y galangina), además de terpenos (carnosol, ácido ursólico, stigmasterol, ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -citosterol) y éstos presentaron diferencias entre sitios de colecta. Con base en los análisis estadísticos, se reconocen al menos dos grupos que se distribuyen en el territorio mexicano, y se propone que los individuos del grupo del Golfo sean tratados como *Tilia mexicana* y aquéllos que se distribuyen en el resto del país se traten como *Tilia occidentalis*.

## ABSTRACT

Trichomes are epidermal appendages that are frequently used in the taxonomy of some groups of plants. The genus *Tilia* belongs to the Malvaceae family and the number of species distributed in Mexico is controversial; based on the morphological characteristics of the leaf, 1 to 15 species have been proposed. The purpose of this work is to find characters that can support or refute the different proposals by describing the diversity of trichomes as well as the anatomy, foliar architecture and secondary metabolites. Harvests of mature leaves as well as vegetative buds were made in nine states of the Mexican Republic; the leaves of the vegetative buds were included in glycol methacrylate to obtain fine sections that were stained with Cresyl violet and still others were prepared for SEM. Through the observations made by light microscopy and SEM, the ontogeny of the trichomes was described. From mature leaves, inclusions were made in paraffin to obtain cross sections and were stained with Fast green-Safranin, diaphanized leaves were also prepared and two types of staining, Safranin and Toluidine blue were used. In addition, secondary metabolites present in trichomes were characterized by chromatographic techniques (TLC and HPLC). In cross sections, the mean vein type was determined, the width of the mesophyll and palisade parenchyma were described and measured, as well as the thickness of the cuticles. In the transparencies the leaf architecture was described, the density of trichomes per mm<sup>2</sup>, frequency of trichomes by number of arms, length of the arms, density of areolas per mm<sup>2</sup>. Statistical correspondence analysis, CANDIS and DISCRIM were performed, as well as Spearman correlations for phytochemicals. In total the ontogeny of six types of trichomes was described, only one of them is unicellular; ontogeny revealed that all trichomes start their development from a protoderm cell and the multicellular trichomes are distinguished

by the type and number of divisions of the protoderm cell that gives them origin. Two more types of glandular trichomes were found than those registered in other studies for *Tilia* and no transitional stages were observed between the different types of trichomes, which will allow a rigorous coding of them in future phylogenetic studies. For leaf anatomy, one more type of middle vein was described and it was observed that some types may have variations such as the presence of gelatinous fibers; it was identified that the type 3 arrangement is found only in individuals from the state of Tamaulipas. Stellate trichomes are the ones with the greatest variation, with four to twelve arms, with eight arms being the most abundant. The phytochemicals identified were mainly flavonoids (apigenin, rutin, florizidin, mirecetin, quercetin, naringenin, floretin and galangin) as well as terpenes (carnosol, ursolic acid, stigmasterol, oleanolic acid,  $\alpha$ -amyrin and  $\beta$ -cytosterol) and these presented differences between collection sites. Based on the statistical analyzes, we recognize at least two groups that are distributed in the Mexican territory, and it is proposed that the individuals that are recognized as the Gulf group be treated as Mexican *Tilia* and those that are distributed in the rest of the country treat like *Tilia occidentalis*.

## INTRODUCCIÓN

Los tricomas son apéndices epidérmicos especializados, cuyas funciones se relacionan con la defensa contra herbívoros y diversos patógenos, así como con la fotoprotección (Agati *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Levin, 1973). Por ello, el estudio de las características de los tricomas permite conocer el papel que desempeñan en varios aspectos de la adaptación fisiológica y ecológica de las plantas, así como en sus procesos evolutivos (Bickford, 2016; Nogueira *et al.*, 2013; Payne, 1978). También, los tricomas son uno de los atributos que frecuentemente se emplean en la taxonomía de numerosos grupos de plantas; más de 300 tipos de tricomas se han descrito para caracterizar su variación morfológica (Kolb y Müller, 2004). Debido a dicha diversidad, algunos autores han propuesto clasificarlos en dos grupos principales: glandulares y no glandulares (Inamdar *et al.*, 1983; Theobald *et al.*, 1980).

Además de los tricomas, otros caracteres anatómicos de las hojas, así como su arquitectura se han empleado en la sistemática vegetal. Caracteres micro-morfológicos o anatómico foliares han proporcionado evidencias para apoyar o refutar la ubicación de los individuos en su respectiva especie (Chalk, 1983; Dickison, 2000; Stuessy, 1990) o en la separación de ellas (Andrés-Hernández y Terrazas, 2006; Araujo-Silva *et al.*, 2010; Downing *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008). Por su parte, la arquitectura foliar fue utilizada por Hickey (1973) para designar la ubicación y la forma de los elementos que constituyen las características externas de la hoja, como el patrón de venación, configuración del margen, forma de la lámina y posición de las glándulas. En la mayoría de las hojas la venación está claramente diferenciada en órdenes. Las venas de un orden particular desarrollan un curso y

un modelo propio, distinto de los demás. Esto hace que el reconocimiento de órdenes de venación sea esencial al describir la arquitectura foliar. La descripción de las hojas no sólo se basa en caracteres cualitativos, sino también en los cuantitativos, como la relación largo/ancho de la lámina, los ángulos formados entre la vena primaria y las secundarias y de éstas con las terciarias, así como los ángulos establecidos por la base y el ápice (Ash *et al.*, 1999).

Otra característica que ha sido evaluada en diferentes grupos son los metabolitos secundarios, que por mostrar variación en la presencia y concentración de diversos compuestos se ha sugerido su uso como herramienta quimiotaxonómica a nivel de género y especie (Hickok, 1972; Medina-Medrano *et al.*, 2014). Estos metabolitos secundarios resultan de la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante proteínas especializadas (Cowan, 1999); entre los más importantes se encuentran los flavonoides; éstos están presentes en todo el reino vegetal, distribuyéndose en todos los órganos de las plantas. Marcano y Hasegawa (2002) afirman que la presencia de flavonoides en todos los órganos de la planta, le proporcionan ventajas fisiológicas y ecológicas, como el aroma para atraer insectos o repeler herbívoros. Las yemas en crecimiento de arbustos, las hojas jóvenes, los órganos reproductores y de dispersión y, en general, todas las partes en crecimiento anual, muestran una mayor concentración de metabolitos secundarios, o reactividad de éstos, que los tejidos viejos (Rhoades, 1979).

Con base en lo señalado, la finalidad de este trabajo es evaluar las características anatómicas, arquitectónicas y químicas de las hojas para encontrar caracteres que apoyen la delimitación de la o las especies del género *Tilia* que se distribuyen en México.

## **Género *Tilia***

El género *Tilia* L. de la subfamilia Tilioideae (Malvaceae) está representado por árboles caducifolios, tallos pubescentes con tricomas simples o estrellados, glabrescentes; estípulas deciduas, hojas alternas, largamente pecioladas, láminas ovadas, oblongo-lanceoladas o elípticas, ápice acuminado, base cordada, obtusa, truncada o cuneada, con frecuencia oblicua, margen aserrado o dentado-mucronado, 5-nervadas, papiráceas, glabras o pubescentes; inflorescencias terminales o axilares, en forma de cimas pedunculadas, dispuestas sobre una bráctea foliácea, oblonga o espatulada, reticulada, membranácea, pedúnculo adnado a la bráctea; flores hermafroditas, sépalos 5, libres, ligeramente cuculados en el botón, lanceolados a ovados, ápice acuminado, estrellado-pubescentes; pétalos 5, libres, glabros, blancos o amarillos; estambres numerosos, arreglados en grupos sobre el receptáculo, filamentos unidos en grupos en la base, separados cerca del ápice, cada uno con una antera dorsifija, estaminodios 5, petaloides, adnados a los estambres; gineceo 5-carpelar, 5-locular, pubescencia de pelos simples y estrellados, óvulos 2 por lóculo, placentación axilar, estigma 5-lobado; fruto en forma de nuez, indehiscente, 1-locular, globoso, densamente estrellado-pubescente; semillas 1 ó 2, obovoides, de color negro (Pérez-Cálix, 2009).

*Tilia* tiene aproximadamente 45 especies (Judd *et al.*, 2007) que se distribuyen exclusivamente en las zonas templadas del hemisferio norte, con 21 especies reconocidas para Europa y Asia, mientras que el número de especies para Norte América aún es indeterminado (Pigott, 2012). En México, *Tilia* se encuentra en el bosque mesófilo de montaña, entre los 770 y 2600 msnm desde Chihuahua hasta Oaxaca (Hardin, 1990).

## ANTECEDENTES

Diversos autores se han dado a la tarea de definir el número de especies del género *Tilia* presentes en México con base en sus características foliares. Bush (1929), utilizando las diferencias en el tamaño de la lámina, tipo de pubescencia y tipo de venación propuso que son 15 las especies que se distribuyen en el territorio mexicano. Más tarde, Jones (1968) reconoció para México únicamente a *Tilia mexicana* Schltld., utilizando el tipo y abundancia de la pubescencia en el envés de la lámina, enfatiza la presencia de tricomas estrellados de cuatro u ocho brazos, así como tricomas unicelulares. En 1990, Hardin reconoce a *Tilia americana* var. *mexicana* Schltld. con base exclusivamente en la morfología y combinación de cuatro tipos de tricomas (acicular, glandular, fasciculado y estrellado). Por su parte, Pigott (2012) considera que en México solo está presente *Tilia caroliniana* (Mill.) Castigl. con dos subespecies (*T. caroliniana* subsp. *floridana* (Small) E. Murray y *T. caroliniana* subsp. *occidentalis* (Rose) Pigott), las cuales pueden separarse por la presencia y abundancia de los tricomas estrellados que se distribuyen en la cara abaxial de la lámina de las ramas reproductivas. Este autor destacó que las características más importantes de los tricomas estrellados son el número de brazos y la longitud de éstos; y menciona además, que el color de la pubescencia puede ser distintiva, siendo usualmente blanca o café pálido para la subsp. *T. caroliniana* subsp. *floridana* y anaranjada o café-rojiza para *T. caroliniana* subsp. *Occidentalis*.

### **Tricomas: ontogenia y variación**

Caracterizar a los tricomas cuando han alcanzado un desarrollo completo, puede resultar complicado, por lo que los estudios ontogenéticos de éstos permiten validar la

presencia de algunos tipos en ciertos grupos vegetales (Ma *et al.*, 2016). Ejemplo de ello se observa en el trabajo de Inamdar (1967) quien confirmó la presencia de tricomas peltados en la familia Oleaceae realizada por Solereder (1908) y además distinguió tres tipos más de tricomas según el plano de división (anticlinal, periclinal, oblicua o irregular) de la célula inicial del escudo. Por su parte, Gama y colaboradores (2013) reconocen tricomas peltados en *Bignonia aequinoctialis* L. (Bignoniaceae), los cuales se desarrollan a partir de una célula protodérmica con divisiones periclinales que originan la célula del pedúnculo y la célula inicial de la cabeza. Varios autores han recalcado la importancia de la ontogenia de los tricomas con un enfoque evolutivo (Carlquist, 1961; Cowan, 1950). Ramayya (1972) propone una clasificación filogenética de los tricomas y reconoce cinco sistemas de desarrollo de los tricomas. Más tarde, Rao (1990) aclara la posición taxonómica de *Muntingia* L. (Muntingiaceae) con base en los sistemas de desarrollo tricomas propuesto por Ramayya (1972).

Las características morfológicas de los tricomas han tenido un papel importante en la sistemática de plantas a nivel de género (Hardin, 1979; Rajput *et al.*, 1985; Redonda-Martínez *et al.*, 2012) y especie (Celep *et al.*, 2014), como el trabajo realizado para las especies del género *Croton* L. (Euphorbiaceae) (Martínez-Gordillo y Espinosa-Matías, 2005).

En la familia Malvaceae es frecuente la presencia de tricomas glandulares y no glandulares, las características de éstos son consideradas útiles para establecer las relaciones dentro de la familia (Inamdar *et al.*, 1983; Ramayya y Rao, 1976; Shanmukha y Ramayya, 1987). En ocho especies del género *Pseudobombax* Dugand (subfamilia Bombacoideae) Carvahlo-Sobrihno y colaboradores (2009) encontraron que las diferencias cualitativas y cuantitativas de los dos tipos de tricomas presentes, resultaron de importancia taxonómica a

nivel de especie. También los tricomas resultaron ser útiles para diferenciar especies del género *Hibiscus* L. (Shahee *et al.*, 2009). Por su parte, Gual (1998) utilizó la forma, coloración y densidad de los tricomas como caracteres taxonómicos para delimitar especies en los géneros *Luehea* Willd., *Tilia* y *Trichospermum* Blume; Rendón-Carmona y colaboradores (2006) usaron, además de la abundancia, la longitud de los brazos de los tricomas estrellados para diferenciar las especies dentro del género *Mortoni dendron* Standl. & Steyerf.

### **Arquitectura foliar**

El patrón de venación ha sido especialmente importante en la identificación de algunos grupos a diferentes niveles jerárquicos de la clasificación (Andrés-Hernández *et al.*, 2012; Andrés-Hernández y Terrazas, 2009; Cervantes *et al.*, 2009; Hettterscheid y Hennipman, 1984; Hickey, 1979; Martínez-Cabrera *et al.*, 2007; Martínez-Millán y Cevallos, 2005; Pacheco-Trejo *et al.*, 2009; Tejero-Diez *et al.*, 2010). En el género *Quercus* L. la variación discreta del patrón de venación resultó útil para la distinción de algunas especies (Martínez-Cabrera *et al.*, 2003; Romero, 2000). Esta herramienta también fue útil para delimitar especies de los géneros *Byttneria* Loefl. y *Pterocymbium* R. Br. de la familia Malvaceae (Nurshahidah *et al.*, 2013).

### **Anatomía foliar**

Los trabajos de anatomía sistemática realizados para el orden Malvales lo definen como un grupo monofilético que comparte cavidades de mucílago en el mesofilo, un indumento de tricomas estrellados (Judd y Manchester, 1997) y estomas que suelen ser

anomocíticos y que se presentan en la superficie abaxial de la hoja (Metcalfe y Chalk, 1950). Sin embargo, existen trabajos en algunas especies de *Tilia*, que muestran que si bien, la estructura anatómica del género es distintiva y única en algunas características, su uniformidad no está generalizada entre especies (Pigott, 2012).

Hussin y colaboradores (1998) encontraron diferencias en el arreglo de los haces vasculares de la vena media y el pecíolo, los cuales fueron importantes para delimitar especies del género *Sterculia* L. Ramírez-Díaz (2016) describe para las tilias de México, seis tipos diferentes de vena media, considerando principalmente el arreglo del tejido vascular y la distribución del colénquima, de los contenidos minerales y de cavidades de mucílago.

## **Metabolitos secundarios**

Las plantas sintetizan una amplia variedad de metabolitos secundarios que juegan un papel importante en la supervivencia al protegerlas contra factores estresantes bióticos y abióticos; dichos compuestos están involucrados en la resistencia contra plagas y enfermedades, atracción de polinizadores y en la interacción con microorganismos simbióticos. Así también, ayudan en la protección contra la radiación ultravioleta, estrés hídrico, altas temperaturas, etc. (Wink, 2010).

Debido a que los flavonoides, su biosíntesis y acumulación, son estables dentro de las plantas y a que están bajo un control genético cercano, con independencia de factores ambientales (Harborne, 1966; Markham, 1989), algunos trabajos quimiotaxonómicos se han llevado a cabo en diferentes grupos de plantas. Ejemplo de esto es el trabajo realizado por Nahrstedt y Butterweck (1997) para el género *Hypericum* L. (Clusiaceae).

Estudios fitoquímicos previos indicaron que el género *Tilia* contiene altos niveles de flavonoides agliconas y glicosíladados (Zub, 1972). Toker *et al.* (2001) reportan la presencia de quercetina, kaempferol y rutina en las hojas de *Tilia argentea* Desf., *T. platyphyllus* Scop. y *T. rubra* DC. en diferentes concentraciones en cada una de ellas. Asimismo, en *Tilia americana* var. *mexicana* se han identificado principalmente glicósidos de kaempferol y quercetina, tales como canferitrina, isoquercitina, astragalina, quercitrina, rutina y tilirósido (Aguirre-Hernández *et al.*, 2010; Noguerón-Merino *et al.*, 2015).

Otro grupo importante de metabolitos secundarios son los terpenoides, que tienen funciones como hormonas (giberelinas), como atrayentes de polinizadores o como insecticidas (Harborne, 1993). En la familia Malvaceae, especies de algodón (*Gossypium* L.) presentan gossypol, un sesquiterpeno que resulta tóxico para los herbívoros cuando se rompe la cobertura cuticular de los tricomas glandulares permitiendo que los terpenoides secuestrados se volatilicen o exuden sobre la superficie de la planta y formen un revestimiento resinoso (Gershenzon *et al.*, 1991).

## **Variación**

Para realizar hipótesis sobre posibles patrones de variación genética, significado adaptativo de los caracteres específicos y las respuestas de plasticidad a gradientes ambientales, es fundamental la caracterización de la distribución geográfica de la variación fenotípica en poblaciones naturales (Bruschi *et al.*, 2003; Hedrick, 2006; Uribe-Salas *et al.*, 2008). Por ejemplo, en el género *Quercus* se han demostrado correlaciones significativas entre la variación en los caracteres foliares y los factores ambientales específicos (Cardillo y Bernal, 2006; Sisó *et al.*, 2001; Uribe-Salas *et al.*, 2008). Tales correlaciones ayudan a

entender cuáles son los factores ambientales que influyen en la fisiología y morfología de la planta. En general, se considera que la correlación entre la variación de los caracteres morfológicos y la variación ambiental es resultado de la plasticidad fenotípica o de la diferenciación genética adaptativa entre y dentro de poblaciones vegetales (Balaguer *et al.*, 2001; Bruschi *et al.*, 2003; Hovenden y Vander Schoor, 2006).

Es por eso que caracterizar la variación anatómica y química de las hojas de *Tilia* y buscar posibles correlaciones con los gradientes ambientales resulta importante para entender si las diferencias antes observadas de los caracteres foliares, como la distribución y abundancia de sus tricomas en la lámina asociadas al gradiente longitudinal (este – oeste) de su distribución (Ramírez-Díaz, 2016), se debe a la plasticidad fenotípica o a una diferenciación genética, la cual correspondería a las subespecies propuestas por Pigott (2012) para México.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la hoja y la diversidad de los tricomas presentes en diferentes poblaciones del género *Tilia* distribuido en la República Mexicana.

### **Objetivos particulares**

- Describir la ontogenia de los tricomas y corroborar los cuatro tipos descritos para la subespecie presente en México y evaluar la presencia de formas intermedias.
- Describir la arquitectura y anatomía foliar.
- Identificar los flavonoides y terpenos que se encuentran en los tricomas mediante técnicas cromatográficas.
- Comparar y evaluar las diferencias en la anatomía foliar.
- Comparar y evaluar las diferencias de los fitoquímicos presentes en los tricomas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **En campo**

Con el fin de tener representada la distribución más norteña y sureña, además la gran variación que se presenta en la Franja Volcánica Transmexicana, se seleccionaron poblaciones en los estados de Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y Tamaulipas para realizar el trabajo de campo. En estas poblaciones, se recolectaron hojas de ramas reproductivas de al menos tres individuos y se prensaron; conjuntamente se tomaron las coordenadas de colecta y la altitud, los ejemplares de respaldo fueron depositados en MEXU (Cuadro 1). Adicionalmente, de dos poblaciones, Tlanchinol, Hidalgo (20°59'16" N - 98°39'36" W) y Cuetzalan, Puebla (19°46'23" N - 97°38'36" W), se seleccionaron individuos para seguir el desarrollo de las hojas desde el estadio de yema, a partir de octubre del 2016 hasta la expansión de las hojas en marzo del 2017. En ambas poblaciones se recolectaron yemas vegetativas en diferentes estadios de desarrollo, se fijaron en CRAF II por 72 horas (Ruzin, 1999) por 72 horas, se lavaron y conservaron con etanol al 50%.

### **En laboratorio**

Antes de procesar las muestras, de cada hoja se obtuvieron las medidas de largo y ancho, y se generó una base de datos junto con los datos de colecta.

Ontogenia de los tricomas: Todas las yemas recolectadas se clasificaron en seis estadios de desarrollo según su tamaño; las hojas contenidas en cada yema se numeraron comenzando por la más externa.

Observaciones en microscopía de luz: microscopía de luz se emplearon yemas completas del estadio 1, así como 2 o 3 hojas de las yemas de los estadios 1 al 4, las cuales se incluyeron en glicol metacrilato y se cortaron a 4  $\mu\text{m}$  de grosor siguiendo la técnica de Zarlavzky (2014). También se realizaron cortes a mano alzada de hojas maduras y se tiñeron con Safranina-Verde rápido (Ruzin, 1999). Las preparaciones se revisaron con un microscopio óptico Olympus BX51 y se fotografiaron con el analizador de imágenes Image Pro Plus versión 6.01.

Observaciones en MEB: Se utilizaron hojas de las yemas de los estadios 2 a 4, así como hojas maduras. Se deshidrataron en una serie gradual de alcohol etílico (50-100%), llevadas al punto crítico y cubiertas con una película de oro en una ionizadora (Hitachi-S-2460N). Las fotografías de sus superficies adaxial y abaxial se realizaron en un microscopio Hitachi-S-2460N (15 Kv) en el Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Hojas diafanizadas (transparencias): Se siguieron dos métodos según el tipo de tinción requerida. (A) Las hojas se diafanizaron con NaOH 20% durante 72 horas. Después se aplicó una solución de NaCl 50% hasta que las hojas obtuvieron un color blanquecino o amarillo pálido y se hicieron tres lavados con agua corriente de 30 minutos cada uno. Se inició la deshidratación con una serie de etanol (50%, 70%, 96%) durante 24 horas cada uno. Al finalizar la deshidratación se dejaron en solución aclaradora (Martínez-Cabrera *et al.*, 2007) durante 20 días aproximadamente; se retiró la solución aclaradora y se hicieron tres lavados con etanol 96% durante 24 horas cada uno. Las hojas se tiñeron con Safranina durante 1 hora, se lavaron con etanol 100% hasta lograr un contraste adecuado entre el fondo y la nervadura y, enseguida, se hizo un cambio con xilol y se montaron con resina sintética.

(B) El procedimiento es similar al descrito anteriormente, pero se utilizó el NaOH 5% durante 24 horas, y después de lavar la solución aclaradora con etanol 96%, se inició una serie de rehidratación con etanol (96%, 75%, 50%) y agua, durante 24 horas cada uno. Las hojas se tiñeron con Azul de Toluidina 50% por un minuto, se hizo un lavado con agua y se montaron con gelatina glicerinada. Para describir el patrón de venación se siguió a Ash *et al.* (2009), se asignó el tipo de los tricomas de acuerdo a Hardin (1990) y el tipo de domacios de acuerdo a Wilkinson (1979).

Cortes en parafina: Los segmentos medios de la lámina con vena media se pasaron por NaOH 5% durante cinco minutos y se lavaron con agua corriente durante 30 minutos, se colocaron en canastillas y se mantuvieron en etanol 50% en agitación durante dos semanas, pasado el tiempo se colocaron en el procesador automático de tejidos Leica TR1020 para su deshidratación en alcohol butílico (Ruzin, 1999). Se incluyeron en parafina y se cortaron con micrótomo de rotación (Leica RM2125RT) a 12  $\mu\text{m}$  de espesor. Las secciones se montaron sobre portaobjetos con la técnica del adhesivo de Haupt (Johansen, 1940). Para desparafinar, las secciones permanecieron en la estufa durante 10 minutos, después se hicieron 3 cambios de xilol durante 5 minutos cada uno, seguido de una serie de etanol (50%, 70%, 96%) durante 5 minutos cada uno. La tinción se realizó con safranina-verde rápido (Ruzin, 1999) dejando las secciones en Safranina durante 1 hora, posteriormente enjuagando con una serie de agua, etanol 96% y etanol 100%. El Verde rápido se aplicó durante el tiempo de paso, inmediatamente después se lavaron con etanol 96%, un cambio de etanol 100% y dos cambios de xilol. Se montaron con resina sintética. La terminología para describir la lámina foliar y vena media fue la de Metcalfe y Chalk (1950).

Desprendimiento de tricomas: Los tricomas se desprendieron con una navaja sobre una hoja de papel y se almacenaron en tubos Eppendorf. La coloración de los tricomas se determinó bajo la luz del sol utilizando la escala de colores de Munsell para tejidos vegetales.

Identificación de los componentes metabólicos presentes en los tricomas: Para 10 poblaciones de la Faja Volcánica Transmexicana se obtuvo 1 mg de tricomas por el método de raspado con una navaja. Para la obtención de los extractos, los tricomas se sometieron a tres extracciones sucesivas de 12 horas cada una, utilizando tres disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol). El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida para la obtención de extractos crudos.

Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de los tricomas se identificaron por medio de cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron placas de sílica gel (Merck) de 10 x 4.5 cm de altura y 0.1 cm de grosor; las muestras de cada uno de los extractos se aplicaron en las placas de cromatografía y éstas se eluyeron en una cámara de vidrio con 5 mL de una mezcla hexano-acetato de etilo (9:1) para terpenoides y acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-acetona-agua (12:1:1:16:2) para flavonoides. Posteriormente, las placas se observaron con una lámpara de luz UV (onda corta 254 y onda larga 365 nm) y finalmente fueron reveladas con el reactivo de Anisaldehído para identificar terpenoides y el reactivo de Productos Naturales/Polietilenglicol (NP/PEG) para observar flavonoides. Ambos reactivos fueron preparados según Wagner et al. (2001).

Para la identificación de terpenos y flavonoides mediante HPLC, las muestras de tricomas se sometieron a extracciones con dos disolventes (hexano y metanol). Para la

obtención de los extractos de hexano, a cada una de las muestras se les agregó 0.5 mL de hexano, se sonicaron por 10 minutos, en seguida se colocaron en un agitador por 5 minutos y finalmente fueron centrifugadas por 5 minutos a 10,000 revoluciones por minuto. El sobrenadante se colocó en frascos para su análisis en el HPLC, posteriormente, al mismo material vegetal se le agregó 0.5 mL de metanol y se realizó el mismo procedimiento seguido para la obtención de los extractos de hexano.

La identificación y cuantificación de terpenos y flavonoides se realizó en un cromatógrafo marca Agilent serie 1100 equipado con un detector de luz ultravioleta y arreglo de diodos. Para el análisis de los extractos, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L y de los estándares se pesaron 5 mg, los cuales fueron disueltos en 1 mL de metanol grado HPLC; se eliminaron impurezas mediante acrodiscos con membrana de nylon con una apertura de poro de 0.45 $\mu$ m y se inyectaron 20  $\mu$ L de cada uno de ellos.

Para la identificación de terpenos se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula) con una fase móvil de acetonitrilo (A)-agua (B) (80:20), el flujo fue de 1 mL/min y una temperatura de 40 °C. El equipo se calibró a una longitud de onda de 215 y 220 nm, el tiempo de análisis fue de 21 minutos. Los terpenos de los extractos de hexano fueron identificados y cuantificados al compararlos con estándares adquiridos de los laboratorios Sigma-Aldrich, los cuales fueron carnosol, ácido ursólico, ácido oleanólico,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.

Para la identificación de los flavonoides, se utilizó una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula), con una fase móvil de acetonitrilo (A)-agua a pH de 2.5 con TFA (B), con el siguiente gradiente: 0-10 min, A:B

15:85; 20 min, A:B 35:65 y 25 min, A:B 35:65. El flujo fue de 1 mL/min y una temperatura de 30 °C. El equipo se calibró a las longitudes de onda de 360 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL y el tiempo de análisis para este método fue de 25 minutos. Para identificar los flavonoides presentes en los extractos se usaron estándares de apigenina, kaempferol, quercetina, mirecetina, luteolina, naringenina, floretina, florizidina, galangina y rutina (Sigma-Aldrich). La cuantificación de los componentes presentes se realizó mediante la elaboración curvas de calibración para cada uno de los estándares, las cuales fueron construidas inyectando cinco puntos desde 14.24 a 231 µg de cada compuesto. Las interpolaciones se hicieron con el programa ChemStation de Agilent Co. La variación del área en unidades de absorbancia de cada inyección fue utilizada para construir el modelo matemático de regresión lineal con la fórmula  $Y=mX+b$ , la cual se comparó posteriormente con los extractos y de esta manera se determinó la concentración de cada compuesto.

### **Variables cuantitativas y análisis estadísticos**

En las hojas diafanizadas, en cinco campos por individuo se cuantificó lo siguiente: el número de areolas por  $\text{mm}^2$ , el número de tricomas por  $\text{mm}^2$ , el número de brazos y la longitud de los tricomas estrellados: además se determinó el recorrido de las venas de tercer orden y se codificaron como convexas (1), rectas (2) y sinuosas (3). En las secciones transversales de la lámina foliar se cuantificó en cinco campos por individuo, el grosor de cutícula adaxial y abaxial, ancho total del mesofilo y ancho del parénquima en empalizada, además, se asignó el tipo de vena media (1 a 5). El nivel de coloración se codificó del 1 al 12, siendo el 12 sin coloración. Todas las variables se transformaron con algoritmo base 10 con la finalidad de normalizar su distribución y reducir las diferencias entre varianzas. A las

variables con valores de cero o muy bajos se les agregó una constante de 10 para eliminar en la transformación valores de cero.

Con los valores de concentraciones obtenidos de terpenos y flavonoides se realizaron correlaciones de Spearman con los parámetros de las variables ambientales y análisis de varianza del modelo general lineal para detectar diferencias entre las poblaciones.

Se realizó un análisis de correspondencia para evaluar cómo y cuáles variables ordenan a los individuos. También se realizó un análisis CANDIS para reconocer si existen los tres grupos asignados, dada la hipótesis de dos subespecies presentes en México de acuerdo a Pigott (2012). Por último, se aplicó el análisis DISCRI para conocer el porcentaje de individuos que se clasifican correctamente en sus grupos. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, 2004).

**Cuadro 1:** Ejemplares de respaldo.

Estado	Colector	No. de colecta	Coordenadas N/W	ID individuo	
Chihuahua	Medina Rodríguez	01 y 02	18°20'19.6" N 102°58'0.8" W	01 y 02	
Guanajuato	TT	1003, 1004	21°31'14" N 100°25'14.02" W	04 y 05	
Hidalgo	Martínez-Cabrera	341	20°59'16" N 98°39'36" W	39	
		342	20°59'18.01" N 98°39'35" W	33	
Jalisco	Ramírez-Díaz	041,042	23°58'02.8" N 99°27'45.1" W	08 y 09	
		043,044,045,046	19°14'29.3" N 104°29'39.8" W	13, 14, 15, 16	
		047	19°36'11.3" N 104°17'08" W	18	
	Revueltas-Hernández	001	19°14'29.3" N 104°39'27.7" W	06	
		002	19°14'29.3" N 104°29'39.8" W	07	
		003,004,005	19°36'31.3" N 104°18'21.9" W	10, 11, 12	
		006	19°33'58.1" N 104°15'03.2" W	17	
		007	19°33'42.6" N 104°14'31.7" W	19	
	Michoacán	Aguirre-Hernández		19°27'49.06" N 101°36'36.8" W	20
				19°38'30.2" N 101°15'25.9" W	21,22,23, 24
			18°38'22.57" N 101°15'22.57" W	25 y 26	
Morelos	Basurto-Peña		18°58'26.4" N 99°16'26.1" W	27	
			19°00'23.5" N 99°13'38.1" W	28,29,30,31, 32	
Oaxaca	Pacheco-Cortés	185	17°19'37.5" N 96°26'48.3" W	35	
		184	17°20'20.7" N 96°30'02.6" W	34	
	R. Ríos G y J. Gutiérrez G.	1635-A	17° 08' 92"N 97° 50' 85"W	36, 37, 38	
Puebla	Ramírez-Díaz	012,013	19°46'23" N 97°38'36" W	03	
Tamaulipas	Ramírez-Díaz	014,015,016,017,018	22°03'03" N 99°14'31.4" W	40,42,43,44, 45	
		022	23°02'58.9" N 99°14'43.1" W	47	
		024,025,026	22°02'47.6" N 99°14'48" W	46, 48,49	
		030,031,032	23°58'02.8" N - 99°27'45.1" W	50,51 y 52	

## **RESULTADOS**

### **Tricomas: ontogenia y diversidad**

#### **Ontogenia de los tricomas**

La yema del estadio uno alcanza un máximo de 5 mm de largo, está cubierta por brácteas de color café oscuro y contiene cuatro láminas foliares bien definidas cada una de ellas con una bráctea de textura delgada, siendo la lámina foliar más pequeña de 1.1 mm. En este estadio (1) la yema pasa todo el invierno (Figura 1A). Una vez que se inicia el crecimiento de las yemas éstas se hinchan e incrementa su tamaño, separándose las brácteas de color café y exponiendo las brácteas de textura más delgada y de color café claro (Figura 1B-E) hasta que las láminas foliares son expuestas (Figura 1F). En las yemas, las brácteas se distinguen por sus abundantes tricomas aciculares; la superficie abaxial de las láminas está completamente cubierta por tricomas en diferentes estados de desarrollo, excepto en los dientes en formación; mientras que la superficie adaxial presenta escasos tricomas sobre las venas (Figura 2A-D). A nivel de meristemo, los primordios foliares tienen protodermis con divisiones anticlinales abundantes, algunas células ya diferenciándose en tricomas aciculares, éstos escasos (Figura 2E), en mesofilo hay dos estratos e inicia la diferenciación del tejido vascular en la vena media (Figura 2F). En hojas de 700  $\mu\text{m}$  o más, vena media ya está diferenciada y la lámina continúa su elongación, se inicia la diferenciación de las venas secundarias, el mesofilo presenta tres estratos y en la superficie abaxial mayor abundancia de tricomas en diferentes estados de desarrollo (Figura 2G). En hojas más desarrolladas (> 700  $\mu\text{m}$ ) se aprecia en la superficie abaxial mayor abundancia de todos los tipos de tricomas (Figura 2H) en especial los glandulares y aciculares sobre las venas. La lámina conserva el mesofilo de tres estratos, tanto la vena media como las secundarias han completado su

desarrollo, los elementos traqueales son funcionales; se aprecian venas de órdenes mayores diferenciadas y asociada a éstas la epidermis con tricomas (Figura 2I). Se siguen conservando pocos tricomas en la cara adaxial. Una vez que la lámina se libera de las escamas de la yema se expande rápidamente alcanzado su tamaño (Figura 2J) y es cuando los tricomas estrellados son más abundantes formando junto con los aciculares una red intrincada que no permite ver la superficie abaxial. A continuación se describe la ontogenia para cada uno de los tricomas.

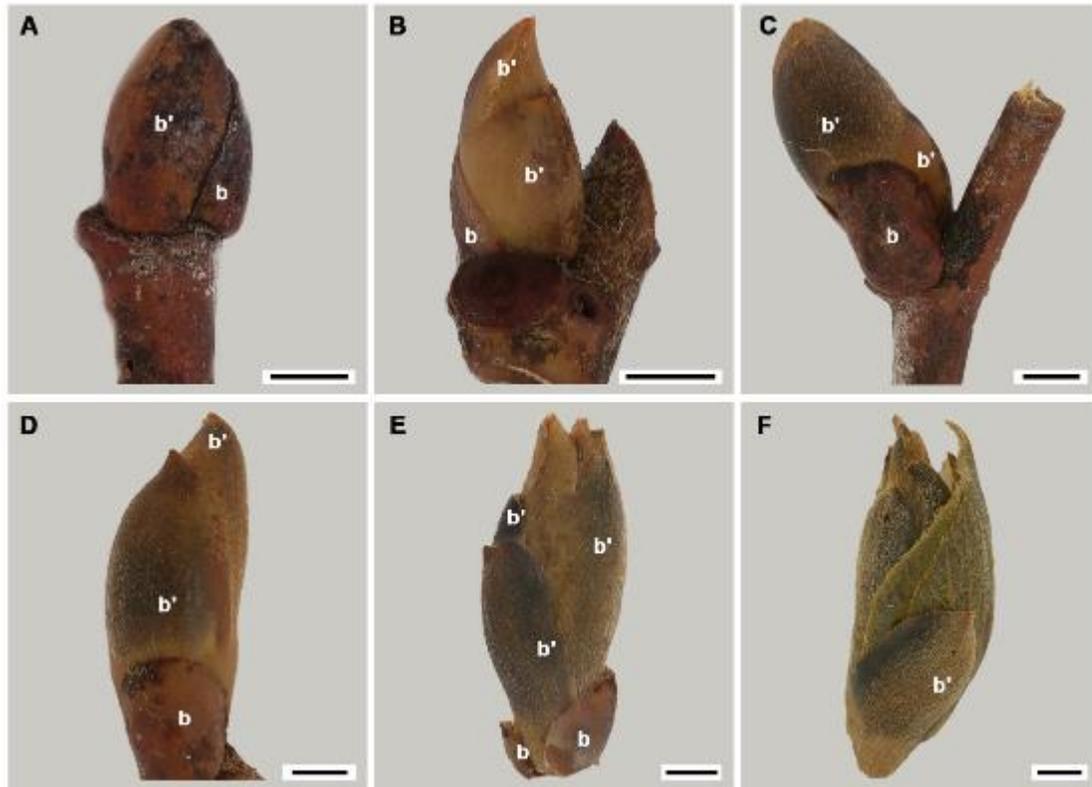
Tricomas aciculares: inician su desarrollo con el alargamiento de una célula protodérmica que multiplica su tamaño hasta cinco veces y posteriormente agudiza su parte apical (Figura 3A-D), no se aprecia ningún contenido en su lumen celular y con la madurez de la hoja muchos se caen.

Tricomas fasciculados: se desarrollan a partir de una división anticlinal de una célula protodérmica, presentando dos o más divisiones anticlinales sucesivas. Cada una de las células resultantes se alargan y agudizan diferencialmente (Figura 4A-F), manteniéndose erguidos; las células que se encuentran alrededor se elevan para formar una especie de anillo alrededor de la base (Figura 4G).

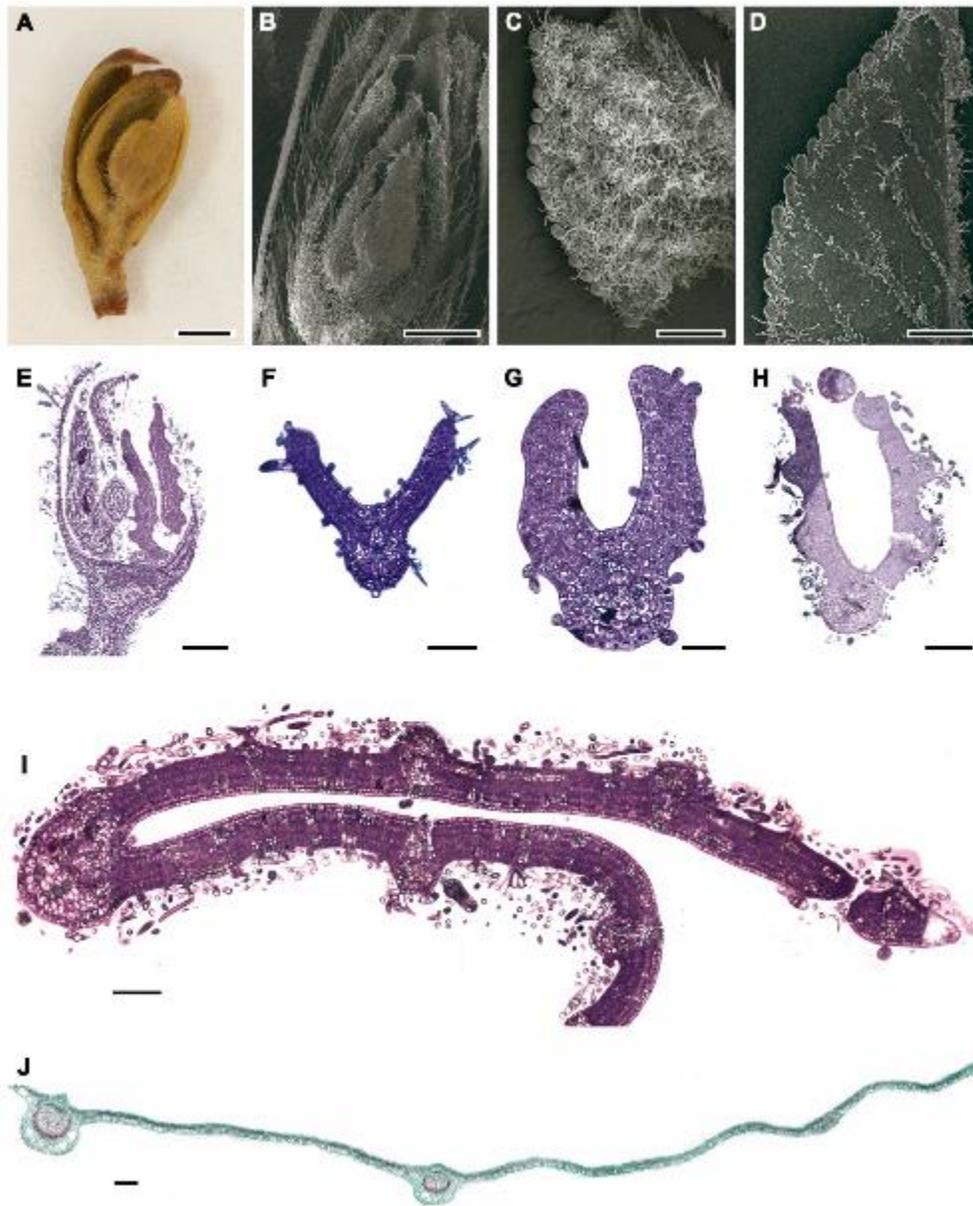
Tricomas estrellados: su formación inicia con divisiones anticlinales de una célula protodérmica, el número de divisiones determina el número de brazos que conforman al tricoma (Figura 5A-C), que en superficie se aprecian como apéndices lobulados (Figura 5F). Más tarde cada una de estas células se alarga diferencialmente en forma paralela a la superficie epidérmica y agudiza su ápice, quedando los brazos postrados sobre la lámina

(Figura 5D-G); cuando la lámina se expande estos tricomas cubren la región entre las venas (Figura 5G).

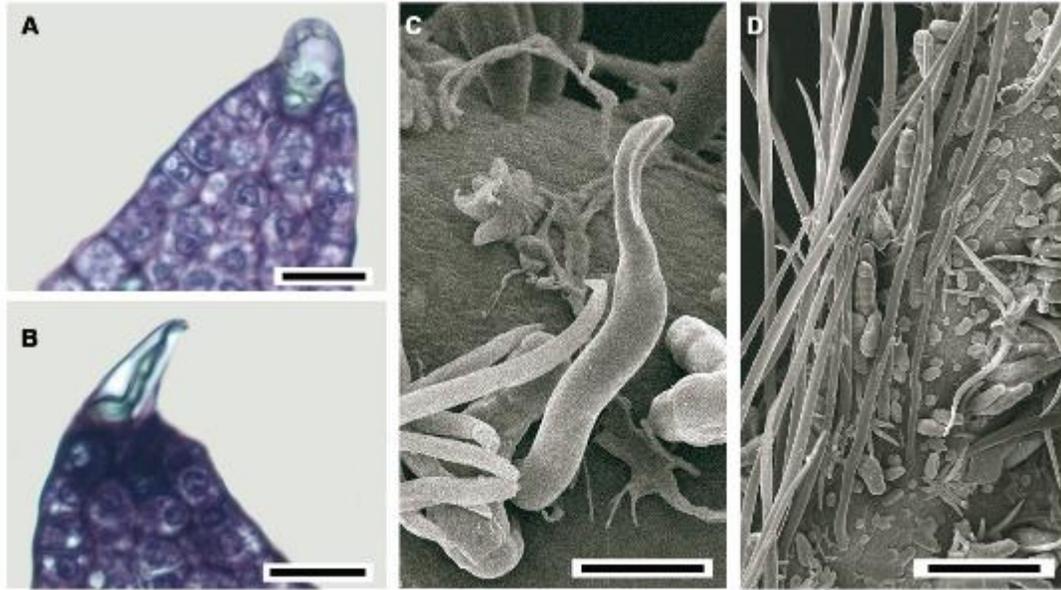
Tricomas glandulares: se encontraron tres tipos de tricomas glandulares, en todos los casos su desarrollo inicia con una célula protodérmica que se alarga y sobresale de las células que la rodean y enseguida se divide periclinalmente (Figura 6A, B). El número de divisiones determina el tipo de tricoma glandular. En el tricoma glandular bulboso, las células del pie pueden ser tres, mientras que las dos células superiores se dividen de forma anticlinal, finalmente, las cuatro células resultantes se ensanchan (Figura 6C). En el tricoma glandular en forma de botella, la célula epidérmica inicial se divide periclinalmente una vez, la célula apical se divide también periclinalmente hasta formar ocho células, mientras la célula basal se alarga; las dos células centrales se dividen anticlinalmente originando cuatro células que se enchanchan, al mismo tiempo la célula apical se divide anticlinalmente y las células resultantes se redondean (Figura 6D, F). En el tricoma glandular largo, la célula inicial se divide periclinalmente para formar una columna de hasta once células y cuando alcanza dicho número de divisiones, la célula apical se redondea (Figura 6E, G).



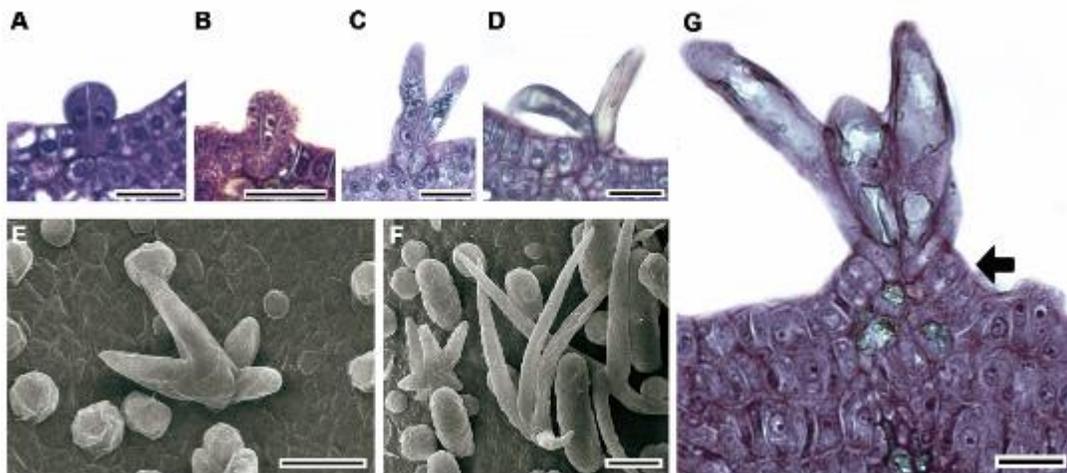
**Figura 1:** Yemas de diferentes estadios. **A)** Yema con brácteas de protección de invierno (**b**). **B-E)** Yemas en crecimiento, exposición de las brácteas internas (**b'**). **F)** Yema madura, exposición de láminas foliares. Barra es 2 mm en **A-D**; 3 mm en **E, F**.



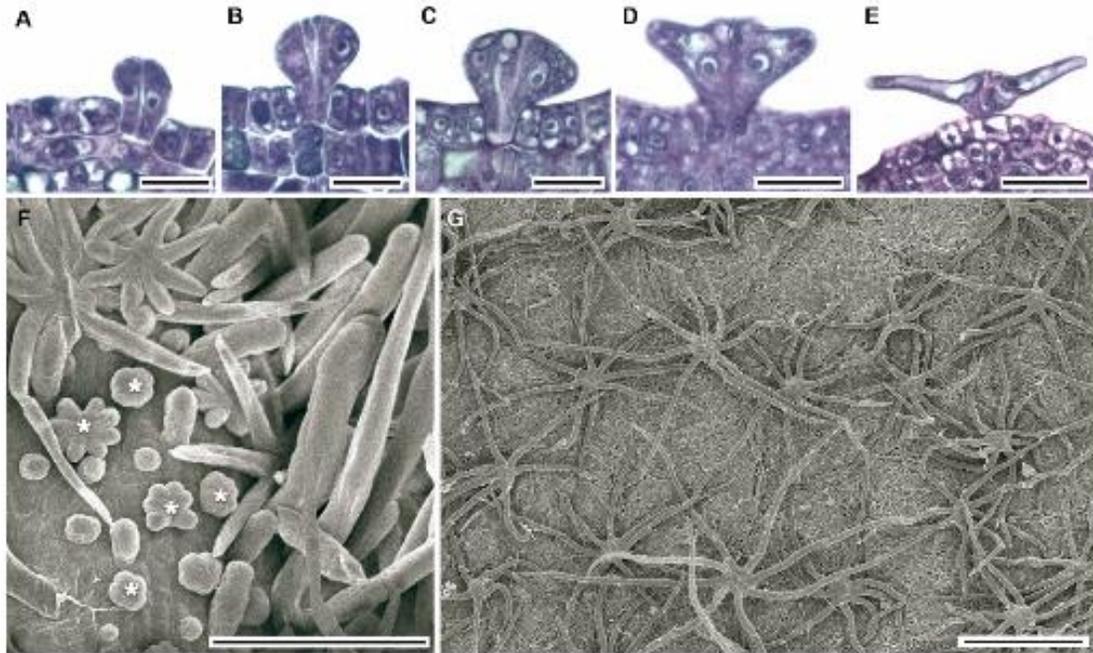
**Figura 2:** Desarrollo de la lámina foliar en la yema y lámina foliar expandida. **A)** Sección longitudinal de una yema. **B)** Yema con brácteas cubiertas de tricomas aciculares. **C)** Superficie abaxial de la lámina con tricomas en diferentes etapas de desarrollo. **D)** Superficie adaxial de la lámina con tricomas sobre las venas y el margen. **E-I)** Secciones transversales. **E)** Meristemo con primordios foliares y células epidérmicas diferenciándose en tricomas. **F)** Primordio foliar con vena media diferenciada y tricomas escasos. **G)** Diferenciación de venas secundarias. **H-I)** Láminas con superficie abaxial y abundantes tricomas asociados a los haces vasculares y las regiones intercostales. **J)** Sección transversal, lámina expandida. Barra es 2 mm en **A**; 1 mm en **B**; 500  $\mu\text{m}$  en **C-D**; 300  $\mu\text{m}$  en **E, H**; 100  $\mu\text{m}$  en **F, I, J**; 50  $\mu\text{m}$  en **G**.



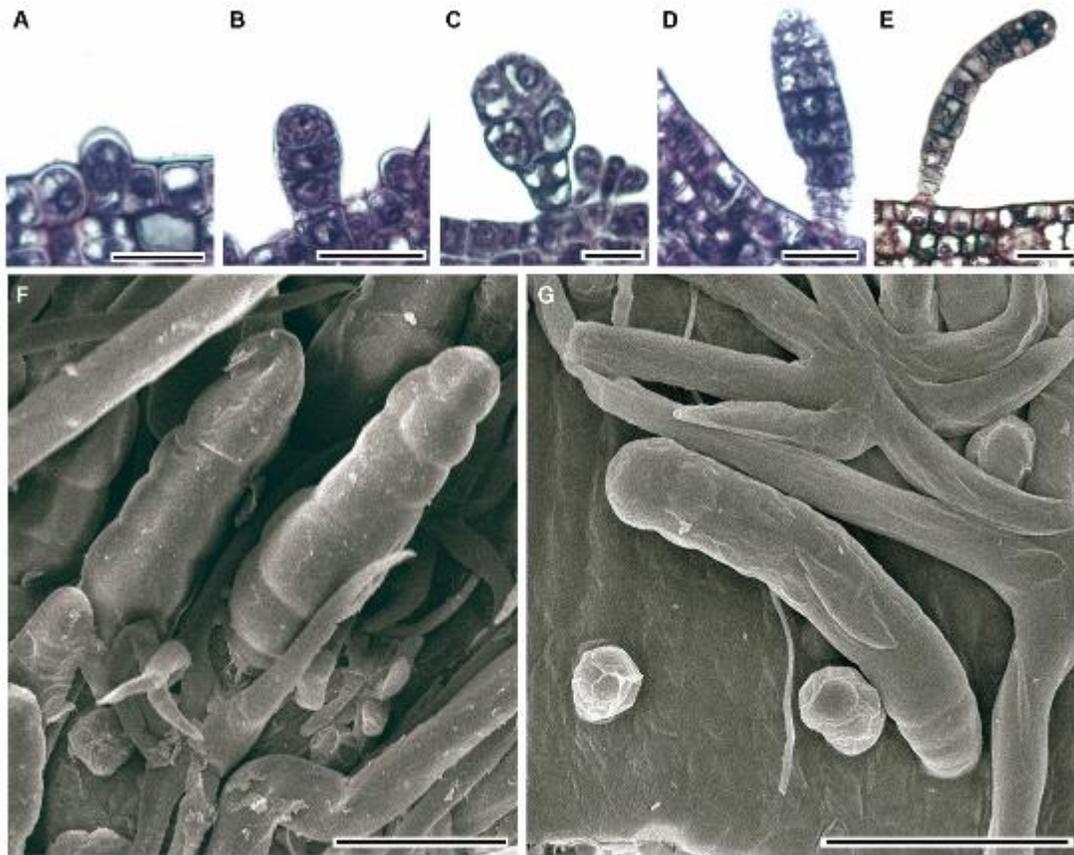
**Figura 3:** Ontogenia de los tricomas aciculares. **A-B)** Secciones transversales de lámina foliar **A)** Célula protodérmica inicia su alargamiento. **B)** La célula agudiza su ápice y se alarga. **C-D)** Tricomas aciculares maduros sobre la vena media. Barra es 20  $\mu\text{m}$  en **A-B**; 50  $\mu\text{m}$  en **C**; 300  $\mu\text{m}$  en **D**.



**Figura 4:** Ontogenia de los tricomas fasciculares. **A-D, G)** Secciones transversales. **A-B)** Divisiones anticlinales de la célula protodérmica. **C- D)** Brazos alargándose y permaneciendo erectos sobre la lámina. **E-F)** Crecimiento diferencial de los brazos. **G)** Células protodérmicas que rodean al tricoma que se levantan y forman anillo alrededor de la base del tricoma. Barra es 50  $\mu\text{m}$  en **A-D**; 25  $\mu\text{m}$  en **E-F**; 20  $\mu\text{m}$  en **G**.



**Figura 5:** Ontogenia de los tricomas estrellados. **A-D)** Secciones transversales. **A-B)** Divisiones anticlinales de la célula protodérmica. **C-F)** Alargamiento lateral de los brazos. **F)** Tricomas estrellados en diferentes estadios de desarrollo (**asteriscos**). **G)** Tricomas estrellados completamente expandidos con los brazos postrados sobre la lámina cubierta de ceras. Barra es 20  $\mu\text{m}$  en **A-C**; 50  $\mu\text{m}$  en **D**; 100  $\mu\text{m}$  en **E-F**; 150  $\mu\text{m}$  en **G**.



**Figura 6:** Ontogenia de los tricomas glandulares. **A-E)** Secciones transversales. **A)** Célula protodérmica papilosa. **B)** Primeras divisiones periclinales. **C)** Tricoma glandular bulboso. **D y F)** Tricoma glandular en forma de botella. **E y G)** Tricoma glandular largo. Barra es 20  $\mu\text{m}$  en **A, C-D**; 50  $\mu\text{m}$  en **B, E-G**.

## **Diversidad de los tricomas**

En las hojas maduras se identificaron tricomas aciculares, glandulares bulbosos y glandulares largos, fasciculados y estrellados. Los tricomas aciculares se diferenciaron en dos grupos según su longitud y distribución, los largos miden  $802.66 \pm 103.42 \mu\text{m}$  y se localizan sobre la vena principal; los cortos tienen una longitud de  $342.89 \pm 49.94 \mu\text{m}$  y están presentes principalmente en el margen de las hojas, en algunos casos sobre la lámina.

Los tricomas glandulares bulbosos miden  $53.55 \pm 18.99 \mu\text{m}$  de largo, siempre están presentes, se localizan sobre las venas o a un costado de éstas, pero en su mayoría colapsados; mientras que los glandulares largos son muy escasos y se encuentran siempre colapsados sobre las venas. Por su parte, los tricomas fasciculados pueden tener de dos a ocho brazos, siendo los más comunes los de cuatro brazos, con  $456.14 \pm 42.50 \mu\text{m}$  de longitud, se localizan principalmente formando los domacios en las axilas de la vena principal con las venas secundarias, también sobre las venas y algunas veces sobre la lámina.

Los tricomas estrellados son los más diversos, presentan de cuatro hasta doce brazos, siendo los de ocho brazos los más comunes y los de doce brazos muy extraños. Los tricomas de doce y diez brazos se encontraron exclusivamente en individuos de Cuetzalan, Puebla, pero resultaron ser muy escasos. La longitud de los brazos es variable (Cuadro 2) y se localizan sobre toda la lámina y sobre las venas.

Se encontraron diferencias entre las descripciones realizadas por Hardin (1990), Pigott (2012) y las de este trabajo para los diversos tipos de tricomas así como para su distribución en la hoja (Cuadro 3).

**Cuadro 2:** Principales características de los tricomas estrellados. Número de brazos (moda) y longitud (media y desviación estándar) de los brazos.

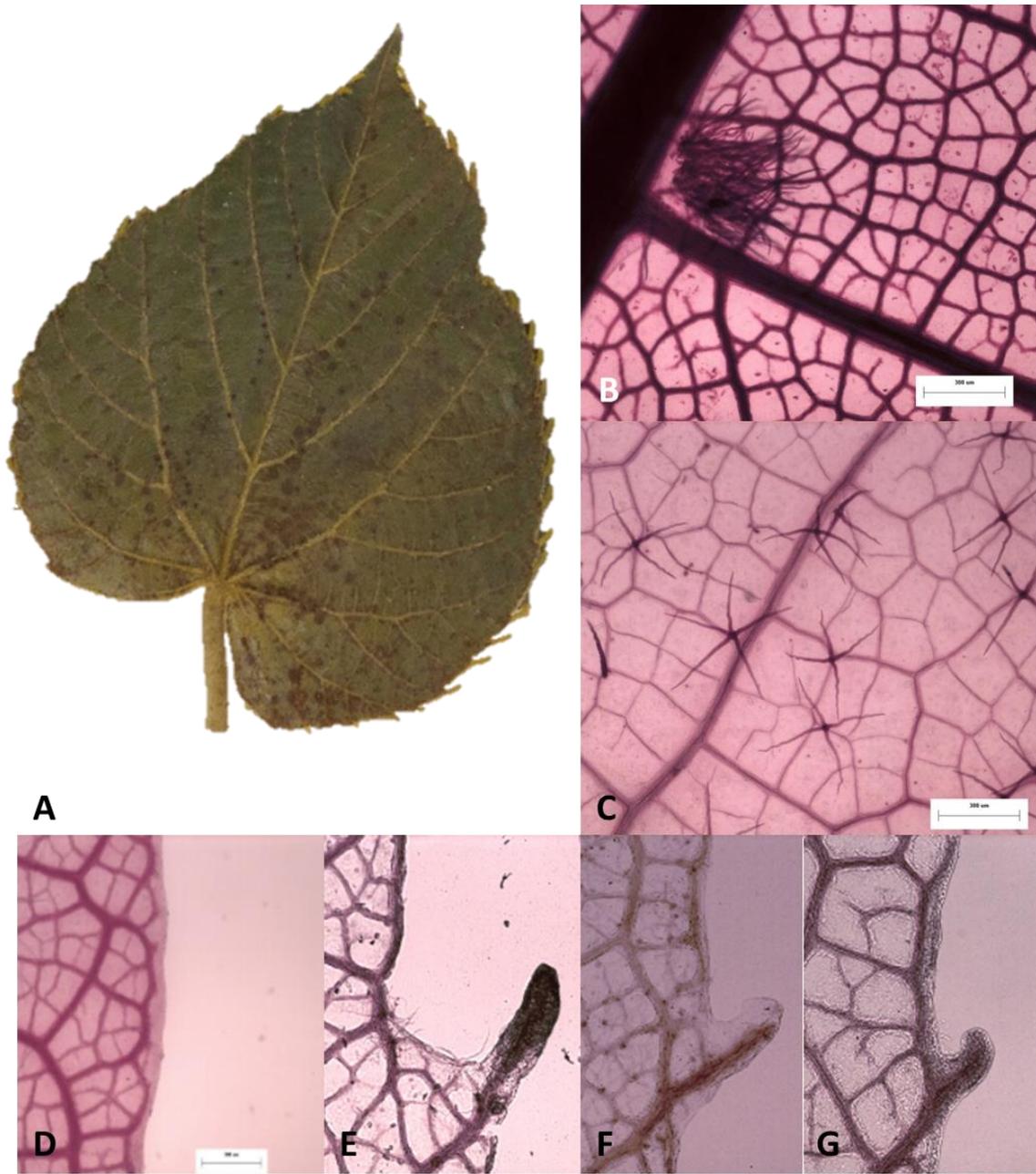
<b>Número de brazos</b>	<b>Longitud de los brazos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>4</b>	333.88 $\pm$ 103.93
<b>5</b>	328.23 $\pm$ 101.28
<b>6</b>	300.49 $\pm$ 70.88
<b>7</b>	321.16 $\pm$ 76.82
<b>8</b>	320.42 $\pm$ 118.49

**Cuadro 3:** Comparación de las diferentes descripciones realizadas para los tipos de tricomas encontrados en el género *Tilia*.

<b>Tipo de tricoma</b>	<b>Hardin (1990)</b>	<b>Pigott (2012)</b>	<b>Ramírez-Díaz (2018)</b>
<b>Glandular</b>	Llamado glandular bulboso. De 30 a 110 $\mu\text{m}$ de largo, multicelular, uniseriado con la punta hinchada, ya sea corto o alargado. Los más largos generalmente presentes sobre las venas principales.	Llamado fusiforme o clavado, no da descripción y no diferencia a glandulares largos	De 35 a 90 $\mu\text{m}$ , multicelulares, generalmente cuatro células. Células apicales se ensanchan. Presentes sobre las venas o a sus costados. Son glandular largo y glandular en forma de botella
<b>Acicular</b>	Unicelular liso, más o menos liso, cónico en un punto. Dos grupos: a) acicular corto: 0.30 a 0.40 mm de largo, a menudo dispersos en ambas superficies y siempre asociados a venas primarias u órdenes superiores; b) acicular largo: 0.5-1.3 mm de largo, se encuentran en la superficie abaxial a lo largo de la vena media y venas secundarias.	Simples, unicelulares, relativamente grandes, o pequeños y oscuros marrón o marrón rojizo. Multicelular claviforme, generalmente escasos, restringido a las partes inferiores de las venas primarias	Unicelulares lisos con ápice agudo. a) largos de 0.7-1.0 mm, sobre las venas, abundantes en hojas en desarrollo. b) cortos de 300 a 400 $\mu\text{m}$ , presentes en la lámina y en el margen.
<b>Estrellado</b>	Multicelular, con los brazos más o menos paralelos a la lámina; cada brazo de 150 a 350 $\mu\text{m}$ de largo. Presentes en ambas caras, con mayor frecuencia en la abaxial.	Multicelular, con 3-16 brazos que se doblan abruptamente casi en la base, de modo que sobresalen desde un pedicelo corto formado por sus bases unidas. La base puede ser tubular y secretar mucílago.	Multicelulares, con 2 a 8 brazos alargados, postrados y con ápice agudo, cada brazo de 65 a 450 $\mu\text{m}$ . Presentes en la cara abaxial de la hoja.
<b>Fasciculado</b>	Multiseriado, 2-6 brazos en posición más o menos erecta, cada brazo de 200 a 500 $\mu\text{m}$ de largo, presentes en las axilas de las venas, dispersos en las venas, a lo largo de toda la lámina con mayor frecuencia en la cara abaxial. Además, estipitados de los brazos y con frecuencia tienen un anillo basal.	Con 2-10 brazos unicelulares, rectos o curvados formando un penacho.	Multicelulares, con 2 a 8 brazos alargados, erectos y con ápice agudo, de 150 a 400 $\mu\text{m}$ de largo. Sobre la lámina y formando el domacio. Con estípites y un anillo de células epidérmicas alrededor de la base.

## **Arquitectura foliar**

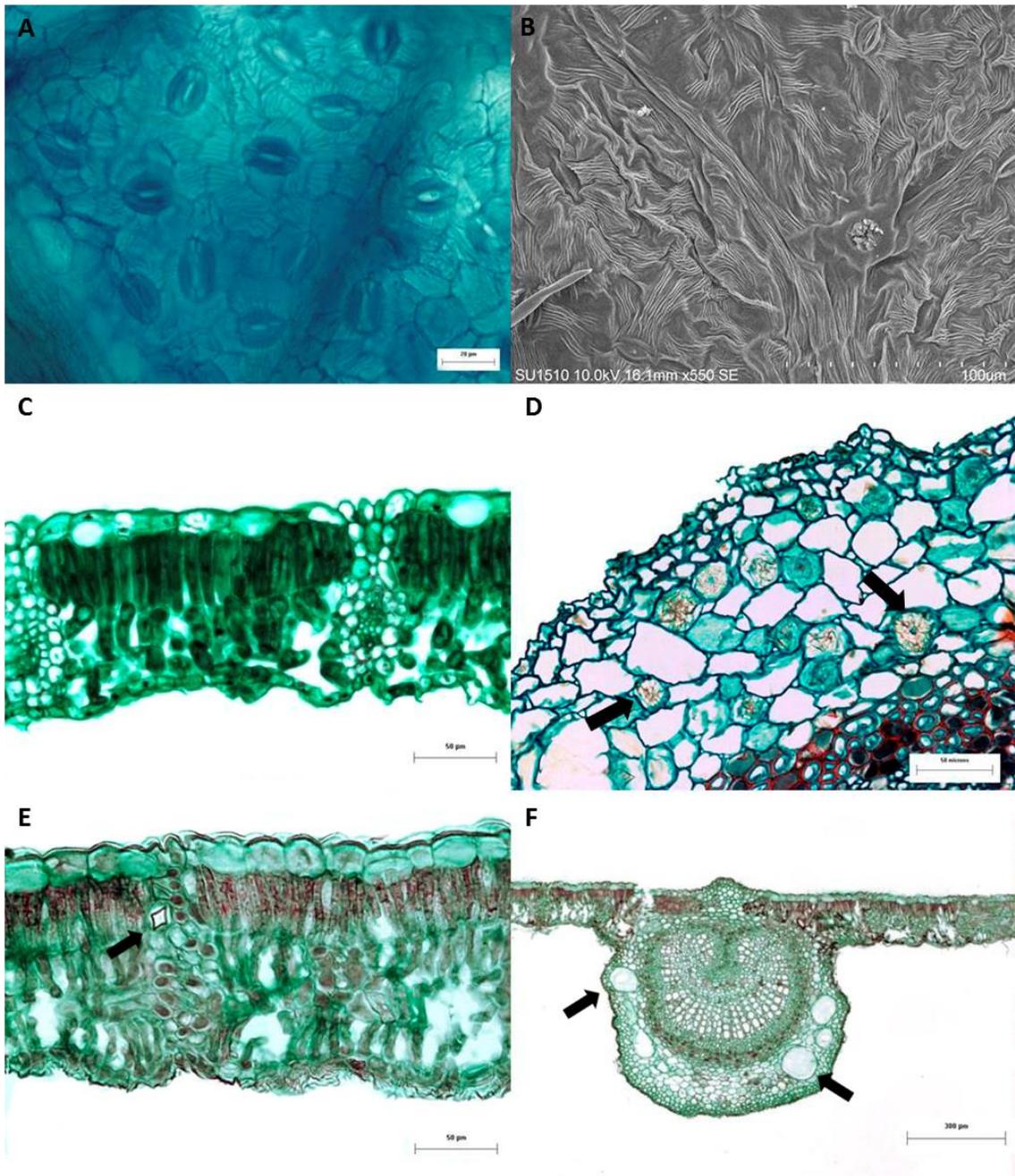
La hoja es simple peciolada (Figura 7A). La lámina es entera, asimétrica, de 3.9 a 35.1 cm de largo y de 1.1 a 33.2 cm de ancho, con el ápice acuminado y base cordada con un ángulo reflexo, o bien cuneada u obtusa. El margen es serrado con ángulo agudo, con 1 a 3 dientes por centímetro linear, con dientes de primer y segundo orden, éstos tienen el flanco distal cóncavo y flanco proximal flexo o convexo con venas de primer a cuarto orden (Figura 7E-G). Textura cartácea, la cara adaxial glabra o pubescente sobre las venas, cara abaxial pubescente. Los domacios se encuentran en la unión de las venas secundarias a la vena primaria central (Figura 7B), son del tipo mechón de tricomas. Venación actinódroma basal con una vena central y 2 o 4 pares de venas primarias. La vena primaria central tiene un recorrido recto ramificado, terminando en el ápice del diente. Las venas secundarias excurrentes con un ángulo de divergencia angosto, grosor relativo moderado y recorrido recto. Las venas terciarias percurrentes rectas, sinuosas o convexas, con ángulo agudo respecto a la vena primaria, el curso de las venas terciarias exteriores variable. Las venas cuaternarias alternadas recurrentes. Las venas agrofíticas compuestas presentes. Las venas de quinto orden formando un reticulado irregular. Las areolas bien desarrolladas (Figura 7C), las vénulas en su mayoría simples o ramificadas una vez. La venación marginal cerrada, serpenteada (Figura 7D). Se observaron cristales prismáticos a lo largo de las venas.



**Figura 7:** Detalles de la arquitectura foliar general. **A)** Hoja entera. **B)** Domacio tipo mechón de tricomas. **C)** Areolas bien desarrolladas, algunas con vénulas. Se observan tricomas estrellados y aciculares. **D)** Venación marginal cerrada. **E-G)** Diente con flanco distal cóncavo y flanco proximal convexo.

## **Anatomía foliar**

Superficialmente, las células epidérmicas son poligonales con las paredes anticlinales rectas y a nivel, mientras que las periclinales son planas y con el microrelieve estriado en las células asociadas a los estomas (Figura 8A y B). Los estomas son del tipo anomocíticos. Los cinco tipos de tricomas presentes en las láminas maduras se describieron en la sección diversidad de tricomas. Transversalmente, en la superficie adaxial y abaxial se presenta una cutícula lisa, a veces estriada en la cara abaxial que varía en grosor entre ambas superficies (adaxial  $1.4 \pm 0.53 \mu\text{m}$ , abaxial  $0.99 \pm 0.39 \mu\text{m}$ ) (Figura 8B). La epidermis es monoestratificada, de células generalmente cuadradas; los estomas se ubican, en su mayoría, a nivel de las otras células epidérmicas, en pocos ejemplares se observaron elevados. El mesofilo ( $51.15 \pm 27.08 \mu\text{m}$ ) en la mayoría, es dorsiventral con el parénquima en empalizada en el extremo adaxial de la hoja, formado por uno o dos estratos de células, el parénquima esponjoso se ubica en el extremo abaxial con dos o tres estratos celulares de forma variable, generalmente laxo y amplio (Figura 8C); a excepción de algunos individuos que presentan mesofilo en empalizada isolateral. Los haces vasculares en el mesofilo se conforman por pocas células de xilema y de floema, con vaina que las rodea completamente y que se lignifica conforme la lámina madura (Figura E). Las inclusiones minerales son del tipo drusa en el parénquima esponjoso y prismático en la vaina del haz vascular. La vena media presenta una epidermis simple con células más pequeñas que las epidérmicas de la lámina y cavidades de mucílago (Figuras 8D-F). Se encontró un nuevo tipo de vena media. A continuación se presentan las descripciones de cada uno.



**Figura 8:** Detalles de la anatomía foliar general. **A)** Estomas en la epidermis abaxial. **B)** Estrías en la epidermis abaxial. **C)** Mesofilo bilateral y extensión de la vaina en haz vascular, **D)** Drusas en parénquima de vena media. **E)** Cristal prismático en vaina del haz vascular. **F)** Cavidades de mucílago en vena media.

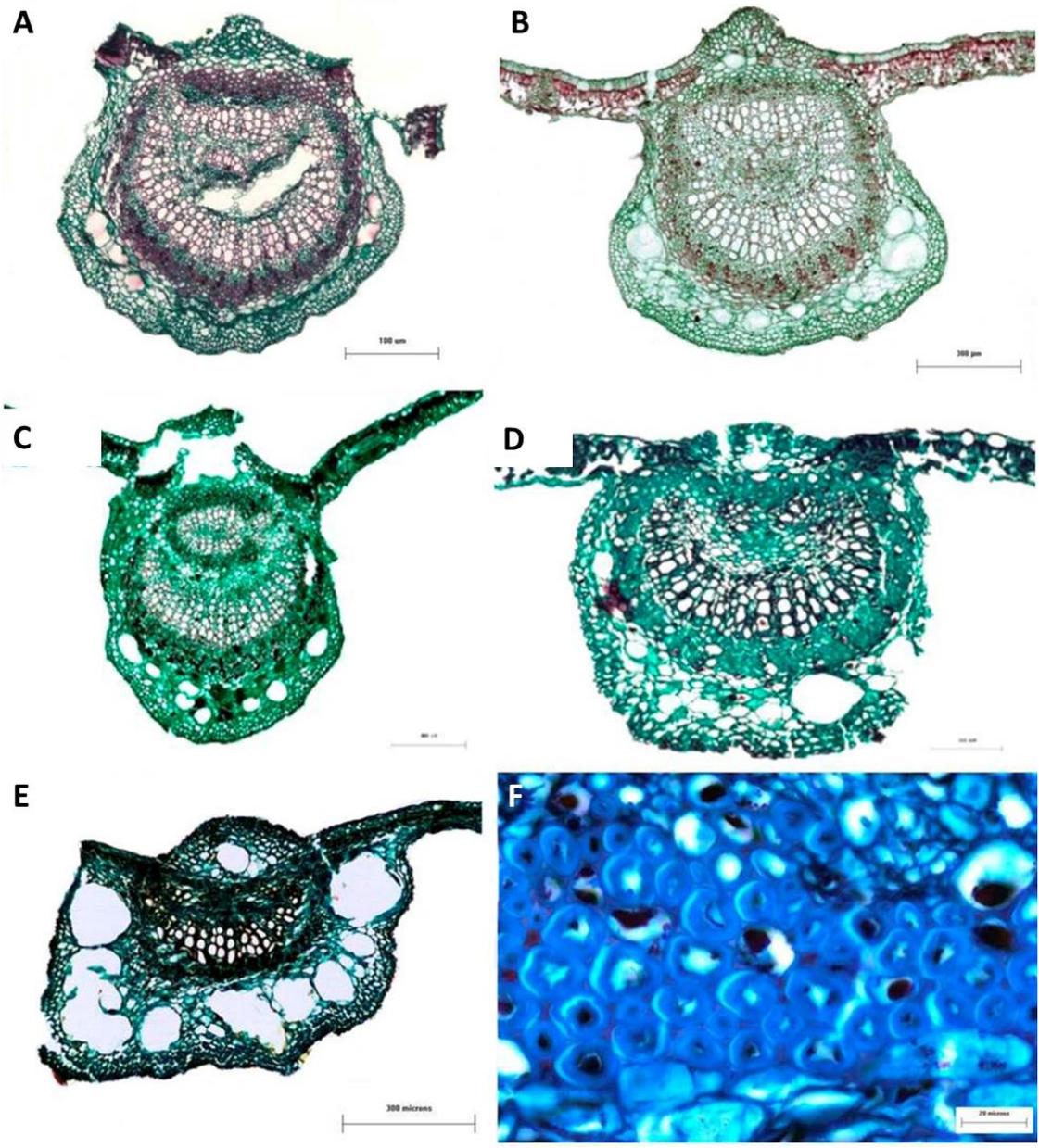
Tipo 1: Haz vascular formando un anillo cerrado de xilema pero discontinuo en el floema hacia el extremo abaxial y hacia el centro haces en diferenciación (Figura 9A). El tejido vascular está rodeado por tres a cinco estratos de fibras. Las fibras presentan paredes gruesas y lignificadas, y hacia el extremo abaxial tienen un lumen amplio. Por debajo de ambas epidermis se presentan de dos a tres estratos de colénquima anular que puede contener drusas. De tres hasta nueve cavidades de mucílago de tamaño variable hacia el extremo abaxial, en algunos casos una cavidad en el extremo adaxial. Drusas y prismas en el parénquima.

Tipo 2: Haz vascular formando un anillo cerrado de xilema pero discontinuo en el floema hacia el extremo abaxial, con células de parénquima al centro del anillo (Figura 9B). El tejido vascular está rodeado por 2 a 3 estratos de fibras. Las fibras presentan paredes engrosadas y un lumen reducido. Por debajo de ambas epidermis se presentan tres o cinco estratos de colénquima anular que contienen drusas. De tres a cinco cavidades de mucílago en el extremo abaxial y algunas veces una en el extremo adaxial. Pocas drusas y prismas en el parénquima.

Tipo 3: Haz vascular colateral en forma de arco abierto y hacia el extremo adaxial una elipse con xilema casi rodeado por el floema (Figura 9C). El tejido vascular está rodeado por 2 a 4 estratos de fibras. Las fibras presentan paredes delgadas con lumen amplio y abundantes contenidos oscuros. Por debajo de ambas epidermis dos a tres estratos de colénquima anular y tres o cuatro estratos de parénquima, donde se encuentran hasta ocho cavidades de mucílago. Drusas en parénquima.

Tipo 4: Haz vascular formando un arco cuyos extremos se curvan hacia el centro (Figura 9D). El tejido vascular está rodeado por dos a tres estratos de fibras. Las fibras presentan pared gruesa. Algunas veces la vaina está formada por fibras gelatinosas (Figura 9F). Por debajo de ambas epidermis se observan tres o cinco estratos de colénquima con drusas y algunas veces prismas. De tres a cinco cavidades de mucílago en el extremo abaxial. Drusas y prismas en parénquima.

Tipo 5: Haz vascular colateral en forma de arco abierto con los extremos ligeramente curvados (Figura 9E). El tejido vascular solamente está rodeado por parénquima escaso con abundantes contenidos oscuros. Por debajo de ambas epidermis hay dos estratos de colénquima angular con drusas por debajo de cada epidermis. Siete u ocho cavidades de mucílago en el extremo abaxial de tamaño grande y algunas veces una en el extremo adaxial. Drusas en parénquima.



**Figura 9:** Secciones transversales de vena media. **A)** Tipo 1, Manantlán, Jalisco. **B)** Tipo 2, Pátzcuaro, Michoacán. **C)** Tipo 3. Puerto Purificación, Tamaulipas. **D)** Tipo 4, Puerto Purificación, Tamaulipas, **E)** Tipo 5. Cuetzalan, Puebla. **F)** Detalle de fibras gelatinosas, Putla, Oaxaca.

El cuadro 4 resume las características anatómicas de la vena media y las principales diferencias que presentan según la entidad federativa en la que se recolectaron. Jalisco, Morelos y Tamaulipas son los estados que presentaron mayor diversidad en el arreglo de los haces en la vena media. Además el arreglo tipo 3 se encontró exclusivamente en individuos del estado de Tamaulipas.

**Cuadro 4:** Principales diferencias anatómicas de la vena media por estado en el que se presentaron.

Estado	Tipo de vena media	Colénquima	Parénquima (cavidades de mucílago y cristales)	Vaina de fibras
<b>Chihuahua</b>	4	3 estratos con prismas	9 abaxiales 1 adaxial Drusas y prismas	Con fibras de pared gruesa
<b>Guanajuato</b>	1	3 estratos con drusas	5 abaxiales Drusas y prismas	Con fibras de pared gruesa
<b>Hidalgo</b>	1	3 estratos con drusas	9 abaxiales 1 adaxial Drusas	De fibras de pared delgada, con prismas
<b>Jalisco</b>	1	3 estratos con drusas	3 abaxiales 1 adaxial Drusas y prismas	Con fibras de pared gruesa
	2		9 abaxiales Drusas	Con fibras de pared delgada
	4		4 abaxiales Drusas	Con fibras de pared gruesa
<b>Michoacán</b>	2	3 o 5 estratos con drusas	4 abaxiales Drusas y prismas	Con fibras de pared gruesa
	4		3 abaxiales Drusas	Con fibras de pared delgada
<b>Morelos</b>	1	2 ó 3 estratos con drusas	3 o 5 abaxiales 1 adaxial	Con fibras de pared delgada
	4		Drusas	Con fibras gelatinosas
<b>Oaxaca</b>	1	3 estratos con drusas	5 abaxiales Drusas y prismas	Con fibras gelatinosas
	4		3 abaxiales Drusas	Con fibras gelatinosas
<b>Puebla</b>	5	2 estratos con drusas	8 abaxiales 1 adaxial Drusas	Ausente
<b>Tamaulipas</b>	3	2 estratos con drusas	5 en cara abaxial Drusas	Con fibras de pared delgada
	4		3 en cara abaxial	Con fibras gelatinosas
	5		7 en cara abaxial Drusas	Ausente

## Metabolitos secundarios

En las CCF se detectó la presencia de flavonoides y terpenos en los tricomas, en el Cuadro 5 se enlistan aquellos compuestos que se determinaron mediante HPLC y su concentración.

**Cuadro5:** Compuestos identificados en los tricomas mediante HPLC

Compuesto	Concentración (µg/µl)
<b>Flavonoides</b>	
Apigenina	0.031 ± 0.001
Rutina	0.044 ± 0.055
Florizidina	0.159 ± 0.229
Mirecetina	0.123 ± 0.327
Quercetina	0.026 ± 0.031
Naringenina	2.191 ± 1.265
Floretina	0.442 ± 0.406
Galangina	0.160 ± 0.049
<b>Terpenos</b>	
Carnosol	0.302 ± 0.426
Ácido ursólico	0.246 ± 0.257
Estigmasterol	0.367 ± 0.079
Ácido oleanólico	0.786 ± 1.933
α-amirina	1.803 ± 2.840
β-citosterol	0.174

En el cuadro 6 se presentan los coeficientes de correlación obtenidos para los compuestos identificados en los tricomas de las poblaciones de la Faja Volcánica Transmexicana con la latitud, longitud y altitud. En su mayoría, las correlaciones resultaron ser no significativas. Los coeficientes de correlación son altos y negativos para la mirecetina con la latitud y positivos con la longitud, además la quercetina se asoció positivamente con la latitud y negativamente con la altitud y galangina también se correlacionó de forma

negativa con la altitud. Se encontró que la floretina y la quercetina se comportan como antagónicos.

**Cuadro 6:** Metabolitos secundarios identificados en los tricomas y sus valores de correlación con variables geográficas. \*\* $P < 0.008$ , \* $P < 0.01$ .

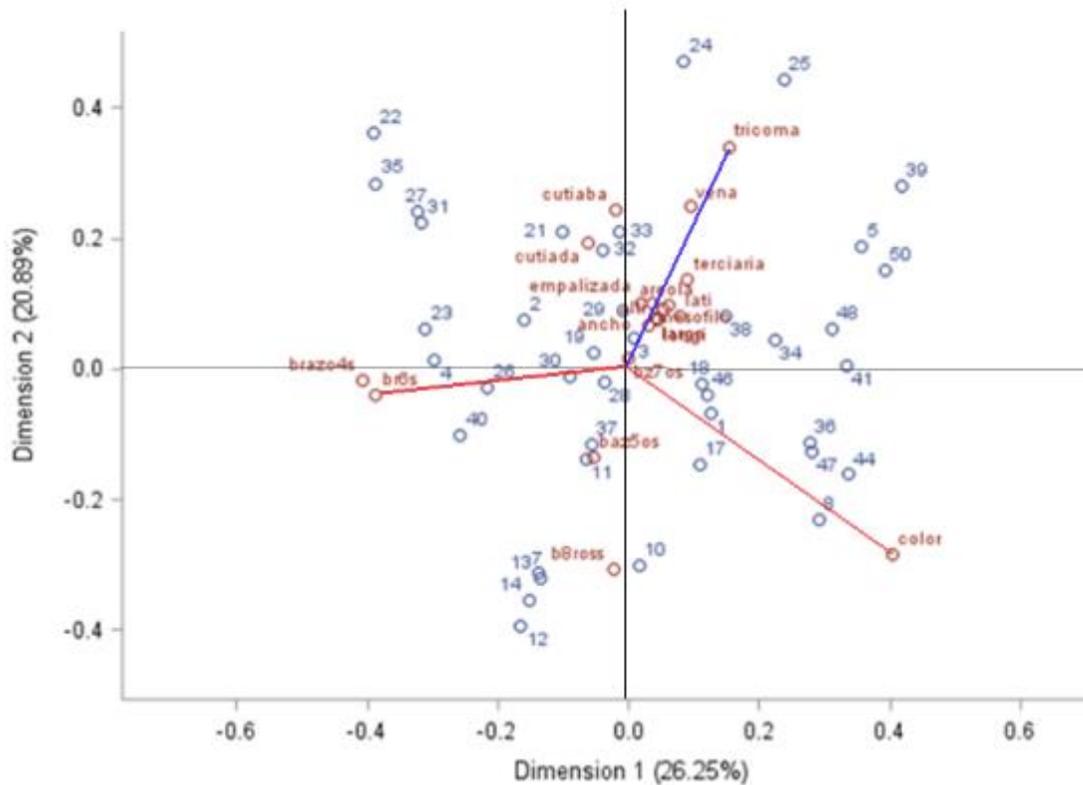
<b>Compuesto</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Altitud</b>
<b>Apigenina</b>	-0.08	0.06	0.18
<b>Floretina</b>	0.14	-0.26	-0.13
<b>Florizidina</b>	-0.16	-0.1	-0.26
<b>Galangina</b>	0.31	-0.18	-0.35*
<b>Mirecetina</b>	-0.46**	0.40*	0.13
<b>Naringenina</b>	0.021	-0.07	-0.02
<b>Quercetina</b>	0.44*	-0.22	-0.38*
<b>Rutina</b>	-0.19		0.21
<b>Ácido oleanólico</b>		-0.03	0.01
<b>Ácido ursólico</b>		-0.03	0.01
<b>Carnosol</b>		0.03	0.01
<b>Stigmasterol</b>		-0.03	0.01
<b>Amirina</b>	0.01		0.01

## Análisis estadísticos

El análisis de correspondencia mostró que son siete las variables que mejor explican la variación de los individuos (Cuadro 7), siendo las de mayor importancia la densidad de tricomas por mm<sup>2</sup>, la presencia de tricomas estrellados con seis brazos y el color de la pubescencia. También la presencia de tricomas estrellados con cuatro y ocho brazos, así como el ancho del mesofilo y del parénquima en empalizada (Figura 10).

**Cuadro 7.** Coeficientes de correspondencia para las características evaluadas. \* Variable con valores más altos en cada dimensión.

<b>Variable</b>	<b>Dimensión 1</b>	<b>Dimensión 2</b>
<b>Latitud</b>	0.1723	0.1864
<b>Longitud</b>	0.1010	0.2904
<b>Altitud</b>	0.1095	0.3386
<b>Largo de la lámina</b>	0.0512	0.1766
<b>Ancho de la lámina</b>	0.0234	0.1051
<b>Densidad de tricomas</b>	0.1413	<b>0.6932*</b>
<b>Densidad de areolas</b>	0.1229	0.3055
<b>Tipo de v. principal</b>	0.0257	0.1754
<b>Recorrido v. terciarias</b>	0.0371	0.0829
<b>Tricomas de 4 brazos</b>	0.4760	0.0010
<b>Tricomas de 5 brazos</b>	0.0146	0.0952
<b>Tricomas de 6 brazos</b>	<b>0.6159*</b>	0.0061
<b>Tricomas de 7 brazos</b>	0.0001	0.0027
<b>Tricomas de 8 brazos</b>	0.0017	0.3499
<b>Color de los tricomas</b>	<b>0.5096*</b>	0.2527
<b>Ancho del mesofilo</b>	0.0431	0.3452
<b>Ancho de empalizada</b>	0.0125	0.3428
<b>Ancho de cut. adaxial</b>	0.0250	0.2315
<b>Ancho de cut. abaxial</b>	0.0004	0.0629



**Figura 10:** Representación gráfica del análisis de correspondencia de los caracteres evaluados. Círculos rojos representan los caracteres. Círculos azules numerados representan los individuos (ver Cuadro 1 para identificación de los individuos), línea roja representa las dos variables con mayor carga en la dimensión 1 y en azul la variable de la dimensión 2.

El análisis canónico discriminante explica mediante dos ejes el 100% de la distribución de los individuos (CAN1 72.05% y CAN 2 27.95%) y pone en evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (Cuadro 8). En este análisis, el ancho de la lámina es la características con mayor importancia para agrupar a los individuos, además del grosor de las cutículas (Cuadro 9). En la figura 11 se muestra la representación gráfica de las dos variables canónicas donde los centroides de cada grupo (Faja Volcánica Transmexicana, Golfo de México y Pacífico) son significativamente diferentes como ya se mencionó.

**Cuadro 8.** Valores de la distancia a cuadrado de la región de Mahalanobis para los tres grupos definidos *a priori*.

<b>Grupo</b>	<b>Faja Volcánica</b>	<b>Golfo</b>	<b>Pacífico</b>
<b>Faja Volcánica</b>	0	2.762 ( $P=0.006$ )	2.273 ( $P=0.022$ )
<b>Golfo</b>	2.762 ( $P=0.006$ )	0	3.208 ( $P=0.002$ )
<b>Pacífico</b>	2.273 ( $P=0.022$ )	3.208 ( $P=0.002$ )	0

**Cuadro 9.** Coeficientes canónicos para las características evaluadas. \* Variable con valores más altos en cada dimensión.

<b>Variable</b>	<b>CAN 1</b>	<b>CAN 2</b>
<b>Largo de la lámina</b>	-0.6215	<b>-1.3256*</b>
<b>Ancho de la lámina</b>	<b>1.4069*</b>	1.1545
<b>Densidad de tricomas</b>	-0.3156	-0.2144
<b>Densidad de areolas</b>	0.1843	0.3645
<b>Tipo v. principal</b>	0.1522	-0.1248
<b>Recorrido v. terciarias</b>	-0.3669	-0.3130
<b>Tricomas de 4 brazos</b>	<b>-0.9991*</b>	0.0188
<b>Tricomas de 5 brazos</b>	-0.2529	-0.0530
<b>Tricomas de 6 brazos</b>	0.4512	0.2943
<b>Tricomas de 7 brazos</b>	-0.2631	-0.0317
<b>Tricomas de 8 brazos</b>	0.0841	0.1277
<b>Color de los tricomas</b>	-0.3261	<b>0.6768*</b>
<b>Ancho del mesofilo</b>	<b>0.6114*</b>	0.3354
<b>Ancho de empalizada</b>	<b>-0.5836*</b>	-0.1967
<b>Ancho de cut. adaxial</b>	<b>0.9364*</b>	-0.2380
<b>Ancho de cut. abaxial</b>	-0.1316	-0.2547



Por su parte, el análisis DISCRIM mostró que el porcentaje de observaciones clasificadas correctamente en los grupos reconocidos es mayor para los del Golfo de México (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Número de observaciones y porcentaje correctamente clasificado en cada región

	<b>Faja volcánica</b>	<b>Golfo</b>	<b>Pacífico</b>	<b>Total</b>
<b>Faja volcánica</b>	9	2	4	15
	60.00	13.33	26.67	100.00
<b>Golfo</b>	0	12	1	13
	0.00	92.31	7.69	100.00
<b>Pacífico</b>	6	3	15	24
	25.00	12.50	62.50	100.00
<b>Total</b>	15	17	20	52
	28.85	32.69	38.46	100.00

## DISCUSION

### Ontogenia de los tricomas

El tipo de tricoma se define con la primera división de la célula protodérmica o por la ausencia de ésta, como sucede en los tricomas aciculares, cuya célula protodérmica únicamente se alarga y se agudiza su ápice. El número de brazos de los tricomas estrellados y fasciculados también se define por las primeras divisiones anticlinales de la célula protodérmica y la elongación de los brazos se lleva a cabo de manera distinta en cada uno de ellos. Los tricomas glandulares son más diversos en número y orientación de las divisiones, así como en las células que los conforman. De acuerdo al desarrollo ontogenético observado, se reconocen más de cuatro tipos de tricomas en los diferentes estadios del desarrollo de las láminas foliares, cuando éstas aún se encuentra en la yema y no hay formas intermedias de los tricomas. Todos los tricomas en *Tilia* tienen origen exclusivo en las células protodérmicas, incluyendo a los tricomas glandulares, como en otras familias de angiospermas (Akers *et al.*, 1978; Ascensão y Pais, 1998; Celep *et al.*, 2014; Kolb y Müller, 2004; Nielsen *et al.*, 1991).

### Identificación de los tipos de tricomas

La falta de conocimiento sobre todos los tipos de tricomas dentro de las angiospermas vuelve problemática su delimitación (Ramayya, 1962); creando confusión en la terminología y descripción entre los tricomas estrellados y fasciculados. Por ejemplo, Inamdar y Chohan (1969), definen el tricoma estrellado como un apéndice multicelular que tiene 2-8 brazos rodeados por 8-10 células epidérmicas, mientras que Ramayya y Rao (1976) distinguen los tricomas estrellados de los fasciculados porque estos últimos presentan brazos

erectos sobre la lámina. Nuestras observaciones son congruentes con Ramayya y Rao (1976), ya que los tricomas fasciculados son erectos. Además, presentan un anillo de células epidérmicas más pequeñas en su base (Figura 4G) que en superficie parece un anillo, esta característica es similar a lo descrito por Rendón-Carmona *et al.* (2006) como un estípite para *Mortoni dendron*. En contraste, los tricomas estrellados, desde sus primeras etapas de diferenciación son lobulados (Figura 5F) y a medida que los brazos se extienden lo hacen en forma paralela a la lámina conforme ésta se expande (Figura 5) similar a lo registrado para *Mortoni dendron* (Rendón-Carmona *et al.*, 2006). En *Theobroma cacao* L., García *et al.* (2014) observaron tricomas estrellados con pie y sésiles; en *Tilia* únicamente se encontraron tricomas estrellados sésiles.

Hardin (1990) describe para las especies de *Tilia* presentes en América, tricomas glandulares bulbosos uniseriados, sin embargo, los únicos tricomas glandulares uniseriados que se observaron en este trabajo son los denominados glandulares largos. Además, también observamos tricomas glandulares multiseriados en forma de botella descritos por Ragonese (1960) para otra Malvaceae como *Hibiscus rosa-sinensis* L. Se sabe que los tricomas glandulares tienen un desarrollo excesivamente rápido en los primordios foliares (Duke y Paul, 1993), en el caso de las tilias, los tricomas tipo glandular largo son los primeros que se desarrollan y se presentaron con mayor abundancia en las yemas colectadas en otoño, mientras el árbol está en dormancia, dicha abundancia puede estar relacionada a la lubricación y protección contra la desecación de la yema, así como contra patógenos y herbívoros (Fahn, 1979, 1990; Kronstedt-Robards y Robards, 1991; Thomas 1991; Uphof, 1962). Este resultado es contrario a lo encontrado en *Vitis* L., donde los tricomas glandulares

aparecen tardíamente en el desarrollo de la lámina una vez que los aciculares se desprenden (Ma *et al.*, 2016).

Con base en nuestras observaciones los tricomas podrán codificarse por su número de células como unicelular (0), multicelular (1); por su secreción como glandular (0) y no glandular (1). Multicelular glandular como globoso (0), botella (1), largo (2) y multicelular no glandular fascicular (0), estrellado (1). Estas hipótesis de homología podrán incluirse en futuros análisis filogenéticos para *Tilia*. Los tricomas glandulares largos y los no glandulares aciculares predominan sobre las venas. Una vez que la yema se hincha comienza el desarrollo de los otros tricomas aquí descritos, principalmente sobre las venas y los márgenes. Los estrellados son los últimos en completar su desarrollo y cubren las regiones intercostales como también se ha descrito para otras Malvaceae (Gual, 1998; Rendón-Carmona *et al.*, 2006).

### **Arquitectura foliar**

Hickey (1979) realizó la descripción de la arquitectura foliar de dos especies de *Tilia* que se distribuyen en Asia, *T. mandshurica* Rupr. & Maxim y *T. chingiana* H.H. Hu & W.C. Cheng. Al comparar las descripciones de las dos especies Asiáticas con la realizada en este trabajo, se encontraron coincidencias principalmente en el ápice acuminado, la base cordada y el patrón de venación actinódromo basal. Sin embargo, Hickey (1979) describe dientes de un solo orden para estas especies, mientras que en los ejemplares revisados para este trabajo se encontraron dientes de primer y segundo orden, con vena primaria o venas de órdenes mayores.

Algunos atributos son comunes en varios géneros de la familia Malvaceae, por ejemplo, el género *Sterculia* (Hussin y Sani, 1998) y el género *Tilia* comparten la presencia de vénulas simples o una vez ramificadas, mientras que se diferencian de las del género *Mortoniidendron* donde predominan las vénulas cuatro o más veces ramificadas (Solis-Montero *et al.*, 2009). Martínez-Cabrera *et al.* (2011) separan dos especies del género *Quercus*, utilizando la forma de las aréolas, la ramificación de las vénulas y el recorrido de la vena secundaria dentro del diente como caracteres principales. Corney y colaboradores (2012) separan tres especies de *Tilia* (*T. cordata* Mill., *T. platyphyllos*, *T. americana*) utilizando características de los dientes como el tamaño, forma y ángulos de inserción. En el presente trabajo no se profundizó en dichas características, por lo que es importante hacer un análisis con los algoritmos generados por estos autores, así como evaluar el orden de vena que se inserta en el diente y el recorrido de ésta.

### **Anatomía foliar**

La anatomía observada en los individuos empleados en este trabajo coincide con la descripción del género realizada por Pigott (2012) para diferentes especies, como en la presencia de mesofilo en empalizada conformado por uno o dos estratos de células y el parénquima esponjoso laxo que reportó para *T. cordata* y *T. platyphyllos*. Además, Hanson (1917) observó que en las hojas de *T. americana* L. con mayor exposición al sol, el mesofilo se compone únicamente por células de empalizada, lo que podría ser comparable con la anatomía encontrada en algunos individuos de Chihuahua y Oaxaca, revisados en este trabajo.

De los tipos de vena media descritos por Ramírez-Díaz (2016), en este trabajo dos de ellos fueron eliminados (Tipos 3 y 6), en el caso del señalado como tipo tres se trata de un

haz tipo cinco que no ha completado su desarrollo; mientras que el tipo seis se trata de la intersección de la vena principal con venas secundarias. De esta manera, en el presente trabajo se reconocen y reclasificaron únicamente cinco tipos de arreglo de los haces vasculares para *Tilia*. Es importante recalcar que el tipo tres se presenta exclusivamente en el estado de Tamaulipas y el tipo cuatro que desarrolla una vaina de fibras gelatinosas se encontró únicamente en dos estados (Oaxaca y Tamaulipas) y corresponde a los individuos en los que se diferencia un menor número de cavidades de mucílago.

### **Metabolitos secundarios**

La variación en los flavonoides es considerada una adaptación fitoquímica a los factores bióticos y abióticos (Dixon y Pavia, 1995), dentro de los factores abióticos, aquellos que varían con la latitud, como el fotoperiodo, la intensidad de la luz y las temperaturas bajas por las noches, favorecen la producción de flavonoides en las plantas (Davik *et al.*, 2006; Jaakola y Hohtola, 2010). Hickok y Anway (1972) observaron que en *Tilia americana* se cumple esta correlación, y que parece ser análoga a la variación mostrada por la pubescencia estrellada y la longitud de la glándula. Sin embargo, Jakaola y Hohtola (2010) señalan que la quercetina y sus derivados parecen aumentar a mayor intensidad de luz, relación que puede ser explicada por su función como antioxidantes (Agati *et al.*, 2010; 2012; 2013). Respecto a los otros compuestos identificados y que no presentaron correlación con factores ambientales, su presencia se puede justificar mediante factores bióticos. Varios autores reportan que la apigenina, naringenina, galangina y floretina proveen a la planta de resistencia ante hongos y bacterias (Agati *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2011; Padmavati *et al.*, 1997; Treutter, 2006); mientras que la rutina confiere protección contra los herbívoros, por

ejemplo, contra las larvas de *Spodoptera liture* en plantas de tabaco (Mallikarjuna *et al.*, 2004). Por su parte, los terpenos también están asociados a la defensa contra herbívoros y parásitos (Loughrin *et al.*, 1994; Paré y Tumlinson, 1999). Aguirre-Hernández y colaboradores (2010) encontraron diferencias en la presencia y concentración de los flavonoides en flores y brácteas de *Tilia* provenientes de tres estados de la República Mexicana y sugieren la utilidad de los flavonoides como quimiomarcadores dentro del género y posiblemente entre especies. En este trabajo también se encontraron diferencias en los flavonoides presentes en los tricomas, pero los resultados aquí presentados solo incluyen algunas poblaciones de la Faja Volcánica Transmexicana. Por ello se sugiere ampliar el estudio de los flavonoides, incluyendo tanto los tricomas como la lámina entera, en un número mayor de individuos que representen la distribución del género en México y así poder evaluar su utilidad como herramienta quimiotaxonómica.

### **Reconocimiento de especies**

Los resultados del análisis canónico discriminante separan tres grupos, siendo el grupo del Golfo el que más difiere de los tres. Este grupo es claramente reconocible porque sus individuos siempre presentan la combinación de tricomas estrellados de cuatro y seis brazos, de 250-400  $\mu\text{m}$  de largo; además algunos individuos de este grupo presentan tricomas estrellados de ocho brazos. Aunque en esta región se caracterizaron diferentes tipos de vena media, el tipo tres es exclusivo de esta región, por lo que se considera una característica importante para el reconocimiento del grupo. Sin embargo, es necesario muestrear poblaciones en el estado de Veracruz para confirmar que todos los individuos que se distribuyen en esa región pertenecen a dicho grupo.

Los individuos que se distribuyen en la Faja Volcánica Transmexicana y en la vertiente del Pacífico presentan características muy variables. Se identificaron individuos que no presentan tricomas estrellados sobre la lámina, pero presentan tricomas aciculares tanto en la lámina como sobre las venas, además de tricomas fasciculados formando los domacios, estos individuos corresponderían a los que Pigott (2012) considera árboles glabros para la especie *Tilia americana*. Es importante recalcar que la coloración de la pubescencia toma mayor relevancia para los individuos en los que se determinó como “nula”, ya que son aquellos individuos que no presentan tricomas estrellados; mientras que aquellos que si presentan pubescencia, la variación de color es tan amplia que no es posible agruparlos.

El ancho del mesofilo y del parénquima en empalizada es significativo, Ramírez-Díaz (2016) obtuvo resultados similares; sin embargo, no pudo confirmar la utilidad de estos caracteres para agrupar individuos, debido a que el material estudiado provenía de herbario y no se tenía la certeza de un muestreo estandarizado. En el presente trabajo, el muestreo estandarizado de hojas maduras de ramas reproductivas, permitió eliminar la incertidumbre sobre la utilidad de dichos caracteres, así mismo para el ancho de las láminas. El grupo del Golfo es reconocible por los atributos de los tricomas estrellados, las láminas angostas ( $5.66 \pm 1.28$  cm), el mesofilo de  $65.68 \pm 18.15$   $\mu\text{m}$  con un parénquima en empalizada de  $27.79 \pm 5.73$   $\mu\text{m}$  y el grosor de la cutícula de la cara adaxial  $0.94 \pm 0.28$   $\mu\text{m}$ . A diferencia, el grupo del Pacífico se caracteriza por tener láminas más anchas ( $9.08 \pm 4.47$  cm), un mesofilo de  $60.55 \pm 37.58$   $\mu\text{m}$  con una empalizada de  $33.83 \pm 22.68$   $\mu\text{m}$  y una cutícula abaxial de  $1.43 \pm 0.68$   $\mu\text{m}$  de grosor.

McCarthy (2012) analizó tres especies norteamericanas de *Tilia* (*T. americana*, *T. caroliniana*, *T. heterophylla* Vent.) e incluye 27 muestras de México y concluye que la densidad de la pubescencia disminuye al disminuir la latitud, pero no encontró diferencias claras que permitieran separar a dichas especies. Sin embargo, cuando reduce el número de muestras a únicamente aquellas que provienen de hojas de ramas reproductivas, los individuos recolectados en México se separan claramente de los individuos de Estados Unidos. Esta autora también realizó un análisis de nicho y los individuos de México se separan claramente de los de Estados Unidos, por lo que sugiere solo reconocer para los Estados Unidos a *T. americana* y para México a *T. mexicana*. Resultados similares obtuvo Phuekvilai (2014), al utilizar secuencias nucleares, porque los individuos recolectados en México también se separan de aquellos procedentes de Estados Unidos, formando dos clados. Los resultados de estos trabajos sugieren que las especies de Estados Unidos no se distribuyen en México, por lo que las subespecies a la fecha reconocidas por Hardin (1979), *T. americana* var. *mexicana* y por Pigott (2012), *T. caroliniana* subsp. *caroliniana*, *T. caroliniana* subsp. *floridana* no deberán ser reconocidas para México.

En el estudio de filogeografía de *Tilia* de Norteamérica, McCarthy y Mason-Gamer (2016) reconocen dos grandes clados y que en las poblaciones de México se encuentran seis haplotipos diferentes. El grupo que denominan “el más mexicano” se conforma por cuatro haplotipos que se distribuyen a lo largo de las montañas de la Sierra Madre Occidental y que no se comparten con individuos de los Estados Unidos de Norteamérica, mientras que los otros dos haplotipos (se encontraron en individuos colectados en Querétaro) también se encontraron en individuos de poblaciones de Virginia y Texas y se interpretan como ancestrales. Los estudios de McCarthy (2012), McCarthy y Manson-Gamer (2016) y Pigott

(2012) tienen un muestreo reducido con poca representatividad de las poblaciones mexicanas y no consideran ni explican la alta variación encontrada en la Faja Volcánica Transmexicana, además, algunos de los ejemplares de herbario con los que trabajaron no tienen las localidades precisas en las que fueron recolectados, únicamente están identificados como material de México; esto dificulta conocer una variación más real en las diferentes regiones del país. Para confirmar la presencia de dos o más especies de *Tilia* en México deberán continuarse los trabajos con un enfoque filogeográfico que incluya un mayor número de poblaciones en México, así como los análisis filogenéticos con genes nucleares y explorar otros atributos reproductivos que puedan ser incorporados a análisis de evidencia total.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados de este trabajo se concluye que no hay estados intermedios entre los diferentes tipos de tricomas encontrados en las hojas del género *Tilia*, que con excepción de los tricomas estrellados, los otros pueden o no encontrarse en las láminas maduras; por lo que caracterizar el tamaño de sus brazos contribuye a la delimitación de las especies con base en los atributos de los tricomas estrellados y no en la ausencia-presencia de los otros tipos; sin embargo, aunque se encontraron diferencias entre estas características, no se debe considerar como único elemento para la separación de las especies, además, se descarta la utilidad de la caracterización del color de la pubescencia como una herramienta sistemática. Las características anatómicas de la vena media permitieron el reconocimiento de grupos con características únicas, mientras que para la arquitectura foliar se requieren trabajos más profundos con énfasis en los dientes.

Considerando los resultados obtenidos por McCarthy (2012), Pigott (2012), Phuekvilai (2014), McCarthy y Mason-Gamer (2016) y los de este trabajo, en México se pueden reconocer al menos dos grupos, por lo que se sugiere tratar a los individuos que se distribuyen en la Sierra Madre Oriental como especie *Tilia mexicana*, y aquellos que se distribuyen en la Sierra Madre Occidental como *Tilia occidentalis* Rose.

## REFERENCIAS

Agati, G. y Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186(4), 786-793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. y Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S. y Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>

Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, M. E., Martínez, A. L., Moreno, J., Kite, G., Terrazas, T. y Soto-Hernández, M. (2010). HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 91-7.

Akers, C. P., Weybrew, J. A. y Long, R. C. (1978). Ultrastructure of glandular trichomes of leaves of *Nicotiana tabacum* L., cv Xanthi. *American Journal of Botany*, 65(3), 282-292. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1978.tb06070.x>

Andrés-Hernández, A. R. y Terrazas, T. (2006). Anatomía foliar y del peciolo de especies del género *Rhus* s. str. (Anacardiaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 78, 95-106. <https://doi.org/10.17129/botsci.1723>

Andrés-Hernández, A. R. y Terrazas, T. (2009). Leaf architecture of *Rhus* s.str. (Anacardiaceae). *Feddes Repertorium*, 120, 293-306.

<https://doi.org/10.1002/fedr.200911109>

Andrés-Hernández, A. R., Espinosa, D., Fraile-Ortega, M. E. y Terrazas, T. (2012). Venation patterns of *Bursera* species Jacq. ex L. (Burseraceae) and systematic significance. *Plant Systematics and Evolution*, 298, 1723-1731.

<https://doi.org/10.1007/s00606-012-0673-x>

Araujo- Silva, J., Alves- Azevedo, A., Campos Sila, L. y Strozi, R. M. (2010). Leaf anatomy as an additional taxonomy tool for 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil). *Plant Systematics and Evolution*, 286, 117-131.

<https://doi.org/10.1007/s00606-010-0268-3>

Ascensão, L. y Pais, M. S. (1998). The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany*, 81(2), 263-271.

<https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0550>

Ash, A.W, Ellis, B., Hickey, L. J., Johnson, K.R, Wilf, P. y Wing, S.L. (1999). Manual of leaf architecture: Morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms. Smithsonian Institution: Washington

Balaguer, L., Martínez-Ferrari, E., Valladares, F., Pérez-Corona, M. E., Baquedano, F. J., Castillo, F. J. y Manriquez, E. (2001). Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology*, 15, 124-135.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2001.00505.x>

Bickford, C. P. (2016). Ecophysiology of leaf trichomes. *Functional Plant Biology*, 43, 807-814. <https://doi.org/10.1071/FP16095>

Bruschi, P., Grossoni, P. y Busotti, F. (2003). Within and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Natural Populations Trees*, 17, 164-172. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0218-y>

Bush, B. F. (1929). The mexican species of *Tilia*. *American Midland Naturalist*, 11, 543-560. <https://doi.org/10.2307/2420068>

Cardillo, E. y Bernal, C. J. (2006). Morphological response and growth of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings at different shade levels. *Forest Ecology and Management*, 222, 296-301. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.10.026>

Carlquist, S. (1961). *Comparative Plant Anatomy*. Holt, Rinehart, Winston, New York.

Carvalho-Sobrinho, J. G. D., Santos, F. D. A. R. D. y Queiroz, L. P. D. (2009). Morfologia dos tricomas das pétalas de espécies de *Pseudobombax* Dugand (Malvaceae, Bombacoideae) e seu significado taxonômico. *Acta Botanica Brasilica*, 23(4), 929-934.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062009000400003>

Celep, F., Kahraman, A., Atalay, Z. y Doğan, M. (2014). Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Salvia quezelii* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 300, 1945-1958. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1020-1>

Cervantes, A., Terrazas, T. y Hernández, H. M. (2009). Foliar architecture and anatomy of *Bernardia* and other genera of Acalyphoideae (Euphorbiaceae). *Brittonia*, 61, 375-391.

<https://doi.org/10.1007/s12228-009-9084-x>

Chalk, L. (1983). The effects of ecological conditions on wood anatomy. En C. R. Metcalfe y L. Chalk, *Anatomy of the Dicotyledons*, Vol. 2, pp. 152-156. Clarendon Press, Oxford.

Corney, D. P., Tang, H. L., Clark, J. Y., Hu, Y. y Jin, J. (2012). Automating digital leaf measurement: the tooth, the whole tooth, and nothing but the tooth. *PloS one*, 7(8), e42112.

Cowan, J. M. (1950). *The Rhododendron, Leaf; A Study of Epidermal Appendages*, Oxford and Boyd, London.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

Davik J., Bakken A.K., Holte K. y Blomhoff R. (2006) Effects of genotype and environment on total anti-oxidant capacity and the content of sugars and acids in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81, 1057–1063.

<https://doi.org/10.1080/14620316.2006.11512171>

Dickison, W. C. (2000). *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, San Diego.

Dixon, R.A. y Pavia, N.L. (1995) Stress-induced phenyl propanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085–1097. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1085>

Downing, T. L., Ladiges, P. Y. y Duretto, M. F. (2008). Trichome morphology provides phylogenetically informative characters for *Tremandra*, *Platytheca* and *Tetratheca* (former

Tremandraceae). *Plan Systematics and Evolution*, 271, 199-221.

<https://doi.org/10.1007/s00606-007-0622-2>

Duke, S.O. y Paul, R.N. (1993). Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *International Journal of Plant Sciences*, 154, 107-118.

<https://doi.org/10.1086/297096>

Fahn, A. (1979). Secretory tissues in plants. London, Academic Press.

Fahn, A. (1990). Plant anatomy. 4th ed. Oxford, Butterworth-Heinemann Ltd.

Gama, T. S. S., Demarco, D. y Aguiar-Dias, A. C. A. (2013). Ontogeny, histochemistry, and structure of the glandular trichomes in *Bignonia aequinocialis* (Bignoniaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 36, 291-297. <https://doi.org/10.1007/s40415-013-0024-3>

Garcia, T. B., Potiguara, R. C. D. V., Kikuchi, T. Y. S., Demarco, D. y Aguiar-Dias, A. C. A. D. (2014). Leaf anatomical features of three *Theobroma* species (Malvaceae sl) native to the Brazilian Amazon. *Acta Amazonica*, 44(3), 291-300.

<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201300653>

Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J., Mihaliak, C., Karp, F. y Croteau, R. (1991). Biosynthetic methods for plant natural products: new procedures for the study of glandular trichome constituents. En *Modern Phytochemical Methods*. Pp. 347-370. Springer, Boston, MA.

Gual, M. (1998). *La familia Tiliaceae Juss. en el estado de Guerrero*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

- Hanson, H. C. (1917). Leaf-structure as related to environment. *American Journal of Botany*, 4(9), 533-560. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1917.tb05471.x>
- Harborne, J. B. (1966). Comparative biochemistry of flavonoids—I.: Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry*, 5(1), 111-115.
- Harborne, J. B. (1993, September). Do natural plant phenols play a role in ecology?. En *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance 381* (pp. 36-45).
- Hardin, J. (1979). Patterns of variation in foliar trichomes of eastern North American *Quercus*. *American Journal of Botany*, 6, 576-585. <https://doi.org/10.2307/2442507>
- Hardin, J. (1990). Variation patterns and recognition of varieties of *Tilia americana* s.l. *Systematic Botany*, 15, 33-48. <https://doi.org/10.2307/2419014>
- Hedrick, P. W. (2006). Genetic polymorphism in the heterogeneous environments: The age of genomics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37, 63-93. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110132>
- Hetterscheid, W. L. A. y Hennipman, E. P. (1984). Venation patterns, soral characteristics and shape of the fronds of the microsorioid Polypodiaceae. *Botanische Jahrbucher*, 105, 11-47.
- Hickey, L. J. (1973). Clasificación de la arquitectura foliar en dicotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 16,1-26.
- Hickey, L. J. (1979). A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. En C. R. Metcalfe, y L. Chalk, *Anatomy of the Dicotyledons*. Vol. 1, pp. 25-39. Clarendon Press, Oxford.

Hickok, L. G. y Anway, J. C. (1972). A morphological and chemical analysis of geographical variation in *Tilia* L. of eastern North America. *Brittonia*, 24(1), 2-8.

<https://doi.org/10.2307/2805542>

Hovenden, M. J. y Vander Schoor, J. K. (2006). The response of leaf morphology to irradiance depends on altitude of origin in *Nothofagus cunninghamii*. *New Phytologist*, 169(2), 291-297.

Hussin, K. H. y Sani, Z. M. (1998). Comparative leaf anatomical studies of some *Sterculia* L. species (Sterculiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 127(2), 159-174.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1998.tb02094.x>

Inamdar, J. A. (1967). Studies on the trichomes of some Oleaceae, structure and ontogeny. En *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B*. 66(4), 164-177. Springer India.

Inamdar, J. A. y Chohan, A. J. (1969). Epidermal structure and stomatal development in some Malvaceae and Bombacaceae. *Annals of Botany*, 33(5), 865-878.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084332>

Inamdar, J. A., Bhat, R. B. y Rao, T. R. (1983). Structure, ontogeny, classification, and taxonomic significance of trichomes in Malvales. *Korean Journal of Botany*, 26(3), 151-160.

Jaakola, L., y Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell & Environment*, 33(8), 1239-1247.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02154.x>

Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc.; London.

Jones, G. N. (1968). Taxonomy of American species of Linden (*Tilia*). Urbans: Illinois Biological Monographs 39.

Judd, W. S. y Manchester, S. R. (1997). Circumscription of Malvaceae (Malvales) as determined by a preliminary cladistic analysis of morphological, anatomical, palynological and chemical characters. *Brittonia*, 49, 384-405. <https://doi.org/10.2307/2807839>

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A., Stevens, P. F. y Donoghue, M. J. (2007). Plant Systematics: A Phylogenetic Approach (3 ed.). Sinauer Associates, Sunderland.

Kim, H. J., Seo, E., Kim, J. H., Cheong, H., Kang B. C. y Choi, D. (2012). Morphological classification of trichomes associated with possible biotic stress resistance in the genus *Capsicum*. *Plant Pathologist Journal*, 28, 107-113.

<https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.12.2011.0245>

Kolb, D. y Müller, M. (2004). Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Annals of Botany*, 94(4), 515-526.

<https://doi.org/10.1093/aob/mch172>

Kronstedt-Robards, E. y Robards, A.W. (1991). Exocytosis in gland cells. Pp.199-232 En Hawes, C.R.; Coleman, J.O.D. y Evans, D.E. (Eds.). *Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants*. Cambridge, Cambridge University Press.

Lee, J. H., Regmi, S. C., Kim, J. A., Cho, M. H., Yun, H., Lee, C. S. y Lee, J. (2011). Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157: H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. *Infection and immunity*, IAI-05580.

Levin, D. A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology* 48, 3-15. <https://doi.org/10.1086/407484>

Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., Turlings, T.C.y Tumlinson, J. H. (1994) Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 11836–11840. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.11836>

Lu, H. F., Jiang, B., Shen, Z. G., Shen, J. B., Peng, Q. F. y Cheng, C. G. (2008). Comparative leaf anatomy, FTIR discrimination and biogeographical analysis of *Camellia* section *Tuberculata* (Theaceae) with a discussion of its taxonomic treatments. *Plant Systematic and Evolution*, 274, 223-235. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0047-6>

Ma, Z. Y., Wen, J., Ickert-Bond, S. M., Chen, L. Q. y Liu, X. Q. (2016). Morphology, structure, and ontogeny of trichomes of the grape genus (*Vitis*, Vitaceae). *Frontiers in Plant Science*, 7, 704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00704>

Mallikarjuna, N., Kranthi, K. R., Jadhav, D. R., Kranthi, S. y Chandra. S. (2004) Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, 128, 321–328. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00834.x>

Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002) Fitoquímica orgánica. Caracas, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico universidad Central de Venezuela, 588p.

Markham, K. R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides, pp.197-235. En: *Methods in plant biochemistry*. Harborne, J. B. (ed.). Academic Press. London, Inglaterra.

Martínez-Cabrera, D., Terrazas, T. y Zavala, F. (2003). Arquitectura foliar y anatomía de la corteza y madera de *Quercus sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Boletín de Sociedad Botánica de México*, 73, 63-72.

Martínez-Cabrera, D., Terrazas, T. y Ochoterena, H. (2007). Leaf architecture of *Hameliaceae* (Rubiaceae). *Feddes Repertorium*, 118, 286-310.

<https://doi.org/10.1002/fedr.2007111140>

Martínez-Cabrera, D., Zavala-Chávez, F. y Terrazas, T. (2011). Estudio morfométrico de *Quercus sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 551-568. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.2.459>

Martínez-Gordillo, M., Espinosa-Matías, S. (2005). Tricomas foliares de *Croton* sección *Barhamia* (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Mexicana*.

<http://dx.doi.org/10.21829/abm72.2005.1000>

Martínez-Millán, M. y Cevallos-Ferriz, S. R. S. (2005). Arquitectura foliar de *Anacardiaceae*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76, 137–190.

<http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2005.002.308>

McCarty D (2012). Systematic and phylogeography of the genus *Tilia* in north America. Ph.D. thesis, University of Illinois at Chicago, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA.

McCarthy, D. M. y Mason-Gamer, R. J. (2016). Chloroplast DNA-Based Phylogeography of *Tilia americana* (Malvaceae). *Systematic Botany*, 41(4), 865-880.

<https://doi.org/10.1600/036364416X693964>

Medina-Medrano, J. R., Aviña-Martínez, G. N. y García-Pereyra, J. (2014). Revisión de flavonoides identificados en el género *Physalis* (Solanaceae), su capacidad antioxidante e importancia como marcadores químicos. *Naturaleza y Desarrollo*, 12 (1), 16-27.

Metcalf, C. R. y Chalk, L. (1950). Anatomy of the dicotyledons: Leaves, stems and wood in relation to taxonomy with notes on economics uses (Vol. I). Clarendon Press, Oxford.

Nahrstedt, A., y Butterweck, V. (1997). Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 30(S 2), 129-134.

<https://doi.org/10.1055/s-2007-979533>

Nielsen, M. T., Akers, C. P., Järlfors, U. E., Wagner, G. J. y Berger, S. (1991). Comparative ultrastructural features of secreting and nonsecreting glandular trichomes of two genotypes of *Nicotiana tabacum* L. *Botanical Gazette*, 152, 13-22. <https://doi.org/10.1086/337858>

Nogueira, A., Ottra, J. H. L., Guimarães, E., Rodrigues Machado, S. y Lohmann, L. G. (2013). Trichome structure and evolution in Neotropical lianas. *Annals of Botany*, 112, 1331-1350.

- Noguerón-Merino MC, Jiménez-Ferrer E, Román-Ramos R, Zamilpa A, Tortoriello J, Herrera-Ruiz M. (2015). Interactions of a standardized flavonoid fraction from *Tilia americana* with Serotonergic drugs in elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 319-27.
- Nurshahidah, M., Nabilah, M., Noraini, T., Richard, C., Ismail, B. y Mohd-Arrabe, A. B. (2013). Taxonomic value of leaf venation and trichome characteristics in some *Byttneria* L. and *Pterocymbium* R. BR.(Malvaceae sl). *Malaysian Applied Biology Journal*, 42(2), 33-40.
- Pacheco-Trejo, J., Terrazas, T. y Ochoterena, H. (2009). Leaf architecture of the genus *Didymaea* Hook. F. (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 281, 137-149.  
<https://doi.org/10.1007/s00606-009-0195-3>
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K. V. y Reddy, A. R. (1997). Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46, 499–502.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00325-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00325-7)
- Paré, P. W. y Tumlinson, J. H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121(2), 325-332. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.325>
- Payne, W. (1978). A glossary of plant hair terminology. *Brittonia*, 30, 239–255.  
<https://doi.org/10.2307/2806659>
- Pérez-Cálix, E. (2009). Tiliaceae. Flora del Bajío y regiones adyacentes 160. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán.

Phuekvilai, P. (2014). Relicts, Refugia and Reticulation: A study of population history, hybrids and phylogeny in the long-lived flowering tree genus *Tilia*. PhD Thesis, Newcastle University.

Pigott, D. (2012). Lime-trees and basswoods: a biological monograph of the genus *Tilia*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1086/670573>

Ragonese, A. M. (1960). Ontogenia de los distintos tipos de tricomas de *Hibiscus rosa-sinensis* L.(Malvaceae). *Darwiniana*, 12(1), 58-66.

Rajput, M.T.M. R.C. Carolin y S.S. Tahir. (1985). The indumentum of genus *Dampiera* R. Br. (Goodeniaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 17, 181-194.

Ramayya N. (1962). Studies on the trichomes of some Compositae. II. Phylogeny and classification, *Ibid.* 1962b, 4 (1-4), 189-92.

Ramayya, N. (1972). Classification and phylogeny of the trichomes of angiosperms. En Ghose, A.K.M. y M. Yunus (Eds.), *Research Trends in Plant Anatomy*, pp: 91-102. Tata McGraw Hill Publishing Company, Bombay-New Delhi, India.

Ramayya, N. y S.R.S. Rao. (1976). Morphology, phylaxis and biology of the peltate scale, stellate and tufted hairs in some Malvaceae. *Journal of the Indian Botanical Society*, 55, 75-79.

Ramírez-Díaz, C. M. (2016). *Anatomía y arquitectura foliar del género Tilia en México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Redonda-Martínez, R., Villaseñor, J. L. y Terrazas, T. (2012). Trichome diversity in the Vernonieae (Asteraceae) of Mexico I: *Vernonanthura* and *Vernonia* (Vernoniinae). *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 139, 235-247.

Rendón-Carmona, N., Ishiki-Ishihara, M., Terrazas, T. y Nieto-López, M. G. (2006). Indumento y tricomas en la caracterización de un grupo de nueve especies del género *Mortonioidendron* (Tiliaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77, 169-176.

<http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2006.002.334>

Rhoades, D. F. (1979). Evolution of plant chemical defense against herbivores. Pages 3–54 in G. A. Rosenthal and D.H. Janzen, editors. *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, Orlando, Florida, USA.

Romero, R. S. (2000). Estudio taxonómico de la serie *Acutifoliae* (*Quercus*, Fagaceae) Tesis doctoral. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF 174 pp.

Ruzin, S. E. (1999). *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Nueva York.

SAS Institute. (2004). *SAS/GRAPH 9.1 Reference*. SAS Institute.

Shaheen, N. I. G. H. A. T., Ajab, M., Yasmin, G. y Hayat, M. Q. (2009). Diversity of foliar trichomes and their systematic relevance in the genus *Hibiscus* (Malvaceae). *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(3), 279-284.

Shanmukha Rao y Ramayya, N. (1987). Trichome types and their taxonomic importance in the Tiliaceae. *Indian Journal of Botany*. 10, 65-73

- Shanmukha Rao, S. R. (1990). Trichome ontogenesis in some Tiliaceae. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 65, 363-375.
- Sisó, S., Camarero, J. y Gil-Peigrín, E. (2001). Relationship between hydraulic resistance and leaf morphology in broadleaf *Quercus* species: a new interpretation of leaf lobation. *Trees*, 15(6), 341-345. <https://doi.org/10.1007/s004680100110>
- Solereder, H. (1908). Systematic Anatomy of Dicotyledons, Vol. 2, Clarendon Press, Oxford.
- Solis-Montero, L., Rendón-Carmona, N., Terrazas, T. y Ishiki, M. (2009). Los domacios de *Mortoniadendron* (Malvaceae sl). *Brittonia*, 61(1), 71-84. <https://doi.org/10.1007/s12228-008-9059-3>
- Stuessy, T. F. (1990). Plant Taxonomy: The Systematic Evaluation of Comparative Data. Columbia University Press, Nueva York.
- Tejero-Diez, D., Aguilar-Rodríguez S., Terrazas, T. y Pacheco, L. (2010). Arquitectura y anatomía foliar del complejo *Polypodium plesiosorum* sensu Moran (Polypodiaceae). *Revista de Biología Tropical*, 58, 955-976. <https://doi.org/10.15517/rbt.v58i2.5257>
- Theobald, W.L., J.L. Krahnlik y R.C. Rollins. (1980). Trichome description and classification. En: C.R. Metcalf y L. Chalk (Eds.) *Anatomy of Dicotyledons* (2nd ed.), pp. 40-53.
- Thomas, V. (1991). Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. *Annals of Botany*, 68, 287-305. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088256>

- Toker, G., Asian, M., Teşilada, E., Memişoğlu, M. y Ito, S. (2001). Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assesment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 111-121.  
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00351-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00351-X)
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.002>
- Uphof, J. C. T. (1962). Plant hairs. 292p. En: Zimmermann, W. y Ozenda, P.G. (Eds.). *Handbuch der pflanzenanatomie*. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Uribe-Salas, D. C., Sáenz-Romero, A., González- Rodríguez, O. y Téllez-Valdéz, O. (2008). Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: potential implications for management conservation. *Forest Ecology and Management*, 256, 2121-2126. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.002>
- Wagner, H., Bladt, S., y Zgainski, E. M. (2001). *Plant drug analysis*. x Berlin.
- Wilkinson, H. P. (1979). The plant surface (mainly leaf) Part IV: Domacio. En C. R. Metcalfe y L. Chalk (Eds.), *Anatomy of the Dicotyledons* (2 ed., pp. 97-165). Clarendon Press, Oxford.
- Wink M. (2010). Introduction: Biochemistry, physiologyc and ecological funtions of secondary metabolites. *Annual Plant Review*, 40, 1-19.
- Zarlavsky, G.E. (2014). *Histología Vegetal: Técnicas simples y complejas*. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, 1-198.
- Zub, M. R. (1972). Flavonoid glycosides of Linden. *Farmatsevtichnyi zhurnal*, 27(5), 86.