

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Impacto de las características foliares de
helechos sobre la colonización de epífilos en la Estación de
Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz, México”**

TESIS

QUE PRESENTA

AMPARO BÉLGICA CERÓN CARPIO

MATRÍCULA 2163802419

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. BLANCA PÉREZ GARCÍA

DR. KLAUS VOLKER MEHLTRETER (conceptualización de la tesis)

ASESOR:

DR. JOSÉ ANTONIO GUERRERO ANALCO

JURADOS:

DR. ÓSCAR LUIS BRIONES VILLARREAL

DRA. ROSA EMILIA PÉREZ PÉREZ

“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco_____la tesis que presentó:

M. en C. Amparo Bélgica Cerón Carpio

El día__de_____2021

Jurado:

Dra. Blanca Pérez García_____
Profesor-Investigador Titular, Botánica Estructural y Sistemática Vegetal, Depto. Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Dr. Klaus Volker Mehlreter_____
Profesor-Investigador Titular, Red de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, A.C.

Dr. José Antonio Guerrero Analco_____
Profesor-Investigador Titular, BIOMIMIC®-Red de Estudios Moleculares Avanzados, Química de Productos Naturales, Instituto de Ecología, A.C.

Dr. Óscar Luis Briones Villarreal_____
Profesor-Investigador Titular, Red Evolutiva, Instituto de Ecología, A.C.

Dra. Rosa Emilia Pérez Pérez_____
Profesor-Investigador Titular, Lab. Taxonomía y Ecología de líquenes, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Agradecimientos

A mi comité tutorial: Dra. Blanca Pérez García, Dr. Klaus V. Mehltreter y Dr. José Antonio Guerrero Analco, por dirigir mi tesis y contribuir en mi formación académica a través de sus enseñanzas y su amplio conocimiento científico.

A mi jurado: Dra. Rosa Emilia Pérez Pérez, Dr. Óscar Luis Briones Villareal, Dra. Armida Leticia Pacheco Mota y Dr. Noé Manuel Montaña Arias, por sus valiosas aportaciones al manuscrito de mi tesis.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por su autorización para llevar a cabo mis estudios de posgrado. Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior (PRODEP) por la beca otorgada.

Al Dr. Juan L. Monribot Villanueva y a la M.C. Ana L. Kiel Martínez, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C., por su apoyo técnico en los análisis químicos de las ceras. A la Dra. Silvia Espinosa Matías por su apoyo en la obtención de las imágenes de las ceras cuticulares, Lab. de Microscopía de Barrido, Facultad de Ciencias, Depto. de Biología, UNAM. A la M. en C. María Esther Sánchez Coronado por su apoyo en los análisis estadísticos; y a la Dra. Alma Orozco Segovia, por las facilidades otorgadas para trabajar en el microscopio, Lab. de Ecología Fisiológica, Inst. de Ecología, UNAM. A la Dra. Catalina Juárez Martínez, Fac. de Ciencias, UNAM, al Dr. Binoy T. Thomas, Lab. de Phycotecnología, Col. Católico, Kerala, India y a la Biól. Paola Martínez Colín, por sus asesorías en la identificación de los grupos de epífilos. A la Biól. Rosamond Coates por permitirme realizar mi trabajo en la Estación de Biología Tropical de “Los Tuxtles”, Veracruz, México, al M. en C. Álvaro Campos Villanueva por su apoyo logístico en la estación y a Erli Velasco Sinaca por ser un excelente guía de campo.

A los académicos y compañeros del laboratorio de Biología de Pteridofitas, UAMI y del Herbario UAMIZ, por todas sus amables atenciones.

A mis padres Margarita y Alfredo por su gran amor (los amo y admiro papás); a mi hermana Abigail por su apoyo y ser mi amiga en todo, y a mi hermano Alfredo.

A Gerardo por estar conmigo durante todo este camino, y sobre todo por su amor incondicional y sumarle tanta felicidad a mi vida.

A Donaji (mi prima y hermana) y a mis queridos amigos, Lucio, Eliza, Anita, Karla, Mich y Elda, por ayudarme a ser más fuerte, a no desistir y sobre todo gracias por su fiel amistad.

A la Dra. Cristina Landa por su apoyo académico y su amistad, así como a su hija Sofi y sus papás.

A mi tía Francis por su cariño y apoyo. A mis tíos Anita y †Tomás, y mi primo †Marco Antonio por abrirme la puerta de su casa y de su corazón; a Rosa Calderón y Laura Lucero por su cariño.

Gracias a todos, sin ustedes esto no hubiera sido posible, y en especial a Dios por ser mi sostén en todo momento.

ÍNDICE

Resumen	8
Abstract	11
1. Introducción.....	14
2. Aspectos generales.....	18
2.1. Líquenes foliícolas	18
2.2. Hepáticas epífilas.....	21
2.3. Ceras cuticulares de las hojas.....	24
2.4. Humectabilidad de la superficie foliar	27
3. Antecedentes: características foliares y colonización de epífilos	31
4. Preguntas de investigación	34
5. Hipótesis.....	34
6. Objetivos	35
7. Materiales y métodos	36
7.1. Zona de estudio	36
7.2. Especies de helechos	37
7.3. Identificación del material recolectado	42
7.4. Longevidad foliar	43
7.5. Coberturas de epífilos.....	43
7.6. Humectabilidad de las superficies adaxiales foliares	46
7.7. Microtopografía al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).....	47
7.8. Composición química de las ceras cuticulares adaxiales foliares.....	48
7.8.1. Extracción de las ceras cuticulares.....	48
7.8.2. Análisis de los extractos de las ceras cuticulares por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	48
7.8.3. Análisis de los extractos de las ceras cuticulares por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución y espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-ESI-HRMS)	50
7.9. Análisis estadísticos.....	51
8. Resultados	53
8.1. Composición de epífilos	53

8.2. Longevidad foliar	56
8.3. Coberturas de epífilos en el tiempo.....	56
8.4. Humectabilidad de las superficies adaxiales foliares	70
8.5. Microtopografía de hojas de helechos al microscopio electrónico de barrido (MEB)...	71
8.6. Composición química de las ceras cuticulares adaxiales de helechos	72
9. Discusión.....	74
9.1. Composición de epífilos	74
9.2. Longevidad foliar y coberturas de epífilos	77
9.3. Humectabilidad, microtopografía de las hojas y coberturas de epífilos	81
10. Conclusiones.....	86
11. Sugerencias para estudios futuros	88
12. Referencias	89
13. Anexos	101
13.1. Ficha técnica de las láminas transparentes de plástico (control de la microtopografía)	101
13.2. Listado de líquenes foliícolas en la superficie adaxial de las pinnas de mayor edad de ocho taxa de helechos de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México	102
13.3. Líquenes foliícolas de la superficie adaxial de las pinnas de mayor edad de cada especie de helecho de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México	103
13.4a. Superficie adaxial de las pinnas de <i>G. rhachiflexuosa</i> con daños en el tejido	105
13.4b. Hoja de <i>G. rhachiflexuosa</i> dañada por herbivoría	106
13.5. Artículo publicado de la tesis. “Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico”. <i>Biochemical Systematics and Ecology</i> 85(2019):13-20	107

Resumen

Los epífilos son los organismos que colonizan la superficie adaxial de las hojas particularmente de las regiones tropicales húmedas. Consisten generalmente de líquenes foliícolas y hepáticas foliosas, y los metabolitos secundarios que producen pueden proteger a las hojas de la herbivoría y patógenos. Como en el éxito de su colonización pueden influir las características físicas y químicas foliares de los forófitos, en la presente tesis se investigó el impacto de la longevidad foliar, la composición química de las ceras cuticulares, la microtopografía y humectabilidad de las superficies adaxiales foliares de ocho especies de helechos (*Diplazium drepanolobium*, *Bolbitis portoricensis*, *Mickelia pergamentacea*, *Danaea nodosa*, *Polypodium rhachipterygium* y *Goniopteris rhachiflexuosa*, todos terrestres; *Mickelia bernoullii* y *Lomariopsis recurvata*, ambas hemiepífitas) sobre la cobertura de epífilos. Se usaron láminas de plástico como modelo control para evaluar el efecto de la microtopografía en la colonización de epífilos. Se plantearon como hipótesis: 1) que los taxa con menor longevidad foliar podrían ser colonizados por epífilos más rápido, 2) que las posibles diferencias químicas en las ceras cuticulares de los taxa podrían generar variación en la humectabilidad de las hojas entre las especies y 3) que la microtopografía de las superficies foliares pudiera repeler el agua y disminuir el establecimiento de los epífilos. Para lo cual, se determinó para cada especie la longevidad foliar, la cobertura y composición de epífilos en hojas de edades distintas. Se determinó la composición química de las ceras de hojas completamente expandidas y sin epífilos, por cromatografía de gases y de líquidos de ultra alta resolución, ambas acopladas a espectrometría de masas. Se determinó

la humectabilidad mediante el ángulo de contacto de la gota de agua y las superficies foliares. Todas las especies de helechos estudiadas presentaron líquenes, hepáticas y algas verdes, que colonizaron tempranamente las hojas de dos y cinco meses, con excepción de las algas que a esas edades sólo se encontraron en *M. pergamentacea*; sin embargo, en todas las especies los tres tipos de epífilos estuvieron en las pinnas de mayor edad (12-26 meses), predominando los líquenes, seguidos de las algas, mientras las hepáticas sólo fueron abundantes en *P. rhachipterygium*, probablemente porque crece en el hábitat más húmedo asociado a los ríos. Entre los taxa estudiados, la riqueza de líquenes fue mayor en las hojas más viejas de *D. nodosa* (27 spp.) en lo influyó su alta longevidad foliar, y representó el 53% de la mayor riqueza liquénica citada para la estación de "Los Tuxtlas" en hojas de angiospermas (*Astrocaryum mexicanum* y *Salacia megistophylla*, respectivamente 51 spp.). La cobertura de epífilos fue mayor en las especies de menor longevidad foliar (*P. rhachipterygium* y *D. drepanolobium*; 14.4 y 17.8 meses, respectivamente), seguidas de *B. portoricensis* (20.8 meses), y menor en particular en los taxa con mayor longevidad foliar (*L. recurvata*, *M. bernoullii* y *M. pergamentacea*; 33.9, 36.0 y 38.7 meses, respectivamente). Las superficies foliares de los taxa estudiados todas fueron hidrofílicas al tener ángulos de contacto en un rango de 62.5°-72.4°, por lo que, las diferencias que presentaron en la composición y el contenido químico de las ceras no generaron diferentes tipos de humectabilidad entre los taxa. Los helechos forófitos presentaron una microtopografía con ceras cuticulares lisas sin cristales de ceras y con pliegues cuticulares similares que favoreció la hidrofilia y la retención de agua, y pudo contribuir a la adhesión de los líquenes y hepáticas,

mediante el mucílago que producen soluble en agua. En contraste, la cobertura de epífilos fue baja en las láminas de plástico, probablemente porque sus superficies lisas favorecen el flujo del agua, debido a su menor grado de resistencia al movimiento de los fluidos. La presencia de metabolitos secundarios en las ceras cuticulares de la mayoría de las especies y la predominancia del ácido hexadecanoico en todos los taxa, pudieron limitar el crecimiento de los epífilos. Con los resultados obtenidos, es posible aceptar la hipótesis 1, y las hipótesis 2 y 3 se rechazaron. Se concluyó que las hojas con menor longevidad, la hidrofilia y microtopografía con pliegues de las hojas de los helechos hospederos favorecieron el establecimiento y crecimiento de epífilos.

Palabras clave: ceras cuticulares, epífilos, helechos, hidrofílicas, longevidad foliar, microtopografía foliar.

Abstract

The epiphyllous are the organisms that colonize the adaxial surface of the leaves, particularly in humid tropical regions. They are generally foliicolous lichens and leafy liverworts, and the secondary metabolites they produce can protect leaves from herbivory and pathogens. Since the phorophytes foliar physical and chemical characteristics may influence their colonization success, this thesis investigated the impact that the foliar life span, the chemical composition of the cuticular waxes, the microtopography and the wettability of foliar adaxial surfaces of eight species of ferns (*Diplazium drepanolobium*, *Bolbitis portoricensis*, *Mickelia pergamentacea*, *Danaea nodosa*, *Polypodium rhachipterygium* and *Goniopteris rhachiflexuosa*, all terrestrial; *Mickelia bernoullii* and *Lomariopsis recurvata*, both hemiepiphytic) have on the epiphyllous coverage. Plastic sheets were used as control model to evaluate the effect of the microtopography on the epiphyllous colonization. The hypothesis made were: 1) That the taxa with shorter foliar life span could be colonized by epiphyllous in a faster way, 2) That the possible chemical differences in the cuticular waxes of the taxa could generate variations in the wettability of the leaves among species, and 3) That the microtopography of the foliar surfaces could repel water and reduce the epiphyllous establishment. For each species, the foliar life span, and the coverage and composition of the epiphyllous on leaves of different ages, were determined. The chemical composition of the waxes of completely expanded and epiphyllous free leaves was determined using gas chromatography and high-resolution liquid chromatography, both coupled with mass spectrometry. The wettability was determined through the contact angle of the water drop and the foliar

surfaces. All the fern species studied had lichens, liverworts and green algae that had early colonized the leaves of two and five months old, except for the algae, which at those ages were only found on *M. pergamentacea*; nevertheless, the three kinds of epiphyllous were present on the older pinnae (12-26 months) of all species, lichens predominated, followed by algae, while liverworts were only abundant on *P. rhachipterygium*, probably because it grows in the most humid of habitats associated to rivers. Among the taxa studied, the richness of lichens was bigger on the oldest leaves of *D. nodosa* (27 spp.), representing the 53% of the highest richness of lichens cited for “Los Tuxtlas” station on angiosperm leaves (*Astrocaryum mexicanum* and *Salacia megistophylla*, respectively 51 spp.). The epiphyllous coverage was greater in less time for those with shorter foliar life span (*P. rhachipterygium* and *D. drepanolobium*; 14.4 and 17.8 meses, respectively), followed by *B. portoricensis* (20.8 months), and particularly less for those taxa with longer foliar life span (*L. recurvata*, *M. bernoullii* and *M. pergamentacea*; 33.9, 36.0 and 38.7 months, respectively). The foliar surfaces of the taxa studied were all hydrophilic, having contact angles in a range from 62.5° to 72.4°, so that the differences they showed in the waxes chemical composition and content did not produce different wettability among taxa. The phorophyte ferns showed a microtopography with smooth cuticular waxes, without wax crystals and with similar cuticular folds, which favored hydrophilia and water retention, and may contribute to lichens and liverworts adhesion through the water-soluble mucilage they produce. In contrast, the epiphyllous coverage was little on the plastic sheets, probably because their smooth surfaces favor the flux of water due to their lower degree of resistance to fluid movement. The presence of

secondary metabolites in most species cuticular waxes and the predominance of the hexadecanoic acid in all taxa, could limit the growth of epiphyllous. With the results obtained, it is possible to accept hypothesis 1, and hypotheses 2 and 3 were rejected. It was concluded that the leaves with shorter life span, the hydrophilia and the microtopography with folds of the host ferns leaves favored the establishment and growth of epiphyllous.

Key words: cuticular waxes, epiphyllous, ferns, foliar life span, foliar microtopography, hydrophilic.

1. Introducción

En las regiones tropicales húmedas, las hojas de las angiospermas y de los helechos son frecuentemente colonizadas por epífilos (Voglgruber, 2011), principalmente líquenes y hepáticas foliosas (Coley y Kursar, 1996), aunque también se pueden encontrar algas verdes, musgos, hongos no liquenizados, bacterias y cianobacterias (Lücking, 2008).

Los forófitos en cuyas hojas se establecen, crecen y multiplican los epífilos (Pinokiyo *et al.*, 2006), pueden ser beneficiados por las cianobacterias epífilas que fijan el nitrógeno atmosférico y lo incorporan hasta en un 25% a la hoja (Bentley, 1987). Por otro lado, los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antiherbivoría que producen los líquenes foliícolas y las hepáticas epífilas (Coley y Kursar, 1996), protegen a forófitos de importancia económica (p. ej. mango) (Pinokiyo *et al.*, 2006), y a las hojas de angiospermas de daños por hormigas cortadoras (Mueller y Wolf-Mueller, 1991), respectivamente. Sin embargo, al parecer las coberturas de epífilos pueden tener algún efecto negativo, ya que al retener la humedad sobre la hoja hospedera pueden favorecer la proliferación de microorganismos patógenos (Bentley, 1987). Así mismo, sus coberturas pueden interferir en la penetración de la luz sobre la hoja, aunque al parecer no reducen significativamente la fotosíntesis, ya que la mayor cobertura de epífilos ocurre en las hojas senescentes que tienen un menor aporte en la producción fotosintética (Hallen, 2005), y las zonas que cubren los epífilos es compensada por fotoaclimatación de la hoja (Wanek y Pörtl, 2005).

En el éxito del desarrollo de las comunidades de epífilos pueden influir factores abióticos como la luz, la precipitación, la temperatura, y especialmente la humedad del aire (Coley y Kursar, 1996; Frahm *et al.*, 2003; Lücking, 1998a), así como las características fisicoquímicas de las hojas del forófito (Coley y Kursar, 1996; Lücking, 1998a; Voglgruber, 2011). Una de las características foliares que ha influido considerablemente en las coberturas de epífilos es la longevidad foliar (Lücking, 1998a); ya que las especies de forófitos con hojas de vida corta generalmente han sido colonizadas más rápido que las especies de hojas de vida larga (Coley *et al.*, 1993; Coley y Kursar, 1996). Así mismo, al parecer la microestructura superficial lisa de las hojas y la presencia de ceras cuticulares no favorecen la sujeción de los epífilos (Coley y Kursar, 1996); sin embargo, al modificar la textura de la superficie adaxial de la hoja mediante un raspado ligero, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de colonización de líquenes o hepáticas epífilas (Coley *et al.*, 1993); y no se ha observado un efecto notable del tipo de venación, la prominencia y densidad de las venas en la colonización de líquenes (Lücking, 1998a). Por otro lado, el mecanismo de autolimpieza de las hojas (conocido como efecto loto), mediante el cual eliminan esporas, y disminuyen la proliferación de hongos patógenos y bacterias, puede afectar la adhesión de los epífilos a las superficies de las hojas (Dean y Smith, 1978; Riederer, 2006; Voglgruber, 2011). Este efecto es característico de las superficies foliares hidrofóbicas generadas por la alta complejidad microestructural y la composición química de las ceras cuticulares (Koch y Ensikat, 2008; Koch *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2003), que forman gotas de agua esféricas que son fácilmente removidas por el viento y la

gravedad (Wang *et al.*, 2015), y ruedan para arrastrar partículas (Barrantes, 2016); en contraste, las superficies de las hojas con una menor repelencia de agua, se sugiere que favorecen el establecimiento y desarrollo de las comunidades de epífilos (Ivey y De Silva, 2001). Así mismo, los cambios en la composición química de las ceras cuticulares de las hojas jóvenes y senescentes de forófitos de clima tropical, se han relacionado con las tasas de colonización de hepáticas y líquenes epífilos (Voglgruber, 2011); y con base a Holder (2007), es importante evaluar simultáneamente la química de las ceras de las hojas, la repelencia del agua y el desarrollo de las comunidades epífilas.

Por otro lado, el estudio de los epífilos y las hojas se puede ver obstaculizado por la variabilidad morfológica de la epidermis foliar y sus efectos bioquímicos (Monge-Nájera y Blanco, 1995); y el uso de superficies inertes (p. ej. plástico) puede ayudar a estudiar particulares aspectos de la ecología de los epífilos, sin la múltiple influencia de las características del forófito (Lücking, 1998c), como la relación de la microtopografía y la longevidad foliar con la cobertura de epífilos (Monge-Nájera y Blanco, 1995).

El efecto en la colonización de epífilos de las características foliares de los forófitos antes mencionadas ha sido poco investigado, y la mayoría de los trabajos se han enfocado principalmente en angiospermas (Coley *et al.*, 1993; Coley y Kursar, 1996; Lücking, 1998a; Monge-Nájera y Blanco, 1995; Voglgruber, 2011). De los estudios anteriores, solamente Lücking (1998a) ha incluido especies de helechos forófitos (*Diplazium ceratolepis* (Christ) Christ, *D. lindbergii* (Mett.) Christ, *Thelypteris gigantea* (Mett.) R.M. Tryon, *Salpichlaena volubilis* (Kaulf.) J. Sm., *Ctenitis subincisa* (Willd.) Ching), así

como Voglgruber (2011) (*Polybotrya cervina* (L.) Kaulf.); a pesar de que los helechos son el segundo grupo más diverso de plantas vasculares y sus hojas son especialmente abundantes en el sotobosque de los bosques tropicales (De Paiva *et al.*, 2018) representando hasta el 15% de la cobertura (Richardson y Walker, 2010). También resulta importante la interacción de los epífilos y las hojas de los forófitos, ya que quizás estos pueden influir en la ecología y evolución de las hojas hospederas (Wanek y Pörtl, 2005).

Por lo anterior, el objetivo general de la presente tesis fue: determinar las características foliares (longevidad foliar, microtopografía, ceras cuticulares e hidrofobicidad) de la superficie adaxial (superior) de ocho especies de helechos (seis terrestres y dos hemiepífitas) y su impacto en la colonización de epífilos, en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. Con esta tesis se contribuirá al conocimiento de la interacción de las hojas de los helechos hospederos con los organismos epífilos del sotobosque de la selva tropical, que permitirá conocer más acerca de cómo las características foliares de las especies de forófitos pueden influir en la cobertura y riqueza de la comunidad de epífilos.

2. Aspectos generales

2.1. Líquenes foliícolas

La diversidad de los líquenes foliícolas es significativa en los bosques tropicales húmedos (Lücking *et al.*, 2003; Mateus, 2011), y a nivel mundial se estima que haya más de 800 especies (Martínez-Colín, 2016). A los alrededores de la zona de estudio, Bárcenas (2007) enlistó 157 especies de líquenes foliícolas para los volcanes Santa Marta y San Martín Tuxtla, y en este último sitio registró cinco especies liquénicas en las hojas de helechos forófitos, pero no se menciona la identidad taxonómica de las especies de helechos. Así mismo, Martínez-Colín (2016) encontró 191 especies de líquenes foliícolas en las hojas de 13 especies de angiospermas en la estación de “Los Tuxtlas”.

El término foliícola hace referencia a los líquenes que se desarrollan sobre las hojas (Bárcenas, 2007), y con base en el lado de la hoja en que se encuentren, se les denomina hipófilos cuando crecen en la cara abaxial o epífilos en la cara adaxial, como ocurre en la mayoría de los foliícolas (Mateus, 2011). Por lo general, se considera que las especies de líquenes foliícolas no son patógenas y crecen supracuticularmente (Mateus, 2011), aunque algunas especies de líquenes foliícolas, como del género *Strigula* Fr. se desarrollan entre la cutícula y la epidermis de la hoja donde pueden causar daños (Martínez-Colín, 2016). Los líquenes foliícolas son poiquilohídricos; es decir, que su contenido de agua depende del estado hídrico del ambiente (De los Ríos, 2000); son una asociación simbiótica al estar constituidos por un hongo (micobionte) y uno o dos autótrofos algales y/o cianobacteriales (fotobiontes) (Herrera-Campos *et al.*, 2014). La mayoría de sus

micobiontes hacen simbiosis con algas verdes como *Cephaleuros* Kunze ex E. M. Fries y *Phycopeltis* Millardet (ambos Trentepohliales) (Nash, 2008). A través de esta asociación, el micobionte obtiene los carbohidratos provenientes de la fotosíntesis del fotobionte, y a su vez el micobionte le provee protección y mayor acceso a nutrientes y agua que permite al fotobionte extender su rango ecológico y geográfico (Pinokiyo *et al.*, 2006).

La apariencia del talo liquénico o del cuerpo vegetativo está básicamente determinada por el hongo (Huidobro *et al.*, 2014), y presenta principalmente forma de costra que le permite adherirse fuertemente a la superficie de la hoja, evitando que se desprenda de la superficie foliar (Lücking, 2008). Esta estructura es delgada, más o menos circular de unos cuantos milímetros de diámetro (Pinokiyo *et al.*, 2006); sin embargo, algunos géneros (*Coccocarpia* Pers., *Leptogium* (Ach.) Gray, *Parmeliella* Müll. Arg. y *Psoroma* Michx.) presentan hábitos de crecimiento microfolioso o de forma laminar, microescumuloso o escama, y filamentoso en el caso de algunas especies de *Coenogonium* Ehrenb. (Mateus, 2011). Los líquenes foliícolas tienen un ciclo de vida rápido de 24 a 36 meses y un crecimiento de 2 a 10 mm de diámetro por año, por lo tanto, se adecuan a las condiciones del sustrato a través de una rápida reproducción y efectiva propagación para colonizar nuevas hojas (Lücking, 2008). En su ciclo de vida sobre las hojas participan diásporas sexuales como los peritecios (con el himenio cerrado, que se abre por un poro para la diseminación de las esporas) y los apotecios (himenio expuesto, con mecanismos de dehiscencia específicos para liberar las esporas); así como diásporas asexuales (conidios, soredios e isidios) (Barreno y Pérez-Ortega, 2003; Herrera-Campos *et al.*,

2014; Huidobro *et al.*, 2014; Pinokiyo *et al.*, 2006). Sus estructuras de reproducción sexual corresponden al micobionte, ya que el alga sólo se multiplica vegetativamente en el interior del talo liquénico (Barreno y Pérez-Ortega, 2003; Herrera y Ulloa, 2004). Al contener a los dos biontes, los propágulos vegetativos disminuyen el problema de la liquenización entre el micobionte y el fotobionte en el ambiente y pueden servir como diásporas al establecer un talo nuevo, siendo el tipo de reproducción predominante en los líquenes foliícolas (Mateus, 2011). La dispersión de sus diásporas depende fundamentalmente de factores abióticos y no bióticos (Martínez-Colín, 2016), ya que se sugiere que las ascosporas pueden ser dispersadas a grandes distancias por las corrientes de aire (Pinokiyo *et al.*, 2006). La morfología de sus órganos reproductivos (p.ej. isidios en forma de disco), indica que se dispersan principalmente por el agua de lluvia, mediante el agua que corre sobre las hojas o son salpicados por las gotas de agua, y éste mecanismo puede ser efectivo en distancias cortas (0-70 cm) (Lücking y Bernecker-Lücking, 2002); por lo que muchos foliícolas llegan a compartir la misma hoja hospedera, y los más competitivos sustituyen a otros, y el recambio continuo de hojas impide que la sucesión de los líquenes foliícolas alcance su clímax (Martínez-Colín, 2016).

2.2. Hepáticas epífilas

En el sotobosque de los bosques tropicales húmedos, el aire continuamente saturado de agua, favorece el desarrollo de briofitas (*sensu lato*) en las hojas adultas o cercanas a la senescencia de helechos y plantas con flor (Arecaceae, Lauraceae y Rubiaceae) (Malombe *et al.*, 2016; Morales y Moreno, 2010), que alcanzan una diversidad mundial de 1000 especies de briofitas epífilas, de las cuales más del 95% son hepáticas de la familia Lejeuneaceae (Voglgruber, 2011).

Las hepáticas foliosas epífilas (Lejeuneaceae) se caracterizan por presentar un gametofito folioso con dos hileras de filidios dorsales y una hilera ventral de filidios más pequeña (anfigastrios) (Delgadillo-Moya y Cárdenas, 1990; Delgadillo-Moya y Juárez-Martínez, 2014; Mustelier y Reyes, 1992); y sobre la hoja del forófito pueden crecer 1 mm en 2 meses y hasta 4 mm en 2.6 meses (Olarinmoye, 1974). Al igual que los líquenes son poiquilohídricas (Estébanez *et al.*, 2011) y se caracterizan por no presentar un sistema vascular o de conducción verdadero, por lo que absorben, a través de toda su superficie por capilaridad, el agua y los minerales que obtienen de la humedad y el polvo atmosférico (Ardiles *et al.*, 2008).

En comparación con los líquenes, las hepáticas epífilas tienen una más alta demanda de nutrientes que es suministrada por los lixiviados de las hojas del forófito y su asociación con las cianobacterias (Voglgruber, 2011). Absorben en los estratos más bajos a los lixiviados que caen con la lluvia de las hojas de más arriba. Así, pueden retener dentro de 180 días al 57% del nitrógeno de la superficie foliar, por lo que son sumideros de nutrientes de la selva tropical (Wanek y Pörtl, 2005). Las hepáticas al ser ricas en terpenos y fenoles protegen a la hoja de la herbivoría (Coley

et al., 1993), en un experimento con plantas de *Citrus* L. y *Cyclanthus* Poit. ex A. Rich., fue removida la cobertura de epífilos (primariamente hepáticas), lo que incrementó de 2-3 veces la palatabilidad de las hojas por hormigas cortadoras (Mueller y Mueller, 1991). Para colonizar a las hojas, que son un microhábitat relativamente efímero con constantes cambios en la humedad y composición química (Kraichak, 2012), han desarrollado una serie de adaptaciones como ciclos de vida cortos, la producción de diásporas en un corto tiempo, la frecuente producción de yemas para la reproducción asexual (Frahm *et al.*, 2003), y la reducción del gametofito que se considera una característica neoténica de algunas hepáticas epífilas (*Metzgeriopsis* K. I. Goebel), ya que éste es reemplazado por protonema fotosintético (fase juvenil) sobre el cual se producen los órganos reproductivos (Frahm *et al.*, 2003; Gradstein y Wilson, 2008). Así mismo, para obtener agua de la superficie foliar donde viven, retienen el agua mediante lóbulos, células papilosas y los filidios imbricados. Para adherirse a las superficies de las hojas han desarrollado periantos aplanados formando tapetes y producen abundantes rizoides agrupados que forman “discos” (Kraichak, 2012) (Fig. 1). Cuando estos discos entran en contacto con las superficies de las hojas, los rizoides de cada agrupación se fusionan (Gradstein, 1997), aplanándose y presionando a la cutícula de la hoja, evitando que la hepática se desprenda o se lave fácilmente (Pessin, 1922) (Fig. 2). Además, se adhieren a la hoja mediante el mucílago que producen debajo de los filidios, del disco de rizoides y en las yemas, que es soluble en agua y muy adhesivo, y cuando se seca, se puede mezclar con el de otras especies, sin perder sus capacidades de adhesión (Frahm *et al.*, 2003; Voglgruber,

2011). Sólo los propágulos asexuales de las hepáticas epífilas son una adaptación específica del hábito epífilo ante la naturaleza efímera de las hojas de los forófitos (Kraichak 2012 y 2013).

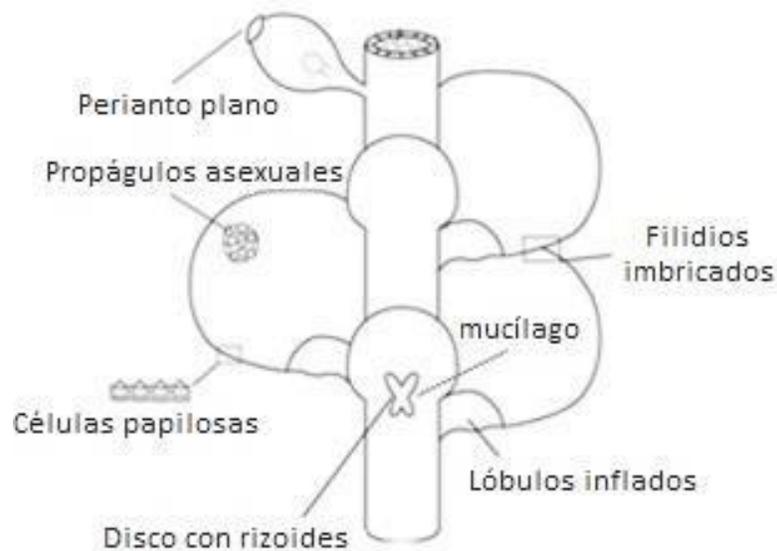


Fig. 1. Adaptaciones de las hepáticas epífilas (Lejeuneaceae) para colonizar las hojas (modificado de Kraichak, 2012).

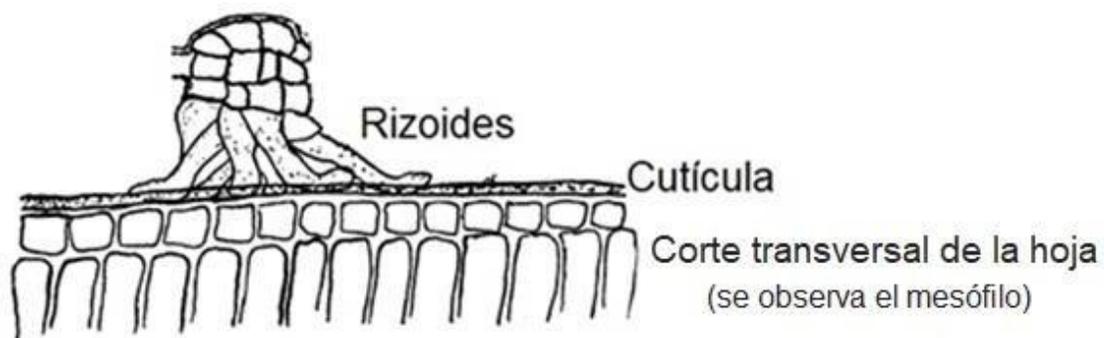


Fig. 2. Hepática con los rizoides presionados sobre la cutícula para sujetarse a la superficie foliar (Modificado de Pessin, 1922).

Las hepáticas epífilas se dispersan mediante propágulos asexuales (hojas y ramas caducas, yemas discoidales y la fragmentación del tallo) por medio de las gotas de lluvia para formar nuevos gametofitos (Reiner-Drehwald, 1995). Sin embargo, esa dispersión es limitada a menos de 120 cm, por lo que la dispersión a mayores distancias hasta varios kilómetros es por medio de esporas a través del viento (Delgadillo-Moya y Cárdenas, 1990).

Como los epífilos representativos (líquenes costrosos y hepáticas foliosas) utilizan a la hoja sólo como soporte, también pueden crecer en superficies inertes y sobre la piel y caparazones de animales (Frahm *et al.*, 2003; Nash, 2008; Pinokiyo *et al.*, 2006). Una excepción es la hepática *Radula flaccida* Lindenb. y Gottsche que se comporta como hemiparásita, ya que con sus rizoides penetran la cutícula de la hoja y la epidermis, obteniendo agua, fosfatos y otros minerales. Aunque no afecta la productividad de la hoja, en casos excepcionales la penetración permite la entrada de microorganismos patógenos (Eze y Berrie, 1977).

2.3. Ceras cuticulares de las hojas

Las partes aéreas de las plantas vasculares e incluso gametofitos de musgos, hepáticas y antoceros están limitadas por medio de una epidermis con una cutícula, la cual está compuesta de una capa polímera lipídica (cutina) y ceras (Jeffree, 2006).

Las ceras cuticulares son mezclas complejas de largas cadenas de compuestos alifáticos como ácidos grasos, n-alcanos, alcoholes, aldehídos, n-alkil ésteres, cetonas, compuestos fenólicos y terpenos (Dragota y Riederer, 2007; Tafolla-Arellano *et al.*, 2013) (Fig. 3). Varias propiedades de la cutícula están relacionadas con esas ceras. Las ceras intracuticulares principalmente sirven como

una barrera en la transpiración, mientras las ceras epicuticulares tienen la capacidad de repeler el agua de las hojas (Buschhaus y Jetter, 2011; Koch y Ensikat, 2008) y contribuyen a que la superficie se limpie y seque rápidamente para evitar la colonización de microorganismos patógenos (bacterias y hongos) (Riederer, 2006), así mismo, las ceras epicuticulares al promover la eliminación de agua de las superficies foliares, evitan la disminución de la fotosíntesis, debido a que la difusión del CO₂ es 10,000 veces más lento en agua que en el aire (Brewer y Smith, 1997; Holder, 2007 y 2011).

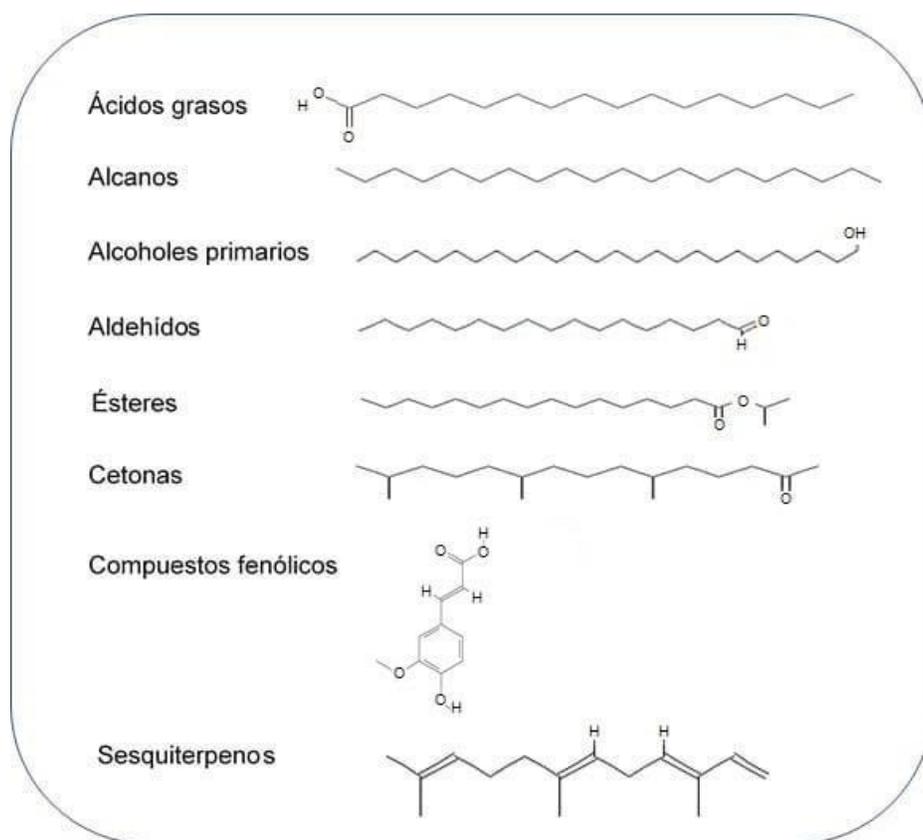


Fig. 3. Estructura química de los compuestos presentes en las ceras cuticulares de las plantas (PubChem, 2020).

La composición química de las ceras es altamente variable entre las especies de plantas, los órganos y sus etapas de desarrollo (Buschhaus y Jetter, 2011; Jetter y Schäffer, 2001). Así mismo, los cristales de cera tridimensionales (3D) (costras, gránulos, plaquetas, filamentos y túbulos) (Barthlott *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2009) no tienen una estructura y química estática (Jenks *et al.*, 1996; Rich, 1994). La forma tridimensional que adquieren los cristales de cera depende de la composición química, así como de los factores ambientales (temperatura, luz y agua) que también intervienen en su conformación y densidad (Koch *et al.*, 2006; Koch y Ensikat, 2008). En las ceras cuticulares de los helechos se han encontrado compuestos químicos característicos de las plantas con semilla, ya que básicamente se han descrito n-alcanos (C25-C33), ésteres de n-ácidos grasos de cadena larga (C26-C34) y alcoholes primarios de cadena larga (C23-C31), nonacosanos y triterpenos (Franich *et al.*, 1985). Entre los trabajos para el análisis de la composición y contenido químico de las ceras en helechos se encuentra el de Baker y Gaskin (1987), que en dos subespecies de *Pteridium* Gled. ex Scop. encontraron alquil ésteres (92%) junto con pequeñas cantidades de alcoholes primarios (2%) y alcanos (2%). En las ceras cuticulares de las hojas de *Osmunda regalis* L., se encontraron bajos contenidos de alcanos ($0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), alcoholes secundarios (0.2) y trazas de ácidos grasos, pero mayores contenidos de cetonas (6.1), alcoholes primarios (3.6) y aldehídos (2.7) (Jetter y Riederer, 2000). Las ceras de ocho taxa de *Equisetum* L. estuvieron constituidas de alcanos, ésteres, alcoholes primarios, ácidos grasos y aldehídos, y éstos últimos fueron los compuestos más abundantes (Brune y Haas, 2011). Finalmente, las ceras cuticulares de las hojas de

Polybotrya cervina (L.) Kaulf. presentaron alcanos (40%), ácidos grasos (19%) alcoholes primarios (0.1%) y esteroides (4.2%) (Voglgruber, 2011).

Algunas especies de helechos tuvieron compuestos cuticulares específicos; por ejemplo, mayores contenidos de ácido hexadecanoico en *Actiniopteris radiata* (Sw.) Link (Manubolu *et al.*, 2013); tres nuevos sesquiterpenos bicíclicos en *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott (Siems *et al.*, 1996); y en *Lophosoria quadripinnata* (J.F. Gmel.) C. Chr., se identificaron cinco grandes compuestos de tipo lipofílico identificados como triterpenos de tipo hopano, uno de ellos resultó ser un nuevo producto natural (Tanaka *et al.*, 1992). En ceras de helechos (subfam. Cheilantheoideae) se han encontrado cristales de flavonoides lipofílicos como las flavanonas (Scheele *et al.*, 1987).

2.4. Humectabilidad de la superficie foliar

La humectabilidad de las hojas es la cantidad de agua retenida sobre las superficies foliares originada del rocío, niebla y precipitación (Goldsmith *et al.*, 2017). La humectabilidad indica la afinidad del agua sobre la superficie de la hoja y se relaciona con la presencia de tricomas, la forma de las células, la densidad estomática, y las propiedades de las ceras como la composición química, el contenido y su complejidad microestructural, de los cuales se sugiere que depende más de este último (Wang *et al.*, 2015). La ultraestructura de los cristales de cera tridimensionales (3D), junto con los minerales y las sustancias insertadas debajo de la cutícula (Fig. 4), le confieren cierta complejidad estructural a la microtopografía de la hoja (Koch *et al.*, 2009), lo que hace más repelentes a las superficies. Por ejemplo, las hojas con células epidérmicas convexas forman espacios de aire entre la cutícula y la gota de agua, y son más repelentes al agua que las epidermis con

células planas (Wagner *et al.*, 2003; Yoshimitsu *et al.*, 2002). Así mismo, las hojas del género *Salvinia* Ség. (helecho acuático) son altamente repelentes al agua, debido a la gran complejidad de su microtopografía que consta de seis niveles estructurales (Fig. 5) (Koch *et al.*, 2009). Las hojas de loto (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) tienen una alta capacidad de autolimpiarse, por la presencia de cuatro niveles estructurales, que se conforman por células epidérmicas papilosas y ceras epicuticulares tubulares (Koch y Ensikat, 2008; Koch *et al.*, 2009), y a este proceso de autolimpieza se le conoce como efecto loto (Riederer, 2006). Las características superhidrofóbicas de las plantas, es una estrategia que han desarrollado para evitar la presencia de organismos patógenos (Koch y Ensikat, 2008).

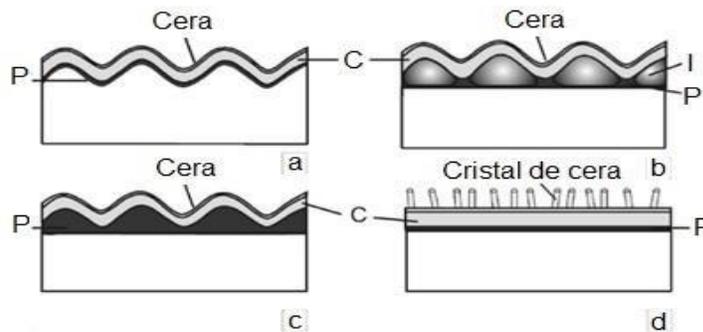


Fig. 4. Microtopografía epidérmica de la superficie foliar. a), b) y c): pliegues formados por la orientación paralela de las células epidérmicas, la inserción de minerales, y la acumulación de pectina subcuticular, respectivamente, d) ceras epicuticulares tridimensionales (3D). **P**=pectina, **C**=cutícula, **I**=inserción de minerales (modificado de Koch *et al.*, 2009).

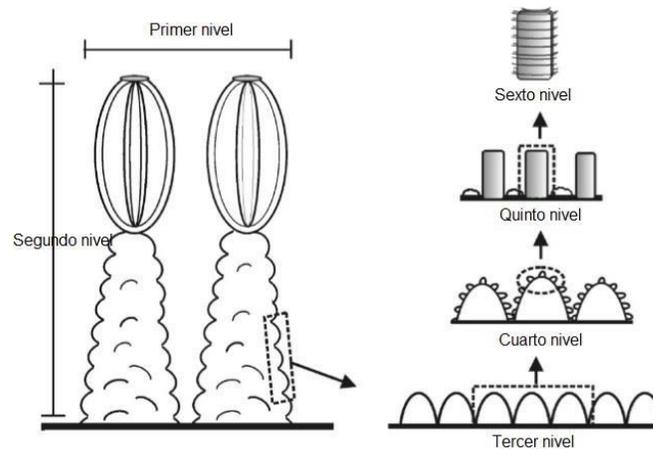


Fig. 5. Niveles estructurales de la epidermis de *Salvinia* Ség. 1° y 2° niveles con tricomas o pelos, 3° células epidérmicas convexas de los pelos, 4° pequeños cristales de ceras 3 D, 5° y 6° ceras cristalinas más grandes y transversales (modificado de Koch *et al.*, 2009).

La humectabilidad de las superficies de las hojas, comúnmente se mide a través del Ángulo de Contacto (AC) que se genera entre la gota de agua y la superficie sólida, a través de la interfase gaseosa (Fig. 6) (Wang *et al.*, 2015). Con base en Koch *et al.* (2008) la humectabilidad de la superficie foliar se clasifica en cuatro categorías: superhidrofílica ($AC < 10^\circ$), hidrofílica ($AC \geq 10^\circ$ y $\leq 89^\circ$), hidrofóbica ($AC \geq 90^\circ$ y $< 150^\circ$) y superhidrofóbica ($AC \geq 150^\circ$); y las microestructuras complejas (p. ej. papilas epidérmicas con cristales de cera 3D) contribuyen a la hidrofobicidad, y la menor complejidad estructural (p.ej. la presencia únicamente de células epidérmicas convexas) genera superficies hidrofílicas (Fig. 7). Así mismo, los factores ambientales (p. ej. la precipitación, la temperatura y la lluvia ácida) alteran las microestructuras de las hojas e influyen en el grado de humectabilidad (Wang *et al.*, 2015).

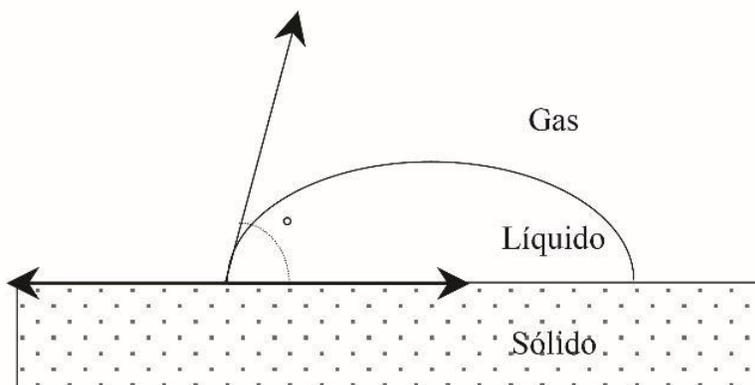


Fig. 6. Ángulo de contacto del agua interactuando con la fase sólida y gaseosa (modificado de Wang *et al.*, 2015).

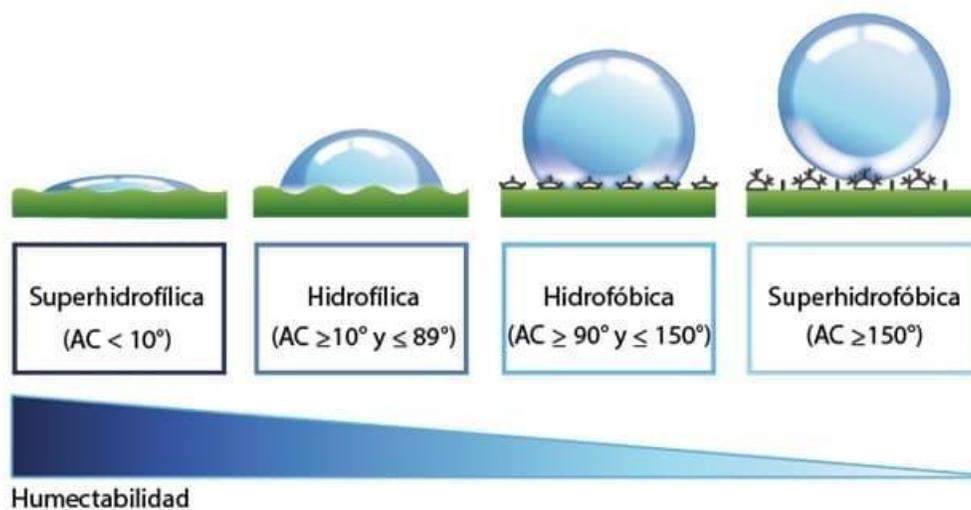


Fig. 7. Humectabilidad de la superficie y el ángulo de contacto que forman con base a la clasificación de Koch *et al.* (2008), mostrando la influencia de las microestructuras en el nivel de humectabilidad.

3. Antecedentes: características foliares y colonización de epífilos

Dentro de los pocos estudios que han investigado el efecto de las características foliares de los forófitos y la colonización de epífilos, se encuentran los trabajos de Coley *et al.* (1993) y Coley y Kursar (1996), quienes durante 12 meses encontraron diferencias significativas en las coberturas entre seis especies con distinta longevidad foliar, ya que las coberturas fueron superiores (27%) en la especie con menor edad foliar (*Alseis blackiana* Hemsl.; 12 meses) y menores (2 %) en la especie con mayor longevidad foliar (*Ouratea lucens* (Kunth) Engl.; 60 meses). Así mismo, Voglgruber (2011), al comparar la tasa de colonización de epífilos en un periodo de 18 meses, encontró que la especie con menor edad foliar (*Costus laevis* Ruiz & Pav.; 18.72 meses) presentó una mayor cobertura (28.03 %) que la de hojas más longevas (*Asplundia pittieri* (Woodson) Harling.; 52.08 meses) (4.8% de cobertura), y que el helecho *Polybotrya cervina* (L.) Kaulf. que fue la segunda especie con hojas más longevas (44.76 meses) (3.19%). Los autores de estos estudios concluyeron que las especies con hojas de vida corta, pueden acelerar la tasa de colonización de epífilos, mientras que los forófitos con mayor longevidad foliar pueden retrasarla. Lücking (1998a) reportó que el helecho *Salpichlaena volubilis* (Kaulf.) J. Sm., aunque no fue de las especies con hojas muy longevas (29 meses), fue la cuarta con mayor diversidad de foliícolas (≈ 90 spp.), argumentando que quizás se debió a la superficie foliar estriada que favoreció la sujeción de las hifas de los hongos en las depresiones de los surcos de sus venas. En el estudio de Voglgruber (2011) sobre el efecto de las ceras cuticulares en la colonización de epífilos, cita que en *P. cervina* los alcanos C29-C33 disminuyeron aproximadamente de 51% a 17% entre

las hojas completamente desarrolladas y senescentes, y a la inversa incrementaron los alcanos C_{29}, por lo que destacó que aquellas diferencias en los componentes químicos de las ceras entre hojas con distinto estadio ontogénico, pudieran estar afectando las tasas de colonización de epífilos.

Por otro lado, Monge-Nájera y Blanco (1995), quienes investigaron en la selva tropical durante nueve meses la colonización de briofitas sobre cinta plástica de dos tamaños y con formas diferentes (ápices con punta de gotero, plisadas, estrechas, margen dividido o discontinuo), sujetadas sobre láminas de madera y colgadas horizontalmente; encontraron que la cobertura no difirió considerablemente entre los dos tamaños y las distintas formas de las hojas; sin embargo, las superficies con pliegues presentaron mayores coberturas (11.5%) y fueron similares a las de hojas naturales (12%). Lücking y Bernecker-Lücking (2002) al estudiar por 36 meses en el bosque tropical, la colonización de líquenes entre hojas artificiales de polietileno con una topografía ondulada y fijadas con cierta inclinación y las hojas de forófitos, observaron que las diferencias de superficies no influyeron en la colonización de líquenes foliícolas, ya que la diversidad, abundancia y patrones sucesionales de los líquenes en las hojas artificiales fueron similares a las de las hojas naturales, con un total de 109 especies foliícolas y un promedio de 29 especies por hoja artificial, y la mayoría de los taxa que crecían en las hojas naturales estuvieron en las hojas artificiales con excepción de las especies de *Strigula* Fr. que crecen subcuticularmente. Lücking y Bernecker-Lücking (2005) y Monge-Nájera y Blanco (1995), al estudiar el efecto de los ápices en el crecimiento de las comunidades de epífilos, empleando hojas artificiales de plástico con ápices largos

acuminados y sin ápices con punta de gotero, no encontraron una variación en la colonización de epífilos.

Con base a todos estos antecedentes, en el presente proyecto de investigación se establecieron las siguientes preguntas de investigación e hipótesis.

4. Preguntas de investigación

- 1.- ¿Difiere la cobertura de epífilos de ocho especies de helechos con distinta longevidad foliar?
- 2.- ¿Difiere la composición y contenido químico de las ceras cuticulares de los taxa estudiados y cuál es su efecto sobre la hidrofobicidad de la superficie foliar?
- 3.- ¿Cuál es el efecto de la microtopografía foliar de las especies de helechos sobre el establecimiento de los epífilos?

5. Hipótesis

- 1.- **Si** las especies con hojas de vida corta se cubren por epífilos más rápido que las de vida larga, **entonces** se esperaría que los taxa con menor longevidad foliar pudieran tener coberturas mayores en menor tiempo que las especies de helechos con mayor longevidad foliar.
- 2.- **Si** la composición y el contenido químico de las ceras cuticulares pueden aumentar la hidrofobicidad de las hojas, **entonces** se esperaría que las posibles diferencias de estas características químicas en las hojas de las especies estudiadas disminuyeran la colonización por epífilos.
- 3.- **Si** la microtopografía de las ceras cuticulares de las hojas influye en la repelencia de agua, **entonces** se esperaría que las superficies foliares de los taxa estudiados pudieran ser hidrofóbicas y disminuyeran el establecimiento de las diásporas de los epífilos.

6. Objetivos

Objetivo general

- Determinar las características foliares (longevidad foliar, microtopografía, ceras cuticulares y humectabilidad) de ocho especies de helechos y su impacto en la colonización de epífilos en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtles”, Veracruz, México.

Objetivos específicos

1. Determinar la longevidad foliar de las ocho especies de helechos.
2. Determinar taxonómicamente los epífilos más representativos que colonizan la superficie adaxial de las hojas de los helechos.
3. Determinar la cobertura de epífilos y relacionarla con la longevidad foliar de las especies de helechos.
4. Determinar la composición y contenido químico de las ceras cuticulares adaxiales de las hojas de los helechos.
5. Determinar la microtopografía de la superficie foliar adaxial de las especies.
6. Determinar el grado de humectabilidad de la superficie foliar de los taxa.
7. Identificar las características foliares de las especies de helechos que favorezcan la cobertura de epífilos.

7. Materiales y métodos

7.1. Zona de estudio

El presente estudio se llevó a cabo de febrero 2017 a noviembre 2019 en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el municipio de San Andrés Tuxtla, al sur del estado de Veracruz ($18^{\circ}34' - 18^{\circ}36' \text{ N}$ y $95^{\circ}04' - 95^{\circ}09' \text{ O}$), con una extensión de 640 ha, y un rango altitudinal de 150-700 m.s.n.m. (Acebey *et al.*, 2015) (Fig. 8).

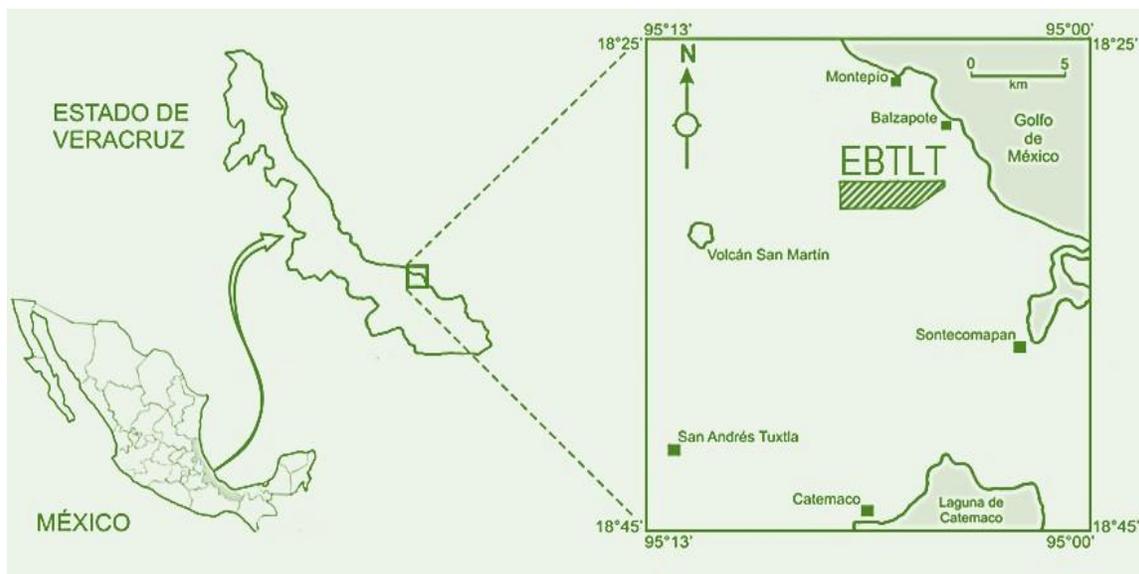


Fig. 8. Mapa de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” (EBTLT), Instituto de Biología (UNAM), Veracruz, México. Tomado de Martínez-Colín (2016).

La EBTLT presenta clima cálido-húmedo y una temperatura promedio anual de 27°C , siendo una de las regiones más lluviosas del país, con una precipitación anual cercana a los 5000 mm, la época de lluvias es de junio a febrero y de secas de marzo a mayo, de septiembre a febrero el área se ve afectada por el desplazamiento de masas de aire frío y húmedo provenientes del norte (Martínez-Colín, 2016). En

el área de estudio los suelos presentes son latosoles rojo arcillosos (Flores, 1971), que de acuerdo a la Base Referencial Mundial (WRB) son clasificados como Ferralsoles y Nitisoles (IUSS, 2015). El tipo de vegetación en la estación de “Los Tuxtlas” es la selva alta perennifolia, con árboles que superan los 30 m de altura, y la mayoría de la vegetación está representada por las familias Araceae, Bignoniaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Moraceae, Orchidaceae y Piperaceae (García-Guzmán y Dirzo, 2001).

7.2. Especies de helechos

En la zona de estudio se seleccionaron ocho especies de helechos de la selva alta perennifolia (seis terrestres y dos hemiepífitas) (Cuadro 1 y Fig. 9), que fueran abundantes debajo del sotobosque, que presentaran epífilos, y que probablemente tuvieran distinta longevidad foliar.

Cuadro 1. Especies de helechos estudiadas del sotobosque de la selva alta de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Ver., México. Familias según Christenhusz (2011). *= Especies hemiepífitas.

Familia	Especie
Athyriaceae	<i>Diplazium drepanolobium</i> A. R. Sm.
Dryopteridaceae	<i>Bolbitis portoricensis</i> (Spreng.) Hennisman * <i>Mickelia bernoullii</i> (Kuhn ex H. Christ) R.C. Moran, Labiak & Sundue <i>Mickelia pergamentacea</i> (Maxon) R.C. Moran, Labiak & Sundue
Lomariopsidaceae	* <i>Lomariopsis recurvata</i> Fée
Marattiaceae	<i>Danaea nodosa</i> (L.) Sm.
Polypodiaceae	<i>Polypodium rhachipterygium</i> Liebm.
Thelypteridaceae	<i>Goniopteris rhachiflexuosa</i> (Riba) Salino & T. E. Almeida



Fig. 9. Especies de helechos estudiadas en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Ver., México. **Terrestres:** **Dd)** *D. drepanolobium*, **Bp)** *B. portoricensis*, **Dn)** *D. nodosa*, **Mp)** *M. pergamentacea*, **Pr)** *P. rhachipterygium* y **Gr)** *G. rhachiflexuosa*. **Hemiepífitas:** **Mb)** *M. bernoullii* y **Lr)** *L. recurvata*.

Descripciones de las ocho especies de helechos según Mickel y Smith (2004), Morán y Riba (1995):

***Diplazium drepanolobium* A. R. Sm.**

Plantas *terrestres*; *hojas* de 75-130 cm de largo; *láminas* pinnado-pinnatífidas de 50-70 × 20-40 cm; *pinnas* de 18-20(-25) × (3.5)-4.5-10 cm, con los segmentos fuertemente falcados; *venas* libres; *soros* elongados generalmente simples; *indusios* enteros o diminutamente erosos.

Hábitat: en las zonas internas del sotobosque de la estación de “Los Tuxtlas”.

***Bolbitis portoricensis* (Spreng.) Hennipman**

Plantas *terrestres*; *hojas dimorfas* de 40-140 cm de largo; *láminas estériles* herbáceas, pinnado-pinnatífidas y hacia el ápice pinnatífidas de 15-80 × 7-50 cm, los ápices a menudo con yemas; *pinnas* de 3.5-30(-35) × 1.3-7 cm; *láminas fértiles* pinnadas; *venas* areoladas; *esporangios* cubriendo la superficie abaxial o algunas veces están a lo largo de las venas.

Hábitat: en las zonas internas del sotobosque y cerca de los potreros del área de estudio.

***Mickelia bernoullii* (Kuhn ex H. Christ) R.C. Moran, Labiak & Sundue**

Plantas *hemiepífitas*; *hojas dimorfas* de 60-135 cm de largo; *láminas estériles* pinnadas de 35-110 × 15-50 cm; *pinnas* de 9-26 × 2-4 cm; *láminas fértiles* pinnadas de 20-70 cm de largo; *venas* areoladas; *esporangios* cubriendo la superficie abaxial.

Hábitat: zonas internas del sotobosque, principalmente sobre los tallos de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. ex Mart. (chocho).

***Mickelia pergamentacea* (Maxon) R.C. Moran, Labiak & Sundue**

Plantas *terrestres*; *hojas dimorfas* de 50-140 cm de largo; *láminas estériles* pinnadas de 25-60 × 20-50 cm; *pinnas* terminales de 15-45 × 6-20 cm, *pinnas laterales* (8)13-32.5 × (2.5-)4-15 cm; *láminas fértiles* pinnadas de 12-45 cm de largo; *venas* finamente areoladas; *esporangios* cubriendo la superficie abaxial.

Hábitat: principalmente en las partes medias altas de las laderas de las cañadas de la estación.

***Lomariopsis recurvata* Fée**

Plantas *hemiepífitas*; *hojas dimorfas* de 39-130 cm de largo; *láminas estériles* pinnadas de 30-100 × 15-24 cm; *pinnas* de (8-) 9-15 × 2.2-2.7 cm; *láminas fértiles* pinnadas; *pinnas* de 10-15 × 0.2-0.3 cm; *venas libres*; *esporangios* cubriendo la superficie abaxial.

Hábitat: en las zonas internas del sotobosque, frecuentemente sobre los tallos de *A. mexicanum*.

***Danaea nodosa* (L.) Sm.**

Plantas *terrestres*; *hojas dimorfas* hasta de 2 m de altura y de 27 × 40 cm de ancho; *láminas estériles* pinnadas, coriáceas; *pinnas* de 14-34 × 3-4.5 cm; *láminas fértiles* similares a las estériles, aunque más estrechas; *venas* simples o una vez divididas; *sinangios* lineares.

Hábitat: en las partes medias altas de las laderas de las cañadas, y en cañadas poco profundas que colindaban con los potreros de la zona de estudio.

***Polypodium rhachipterygium* Liebm.**

Plantas *rupícolas*; *hojas* de 20-70 cm de largo; *láminas* pectinadas de 16-23 (-31) cm de ancho, con una larga pinna terminal; *pinnas* de 1.2-2.6 (-3.1) cm de ancho, ampliamente adnadas; *venas* formando una hilera de areolas, libres en el margen; *soros* elongado-oblongos.

Hábitat: en las rocas a lo largo de los ríos y en ocasiones sobre las rocas en medio de los caudales de la estación de “Los Tuxtlas”.

***Goniopteris rhachiflexuosa* (Riba) Salino & T. E. Almeida**

Plantas *terrestres*; *hojas* de 40-66 cm de largo; *láminas* pinnadas papiráceas a cartáceas de 18-44 x 17-28 cm; *ráquis* flexuosos; *pinnas* de 9.23 x 1.9-5 cm; *venas* meniscioides; *soros* sin indusios.

Hábitat: en el interior del sotobosque, principalmente a lo largo de los senderos de la estación de “Los Tuxtlas”.

Se recolectaron ejemplares de las ocho especies de helechos estudiadas con las técnicas propuestas por Lorea y Riba (1990) (Cuadro 2), y se resguardaron en el herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa (UAMIZ) (No. de depósitos 84424-84431) y de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (HUAP) (No. de depósitos 77483-77490).

Cuadro 2. Ejemplares recolectados de las especies estudiadas en “Los Tuxtlas”, Ver., Méx.

Especie	*Números de recolecta
<i>Polypodium rhachipterygium</i>	2654
<i>Danaea nodosa</i>	2655
<i>Mickelia bernoullii</i>	2656
<i>Mickelia pergamentacea</i>	2657
<i>Diplazium drepanolobium</i>	2658
<i>Bolbitis portoricensis</i>	2659
<i>Lomariopsis recurvata</i>	2660
<u><i>Goniopteris rhachiflexuosa</i></u>	<u>2661</u>

*= Colectores: A. Cerón-Carpio, B. Pérez-García, K. Mehltreter y J. A. Guerrero-Analco.

7.3. Identificación del material recolectado

La identificación taxonómica de los helechos seleccionados, se hizo con base en Mickel y Smith (2004), Morán y Riba (1995). Así mismo, para corroborar la identidad taxonómica de los tipos de epífilos, para las hepáticas foliosas se contó con la asesoría de la Dra. Catalina Juárez Martínez (com. pers. marzo, 2020), exacadémica de la Fac. de Ciencias, UNAM. Para las algas verdes, se consultó bibliografía relacionada (Binoy *et al.*, 2017; Binoy *et al.*, 2019) y se recibió la asesoría del Dr. Binoy T. Thomas (com. pers. marzo, 2020), del Departamento de Posgrado e Investigación en Botánica, Laboratorio de Phycotecnología, “Colegio Católico”, Kerala, India.

Para identificar taxonómicamente a los líquenes foliícolas, se realizó una estancia con la Dra. Rosa Emilia Pérez Pérez y la Biól. Paola Martínez Colín, del Departamento de Ecología y Taxonomía de líquenes, Facultad de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla. Para lo cual se observaron al microscopio electrónico talos liquénicos presentes en el lado adaxial de las pinnas de mayor edad de seis individuos (tres pinnas de cada uno) de cada especie de helecho. Se identificaron aquellos líquenes foliícolas que tuvieran estructuras reproductoras mediante literatura especializada (Lücking y Martínez-Colín, 2004; Lücking, 2008), y en algunos casos se realizaron cortes a las estructuras reproductoras y del talo liquénico con la técnica sugerida por Martínez-Colín (2016); se corroboró el estatus de los nombres científicos en la base de datos Mycobank.

7.4. Longevidad foliar

Para evaluar la longevidad foliar se realizaron diez salidas a la zona de estudio (agosto 2017-agosto 2019), aproximadamente cada cuatro meses. Se etiquetaron y enumeraron las hojas de 18 individuos de cada especie con cinta plástica que se usa para marcar (Voglgruber, 2011). En cada salida se contaron el número de hojas presentes, las nuevas o producidas, y los datos obtenidos se anotaban en el formato de campo diseñado para tales fines. Posteriormente para calcular la longevidad foliar (LF) de cada especie de helecho, con base en Tanner (1983) y Mehltreter y Palacios-Ríos (2003), se estimó dividiendo el promedio de hojas vivas (\bar{X}_{HV}) entre el total de hojas producidas (HP) por los 24 meses de estudio, como se observa en la fórmula siguiente: $LF = (\bar{X}_{HV}/HP) \cdot 24$ meses.

7.5. Coberturas de epífilos en el tiempo

De 40 individuos de cada especie, se marcó con cinta plástica una hoja que estuviera en cayado o recién expandida que se consideró como el mes cero. Posteriormente, de esas hojas marcadas se recolectaron pinnas cuando tuvieron las edades establecidas en la presente tesis (2, 5, 12, 16.5 y 26 meses); para lo cual, mediante un muestreo independiente, de cada especie se recolectaron de seis individuos al azar tres pinnas, una de cada zona de la hoja (basal, media y apical). Se colocaron dentro de sobres de papel, y se prensaron con la técnica sugerida para plantas dejándose secar a temperatura ambiente (Bárcenas, 2007; Delgadillo-Moya y Cárdenas, 1990). Por la distinta longevidad foliar de los taxa, la máxima edad de las pinnas recolectadas para *P. rhachipterygium* fue de 12 meses, para *D.*

drepanolobium y *B. portoricensis* de 16.5 meses, y para *G. rhachiflexuosa* de 23 meses. De los taxa hemiepífitos para disminuir las probables variaciones microclimáticas con respecto a las especies terrestres, sólo se recolectaron pinnas hasta los 2 m de altura (Komposch y Hafellner, 2000); ya que de acuerdo a Martínez-Colín (2016) en el sotobosque de la selva alta perennifolia la intensidad relativa de luz hasta los 10 m de altura es de 0-2 %, e incrementa considerablemente (5-100%) de los 10 m hasta los 60 m de altura.

En el laboratorio de Ecología Fisiológica (Instituto de Ecología, UNAM), se calcularon los porcentajes de cobertura por tipo de epífito (líquenes foliícolas, hepáticas foliosas y algas verdes), para cada edad de las pinnas recolectadas de los ocho taxa (648 pinnas en total). Para lo cual, de acuerdo con Coley *et al.* (1993) se consideró como cobertura el 6% de 1 mm² (0.0625 mm²) que estuviera cubierto por epífitos. Así mismo, se colocó sobre la cara adaxial de las pinnas una lámina de plástico transparente con una cuadrícula de 25 mm² (Roskoski, 1981); y en cada pinna se colocaron 9 cuadrantes (25 mm² cada uno) que se seleccionaron al azar; por lo tanto, se muestrearon en total 675 mm² para cada individuo por especie (tres pinnas por individuo). Las coberturas se observaron en un microscopio Nikon SMZ25/SMZ18, bajo un aumento de 3X-4X. Así mismo, debido a que en las superficies adaxiales de las pinnas se encontraron epífitos que no cumplían con el tamaño establecido como cobertura antes mencionado, principalmente algas verdes del género *Phycopeltis* y que eran frecuentes, se consideró calcular la probabilidad de colonización general y por tipo de epífito para cada edad de las pinnas (por especie seis individuos tres pinnas cada uno). Para lo cual, se

seleccionó al azar en cada pinna un cuadrante de 25 mm² (con 400 cuadros de 0.0625 mm² cada uno), y se contabilizó el número de cuadros que tuvieran presencia o ausencia de epífilos, incluyendo aquellos que no llenaran completamente el cuadro de 0.0625 mm², y que se pudieran observar al microscopio en los aumentos establecidos (3X-4X).

Para evaluar el efecto de la microtopografía en la colonización de epífilos, se usaron como control láminas transparentes de poliéster para proyección (3M CG3460) (Anexo 13.1) que consisten de tereftalato de polietileno (PET) (Briley, 1994). En cada uno de los cinco sitios donde crecían principalmente las especies de helechos, se colocaron 20 láminas cada una de 4 × 10 cm², tamaño que se estableció con base a la media del área foliar de las pinnas (n=18) y que se calculó con el programa ImageJ v. 1.50i. Los plásticos se fijaron entre dos cuerdas paralelas con una inclinación similar a las de las hojas de las especies en un ángulo aproximado de 40°, y a la altura media en la que se encontraban los taxa (70 cm) (Fig. 10). Posteriormente, con la misma técnica sugerida para las pinnas de los helechos, se recolectaron al azar de cada sitio, tres láminas de 4, 13 y 16 meses. Para calcular las coberturas de epífilos sobre los plásticos, se realizó de la misma manera que para las pinnas de los helechos estudiados.



Fig. 10. Láminas de plástico (control de la microtopografía) en “Los Tuxtlas”, Veracruz, México.

7.6. Humectabilidad de las superficies adaxiales foliares

En agosto de 2019, para cada especie de ocho individuos se recolectaron de cada uno al azar en bolsas de plástico herméticas tres pinnas jóvenes (cuatro meses) y sin epífilos. Inmediatamente después de haber sido recolectadas las pinnas, en las instalaciones del laboratorio de la Estación de Biología Tropical de “Los Tuxtlas” se cortaron fragmentos frescos de la parte media de las pinnas (2.5 × 2.0 cm), y se colocaron con la cara adaxial hacia arriba en un portaobjetos con cinta doble cara que se colocaron en una superficie horizontal. Se les añadió con una micropipeta una gota de agua destilada de 0.02 mL (3-4 mm de diámetro) (Neinhuis y Barthlott, 1997), y se tomaron fotos de las gotas de agua con una cámara digital réflex ESO Canon Reber T6 (Holder, 2011; López-Barrera *et al.*, 2007).

Posteriormente, se calculó el ángulo de contacto de las imágenes obtenidas (192 fotos) con el programa ImageJ (v. 1.50i); y para determinar la humectabilidad de las superficies se empleó la clasificación de Koch *et al.* (2008): superhidrofílica ($AC < 10^\circ$), hidrofílica ($AC \geq 10^\circ \text{ y } \leq 89^\circ$), hidrofóbica ($AC \geq 90^\circ \text{ y } < 150^\circ$) y superhidrofóbica ($AC \geq 150^\circ$).

7.7. Microtopografía al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

En octubre de 2017, se recolectaron en la zona de estudio y en bolsas de plástico herméticas, pinnas completamente expandidas y sin epífilos de las ocho especies. Posteriormente, con base en la técnica propuesta por Barthlott *et al.* (1998), en la estación de “Los Tuxtlas” se cortó de cada pinna un fragmento fresco de 1 cm^2 que se colocó sobre cinta carbón doble cara en un porta-muestra de aluminio tipo cilindro, y se dejaron secar a T° ambiente dentro de una caja de Petri. Inmediatamente se llevaron al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Depto. de Biología, UNAM, para su observación al microscopio electrónico de barrido (MEB), para lo cual, a los fragmentos una vez secos se les añadió oro paladio, usando una ionizadora Denton Vacuum Desk II sputter coater. Se observaron el tipo de ceras cuticulares presentes y se clasificaron con base a Barthlott *et al.* (1998); así mismo, se categorizó la ultraestructura adaxial de la epidermis de las hojas, tomando en cuenta los tipos de pliegues epidérmicos para helechos de Lellinger (2002).

7.8. Composición química de las ceras cuticulares adaxiales foliares

7.8.1. Extracción de las ceras cuticulares

En octubre de 2017, en la estación de “Los Tuxtlas” se recolectaron en bolsas herméticas, seis pinnas por triplicado de cada especie (64-584 cm² por réplica) (Jetter *et al.*, 2006) de hojas completamente expandidas, sanas y sin epífilos. En el laboratorio de la zona de estudio, inmediatamente se enjuagaron ligeramente con agua destilada para eliminar impurezas, y se dejaron secar a temperatura ambiente. De cada especie por réplica (seis pinnas), se realizaron diez enjuagues (con 12 mL cada uno) al lado adaxial con cloroformo (CHCl₃) y diez con metanol (CH₃OH), respectivamente (Voglgruber, 2011). Los extractos obtenidos se depositaron por separado en matraces y se trasladaron en una hielera con gel refrigerante al Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Ecología A.C. (Xalapa, Veracruz). Los extractos se concentraron a sequedad (hasta que el solvente se hubiera completamente evaporado) en un sistema de rotoevaporación a presión reducida (Büchi RII, Büchi, Suiza). Para calcular la cantidad de ceras total por réplica, el peso seco (µg) de cada extracto seco se dividió entre el área foliar calculada (cm²) por imágenes escaneadas de las pinnas con una escala con el programa ImageJ v. 1.50i

7.8.2. Análisis de los extractos de las ceras cuticulares por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Los análisis por CG-EM se realizaron con base en Camacho-Vázquez *et al.* (2019). Los extractos secos obtenidos con cloroformo (CHCl₃) (tres réplicas por especie), se disolvieron en 1 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) y se colocaron en viales CG de 2

mL. Posteriormente se agitaron de manera vigorosa en un vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Éstos se concentraron a sequedad con un evaporador de Nitrógeno (RapidVap/Vertex Evaporator, Labconco), 2 ciclos/5 min cada uno. Para realizar el análisis por CG-EM de compuestos de naturaleza ácida es conveniente formar los derivados sililados de los grupos que contienen protones ácidos, con el fin de mejorar el comportamiento cromatográfico y obtener picos más finos y simétricos. Como reactivo derivatizante se seleccionó al N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), ya que en la literatura se recomienda ampliamente por sus ventajas en la estabilidad de los derivados y la eficiencia de la reacción. Para las condiciones de reacción se seleccionaron: 150 μ L de una mezcla CH_2Cl_2 : MTBSTFA en proporción 2:1, temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ y tiempo de 30 minutos en un baño ultrasónico (Branson 2800, Cole Parmer). Para el análisis de las ceras cuticulares se utilizó un cromatógrafo de gases (GC-2010 Plus, Shimadzu) acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo sencillo e ionización por impacto electrónico a 70 mV (QP2010 Ultra Systema, Shimadzu, Europa). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna ZB-5MSi plus (30 m \times 0.25 mm DI \times 0.25 μm). Como gas de arrastre se utilizó gas helio a un flujo constante de 0.80 mL/min. Se inyectó 1 μ L de la muestra en modo "Split" con el inyector a 250 $^{\circ}\text{C}$ y para separar los componentes se utilizaron las siguientes condiciones: el horno se ajustó de forma inicial a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, incrementando la temperatura 4 $^{\circ}\text{C}$ por cada minuto hasta alcanzar los 250 $^{\circ}\text{C}$, manteniendo esta temperatura por 15 minutos. La fuente e interfase del espectrómetro de masas fue programado a 200 y 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Por otro lado, la detección espectrométrica de los analitos se

realizó en modo de barrido total del espectro (SCAN) con un rango de masa de 35 a 500 m/z. La identificación tentativa de los compuestos presentes en las ceras cuticulares detectables mediante CG-EM se realizó por comparación de sus huellas espectrométricas con aquellas previamente descritas en la librería NIST versión 2.0D, NIST/EPA/NIH (NIST05), considerando aquellos valores m/z cuyos índices de similitud eran mayores al 85%. Los n-alcános se identificaron por co-análisis y comparación de sus tiempos de retención y sus huellas espectrométricas con las de estándares comerciales (C₁₀-C₄₀) (marca: Fluka, cat. 68281-2 ML-F).

7.8.3. Análisis de los extractos de las ceras cuticulares por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución y espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-ESI-HRMS)

Los análisis por UPLC-ESI-HRMS (por sus siglas en inglés) se realizaron con base en Camacho-Vázquez *et al.* (2019). Los extractos secos metanólicos (tres réplicas por especie) se disolvieron en 1 mL de metanol (con 0.1 % de ácido fórmico) y se colocaron en viales UPLC de 1.5 mL. De cada muestra se inyectó 1 µL en un cromatógrafo de líquidos de ultra resolución modelo Acquity clase I, marca Waters (Waters™, Milford, Massachusetts) acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF, por sus siglas en inglés) modelo Synapt G2-Si HDMi de la marca Waters (Waters™, Milford, Massachusetts). La separación cromatografía se llevó a cabo en una columna Acquity BEH (1,7 µm, 2,1×50 mm) a una temperatura de columna y muestra de 40 y 15 °C, respectivamente. La fase móvil consistió en agua y acetonitrilo, ambos con 0.1% de ácido fórmico, con un flujo de 0.3 mL/min y se inyectó 2 µL de extracto. El gradiente de la fase móvil se

describe con base a su contenido de acetonitrilo en solución: 0-13 minutos, gradiente lineal 1-80%; 13-14 minutos, 80% isocrático; 14-15 minutos, gradiente lineal 80-1%. El análisis de espectrometría de masas se realizó con una fuente de ionización por electrospray (ESI por sus siglas en inglés) en modo negativo y positivo con voltaje de capilar, cono de muestreo y de compensación de fuente de 3,000, 40 y 80 V, respectivamente. La temperatura de la fuente fue de 100° C y la temperatura de desolvatación fue de 20° C. El flujo de gas de desolvatación fue de 600 L/h y la presión del nebulizador fue de 6.5 Bar. Como estándar interno de referencia se utilizó leucina-encefalina (556.2771, [M+H]⁺; 554.2615, [M-H]⁻). Las condiciones usadas para el análisis fueron: rango de masas 50-1, 200 Da, Función 1 CE de 6 V; Función 2 CER 10-30 V y tiempo de búsqueda de 0.5 seg. Los datos se adquirieron y procesaron con el software MassLynx (versión 4.1). La identificación tentativa de algunos compuestos se realizó con base en la masa exacta del ion *cuasi*-molecular y del patrón de fragmentación comparando con la base de datos pública Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) teniendo como criterio de búsqueda y aceptación un valor de error de masa < 5 ppm.

7.9. Análisis estadísticos

Para analizar las disimilitudes de la composición química de las ceras (obtenida con los extractos con CHCl₃), se hizo un análisis de agrupamiento con la función “hclust” con el programa R-Studio v.1.1.453, usando el índice de Bray-Curtis para cuantificar la disimilitud de los componentes químicos presentes en las ceras cuticulares de las ocho especies de helechos y el algoritmo de media aritmética no ponderada (UPGMA). Para determinar si había diferencias significativas en la mediana de la

longevidad de las hojas entre las especies se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, y las medianas se compararon con la prueba de Wilcoxon (Zar, 2010). Para cada una de las especies se estimaron las probabilidades de colonización de las pinnas por epífilos mediante Regresiones Logísticas realizadas con el programa JMP ver. 3.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La variable independiente fue la edad de las pinnas. También se estimaron las probabilidades de colonización por cada uno de los distintos tipos de epífilos encontrados (líquenes foliícolas, hepáticas foliosas y algas verdes), en este caso las variables independientes fueron la edad de las pinnas, el tipo de epífilos y su interacción. Para determinar si había diferencias significativas en el porcentaje de cobertura de epífilos entre los distintos meses para cada especie se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Bonferroni. Para evaluar si la longevidad foliar puede influir en el porcentaje de cobertura de epífilos, se hizo un Análisis de Regresión Polinomial entre el porcentaje de cobertura a los 12 meses y la longevidad foliar de los taxa. Además, para cada especie de helecho se probó el efecto del tipo de epífilo, la edad de las pinnas y de su interacción sobre los porcentajes de cobertura con un Análisis de Varianza de dos vías, y pruebas post-hoc de Tukey. Los porcentajes de cobertura se transformaron previamente a su arcoseno para cumplir con los supuestos del ANDEVA.

Para todos los análisis estadísticos, la significancia se consideró con una $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1. Composición de epífilos

Las comunidades de epífilos en los ocho taxa de helechos de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México, estuvieron constituidas principalmente por líquenes foliícolas, hepáticas foliosas, y por algas verdes de los géneros *Phycopeltis* Millardet y *Trentepohlia* Mart. (Trentepohliaceae) (Cuadro 3 y Fig. 11). Las hepáticas foliosas fueron principalmente juveniles en estado vegetativo con pocos filidios, y aunque estaban desarrolladas y ramificadas en las pinnas de 12 meses de *P. rhachipterygium*, formando extensos tapetes sobre las pinnas, no se observaron estructuras reproductoras, por lo que, no fue posible su identificación taxonómica. Con respecto a los líquenes foliícolas con estructuras reproductivas, se identificaron 8 familias, 16 géneros y 29 especies colonizando las hojas de mayor edad de los ocho taxa de helechos. Los géneros de líquenes foliícolas con mayor número de especies fueron *Porina* Ach. Kongl. y *Trichothelium* Müll. Arg. (ocho y seis especies, respectivamente) (Anexo 13.2). Las especies de helechos con mayor riqueza de líquenes foliícolas fueron *D. nodosa* y *D. drepanolobium* (27 spp. y 15 spp., respectivamente), el resto de los taxa presentaron de una a nueve especies (Cuadro 3 y Anexo 13.3). Los líquenes que predominaron en las especies de helechos fueron *Coenogonium subluteum* (Rehm) Kalb & Lücking que se encontró en todos los taxa a excepción de *G. rhachiflexuosa*, así como *Porina epiphylla* (Fée) Fée que colonizó las pinnas de cinco taxa (*D. drepanolobium*, *D. nodosa*, *L. recurvata*, *M. pergamentacea* y *M. bernoullii*) y *Porina rubentior* (Stirt.) Müll. Arg. que se encontró en cuatro taxa de los anteriores con

excepción de *M. bernoullii* y que también estuvo en *G. rhachiflexuosa* (Anexo 13.3; Fig. 12).

Cuadro 3. Epífilos presentes en las hojas de las especies de helechos estudiadas en “Los Tuxtlas”, Ver., Méx.

Especie	Tipo de epífilo		
	Líquenes foliícolas (especies)	Algas verdes	Hepáticas foliosas
<i>Diplazium drepanolobium</i>	15	<i>Phycopeltis</i> sp. <i>Trentepohlia</i> sp.	✓
<i>Bolbitis portoricensis</i>	1	<i>Phycopeltis</i> sp. <i>Trentepohlia</i> sp.	✓
<i>Mickelia bernoullii</i>	2	<i>Phycopeltis</i> sp.	✓
<i>Mickelia pergamentacea</i>	9	<i>Phycopeltis</i> sp. <i>Trentepohlia</i> sp.	✓
<i>Lomariopsis recurvata</i>	6	<i>Phycopeltis</i> sp.	✓
<i>Danaea nodosa</i>	27	<i>Phycopeltis</i> sp. <i>Trentepohlia</i> sp.	✓
<i>Polypodium rhachipterygium</i>	2	<i>Phycopeltis</i> sp. <i>Trentepohlia</i> sp.	✓
<i>Goniopteris rhachiflexuosa</i>	1	<i>Phycopeltis</i> sp. <i>Trentepohlia</i> sp.	✓

En las láminas de plástico transparente (control de la microtopografía), se encontraron los tres tipos de epífilos de las especies de helechos, es decir, líquenes foliícolas, hepáticas foliosas en desarrollo y algas verdes del género *Phycopeltis* (Fig. 11). Los talos liquénicos con estructuras reproductoras estaban en desarrollo y no tenían suficientes esporas por lo que no fue posible identificarlos taxonómicamente.

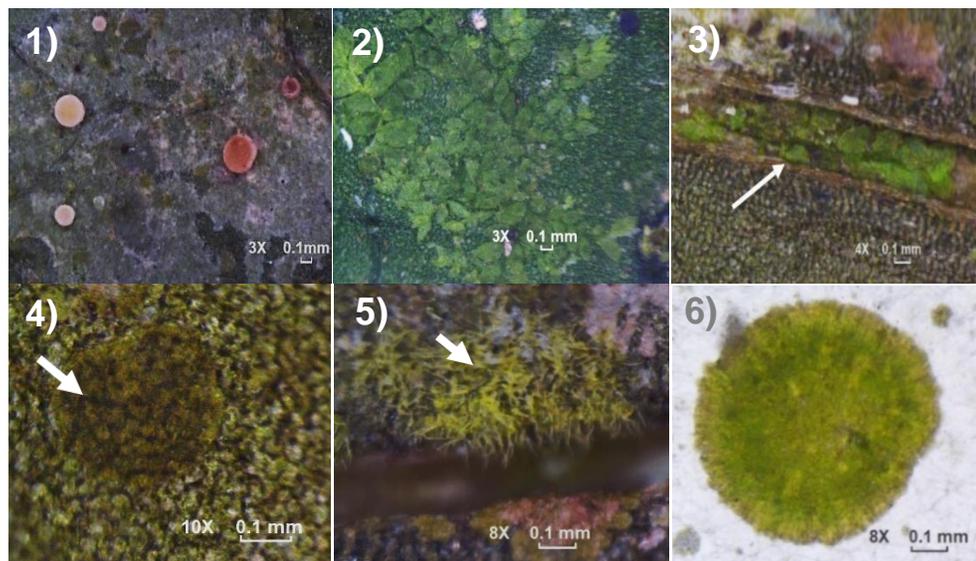


Fig.11. Epífilos en las pinnas de los taxa estudiados y en los plásticos. Pinnas: 1) Liquen foliícola con estructuras reproductoras (*C. subluteum*); 2 y 3) Hepática foliosa (extendida y en el surco de la vena, respectivamente); 4) Alga verde (*Phycopeltis* sp.) con talo circular y 5) Alga verde filamentosa (*Trentepohlia* sp.). Plástico transparente: 6) Alga verde (*Phycopeltis* sp.).

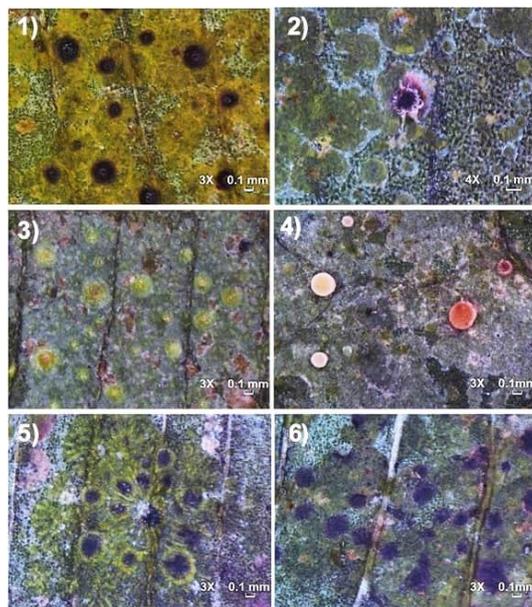


Fig.12. Líquenes foliícolas con estructuras reproductoras sobre la superficie foliar adaxial de los taxa estudiados. Porinaceae: 1) *Porina rubentior* (Stirt.) Müll. Arg., 2) *P. triseptata* (Vezda & Lüking) Lüking y 3) *P. epiphylla* (Fée) Fée. Pilocarpaceae: 4) *Coenogonium subluteum* (Rehm) Kalb & Lüking. Roccellaceae: 5) *Mazosia rotula* (Mont.) A. Massal. Arthoniaceae: 6) *Arthonia accolens* Stirt.

8.2. Longevidad foliar

La longevidad foliar varió significativamente entre las ocho especies de helechos ($p < 0.05$) ($H = 90.92$, $p = 0.0001$) en un rango de 14.4-38.8 meses. Siendo mayor en *M. pergamentacea* y en los dos taxa hemiepífitos (*M. bernoullii* y *L. recurvata*), intermedia en *D. nodosa* que fue mayor que en *G. rhachiflexuosa* y *B. portoricensis*, y menor en *D. drepanolobium* y *P. rhachipterygium* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Especies de helechos estudiadas ordenadas según su longevidad foliar en “Los Tuxtlas”, Veracruz, México.

Espece	Longevidad foliar (meses)
<i>Polypodium rhachipterygium</i>	14.4 ± 0.41 ^e
<i>Diplazium drepanolobium</i>	17.8 ± 0.38 ^{de}
<i>Bolbitis portoricensis</i>	20.8 ± 0.25 ^{cd}
<i>Goniopteris rhachiflexuosa</i>	24.8 ± 0.51 ^c
<i>Danaea nodosa</i>	30.7 ± 0.60 ^b
* <i>Lomariopsis recurvata</i>	33.9 ± 0.94 ^{ab}
* <i>Mickelia bernoullii</i>	36.0 ± 0.47 ^a
<i>Mickelia pergamentacea</i>	38.8 ± 0.93 ^a

Los resultados se expresan como los valores promedios ± DE, n=18. Letras distintas indican diferencias significativas en la longevidad foliar de los taxa ($p < 0.05$) ($H = 90.92$, $p = 0.0001$). * = Especies hemiepífitas.

8.3. Coberturas de epífilos en el tiempo

Las coberturas de epífilos incrementaron significativamente con la edad de las pinnas en todos los taxa (Cuadro 5 y Fig. 13). Los valores mayores a los 12 meses y 16.5 meses (6.44 % y 8.71 %) se observaron en los taxa con menor longevidad foliar (*P. rhachipterygium* y *D. drepanolobium*, respectivamente) (Cuadro 5 y Fig. 14), seguidas de *B. portoricensis* (4.09 %). Los taxa con más alta longevidad foliar

(*L. recurvata*, *M. bernoullii* y *M. pergamentacea*), presentaron mayores coberturas hasta los 26 meses (2.20 %, 2.30 % y 6.99 % respectivamente) y menores a los 12 meses que los taxa con menor longevidad foliar (Cuadro 5 y Fig. 14). De acuerdo a la longevidad foliar promedio de *P. rhachipterygium*, *D. drepanolobium* *B. portoricensis* y *D. nodosa* (Cuadro 4), sus coberturas de epífilos fueron significativamente mayores en los meses cercanos a su máxima edad foliar (Cuadro 5). En *G. rhachiflexuosa* también se observó la mayor cobertura cercana a su máxima edad foliar (Cuadro 4 y Cuadro 5), sin embargo, hasta los 23 meses en que fueron calculadas sus coberturas están fueron bajas (Fig.14).

Cuadro 5. Cobertura de epífilos entre las pinnas para cada especie de helecho estudiada.

Especies	Pinnas (meses)				
	2	5	12	16.5	26
	Cobertura de epífilos (%)				
<i>Polypodium rhachipterygium</i>	0.051 ± 0.074 ^b	0.057 ± 0.041 ^b	6.44 ± 4.95 ^a	-	-
<i>Diplazium drepanolobium</i>	0.023 ± 0.033 ^b	0.029 ± 0.046 ^b	4.91 ± 4.73 ^a	8.71 ± 3.69 ^a	-
<i>Bolbitis portoricensis</i>	0.012 ± 0.020 ^d	0.068 ± 0.068 ^c	1.68 ± 1.97 ^b	4.09 ± 1.95 ^a	-
<i>Goniopteris rhachiflexuosa</i>	0.009 ± 0.015 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.36 ± 0.37 ^a	0.46 ± 0.51 ^a	1.85 ± 1.89 ^a (23 meses)
<i>Danaea nodosa</i>	0.014 ± 0.03 ^d	0.049 ± 0.067 ^d	0.36 ± 0.40 ^c	1.49 ± 1.01 ^b	28.34 ± 18.12 ^a
* <i>Lomariopsis recurvata</i>	0.002 ± 0.004 ^c	0.029 ± 0.051 ^{bc}	0.34 ± 0.43 ^{ab}	0.78 ± 1.67 ^a	2.20 ± 3.20 ^a
* <i>Mickelia bernoullii</i>	0.002 ± 0.004 ^d	0.012 ± 0.022 ^{cd}	0.12 ± 0.18 ^{bc}	0.52 ± 1.01 ^b	2.30 ± 3.34 ^a
<i>Mickelia pergamentacea</i>	0.006 ± 0.011 ^e	0.052 ± 0.070 ^d	0.61 ± 0.53 ^c	1.53 ± 1.07 ^b	6.99 ± 5.34 ^a

Los resultados se expresan como los valores promedios ± DE, n=6 (3 réplicas) para cada mes. Los súper índices con letras distintas indican diferencias significativas en la cobertura de las pinnas para cada especie ($p < 0.05$). * = Especies hemiepífitas.

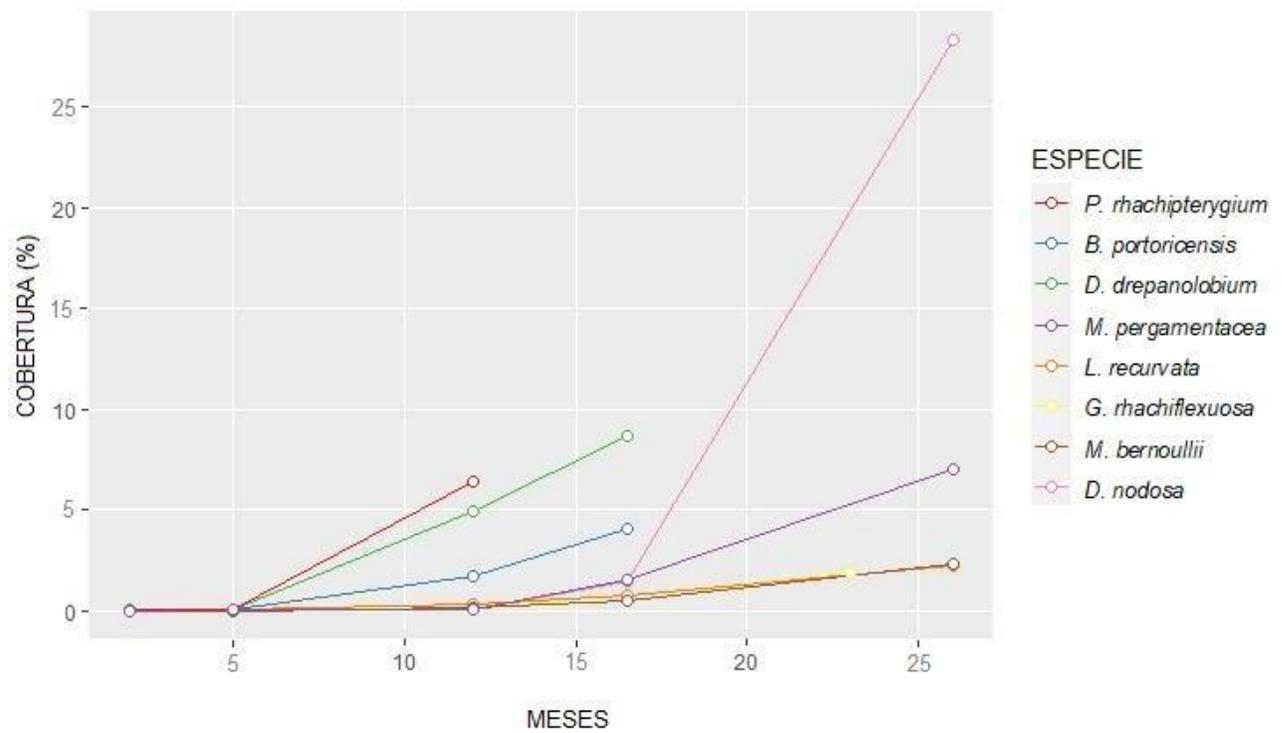


Fig. 13. Cobertura de epífilos entre las pinnas de distintos meses para cada especie de helecho estudiada.

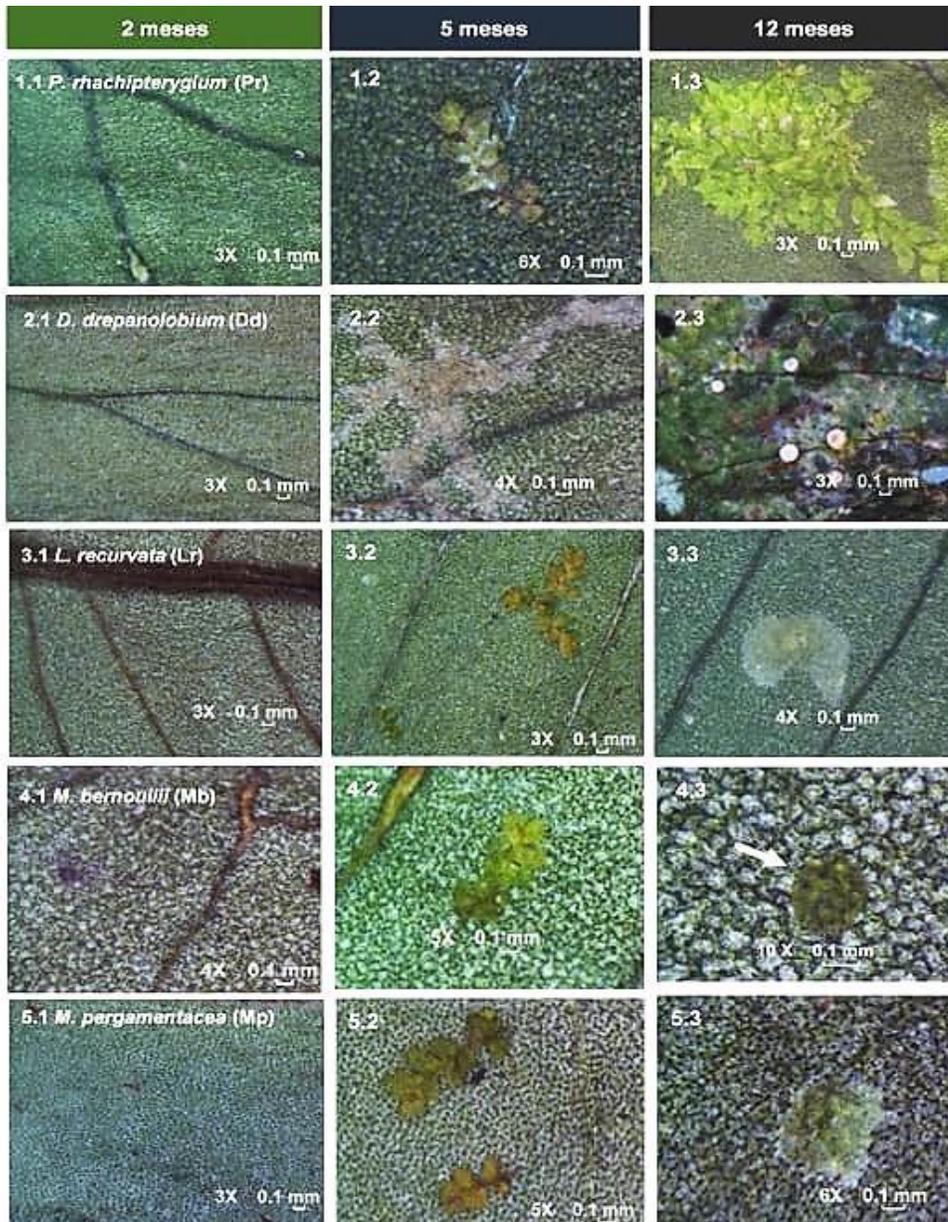


Fig. 14. Cobertura de epífilos en especies con menor (**Pr**= *P. rhachipterygium* y **Dd**= *D. drepanolobium*) y mayor longevidad foliar (**Lr**= *L. recurvata*, **Mb**= *M. bernoullii* y **Mp**= *M. pergamentacea*). A los dos meses se observan pinnas sin epífilos (1.1-5.1). A los 5 meses hepáticas foliosas en desarrollo y en **Dd** líquen en desarrollo (2.2). A los 12 meses **Pr** con hepática amplia (1.3) y en **Dd** líquen extendido con cuerpos fructíferos (2.3), **Lr** y **Mp** líquenes en desarrollo (3.3 y 5.3, respectivamente), y en **Mb** *Phycopeltis* sp. (4.3).

Mediante el análisis de regresión polinomial entre el porcentaje de cobertura a los 12 meses de todas las especies y la longevidad foliar de los taxa, se encontró que a menor longevidad foliar mayor cobertura y a mayor longevidad foliar la cobertura es menor (Fig. 15).

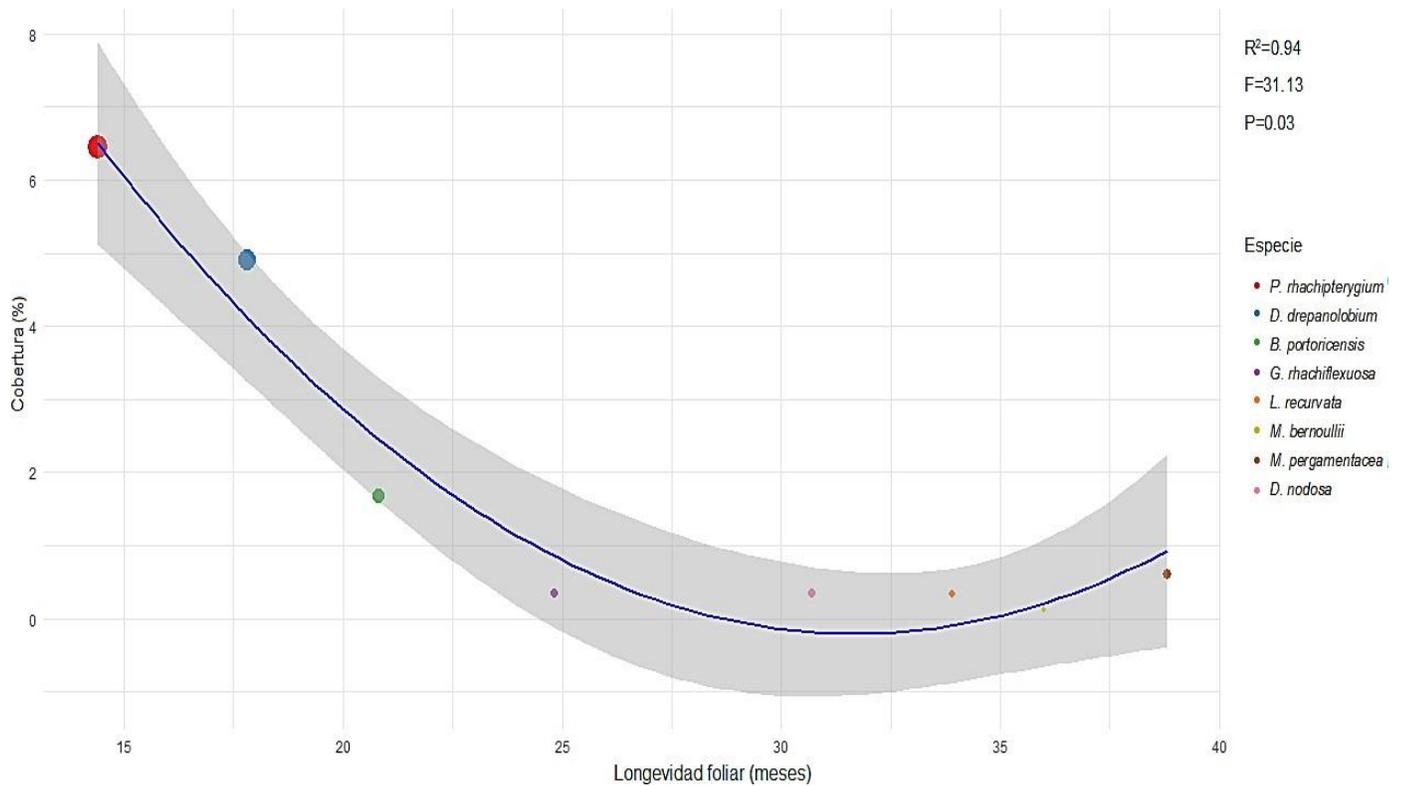


Fig. 15. Relación entre el porcentaje de cobertura (12 meses) y la longevidad foliar de las especies de helechos.

Por otro lado, el tipo de epífilos (líquenes, hepáticas y algas) y la edad de las pinnas determinaron diferencias significativas en los porcentajes de cobertura por tipo de epífilos en los ocho taxa. La interacción entre estas fuentes de variación también fue significativa en las especies de helechos, con excepción de las estimadas para *P. rhachipterygium*, *M. bernoullii* y *L. recurvata* (Cuadro 6). Las coberturas de hepáticas sólo fueron significativamente mayores a los 12 meses en *P. rhachipterygium*, y en el resto de los taxa en las pinnas de mayor edad (16.5, 23 y 26 meses), las coberturas de líquenes fueron significativamente más altas, seguidas de las algas verdes (Cuadro 7). La composición por tipo de epífilo cambió con la edad de las pinnas de los helechos forófitos. A los dos meses, los ocho taxa presentaron hepáticas en desarrollo, y las algas sólo colonizaron las pinnas de *M. pergamentacea*, y no se encontraron líquenes; sin embargo, en *P. rhachipterygium* se observaron en sus pinnas talos liquénicos en formación en zonas no muestreadas. A los cinco meses, las coberturas de líquenes estuvieron presentes en todas las especies a excepción de *G. rhachiflexuosa*. En las pinnas de mayor edad de todos los taxa se encontraron los tres tipos de epífilos (Cuadro 7). Además, a mayor edad de las pinnas, incrementó la presencia de líquenes con estructuras reproductoras en las pinnas de todas las especies de helechos (Cuadro 7).

Cuadro 6. Efecto del tipo de epífilo, de la edad de las pinnas y de su interacción en los porcentajes de cobertura por epífilos en ocho especies de helechos estudiadas. GL = grados de libertad; ns = no significativo ($p < 0.05$).

Especie	Fuente de variación	F	GL	Valor-P
<i>P. rhachipterygium</i>				
	Tipo de epífilo (T)	4.60	2, 53	0.0152
	Edad de las pinnas (E)	45.62	2, 53	0.0000
	T x E	1.62	4, 53	ns
<i>D. drepanolobium</i>				
	Tipo de epífilo	47.26	2, 71	0.0000
	Edad de las pinnas	44.57	3, 71	0.0000
	T x E	17.55	6, 71	0.0000
<i>D. nodosa</i>				
	Tipo de epífilo	30.30	2, 89	0.0000
	Edad de las pinnas	47.28	4, 89	0.0000
	T x E	23.14	8, 89	0.0000
<i>G. rhachiflexuosa</i>				
	Tipo de epífilo	7.50	2, 89	0.0011
	Edad de las pinnas	8.89	4, 89	0.0000
	T x E	2.64	8, 89	0.0133
<i>M. pergamentacea</i>				
	Tipo de epífilo	21.58	2, 89	0.0000
	Edad de las pinnas	37.51	4, 89	0.0000
	T x E	11.36	8, 89	0.0000
<i>B. portoricensis</i>				
	Tipo de epífilo	29.74	2, 71	0.0000
	Edad de las pinnas	31.25	3, 71	0.0000
	T x E	10.04	6, 71	0.0000
<i>M. bernoullii</i>				
	Tipo de epífilo	4.10	2, 89	0.0204
	Edad de las pinnas	6.84	4, 89	0.0001
	T x E	1.72	8, 89	ns
<i>L. recurvata</i>				
	Tipo de epífilo	4.49	2, 89	0.0144
	Edad de las pinnas	6.10	4, 89	0.0003
	T x E	1.24	8, 89	ns

Cuadro 7. Cobertura por tipo de epífito en las pinnas de edades diferentes de las ocho especies de helechos estudiadas en “Los Tuxtlas”, Veracruz, México.

Meses		% coberturas			
Especie		Hepáticas foliosas	Líquenes foliícolas	L-CER/L-SER	
					Algas verdes
<i>B. portoricensis</i>	2	0.012 ± 0.02 ^c	0 ± 0 ^c	0/0	0 ± 0 ^c
	5	0.002 ± 0.004 ^c	0.066 ± 0.07 ^c	0/0.066	0 ± 0 ^c
	12	0.017 ± 0.02 ^c	1.41 ± 1.7 ^b	0.34/1.07	0.247 ± 0.3 ^{bc}
	16.5	0.005 ± 0.01 ^c	3.13 ± 1.65^a	0.68/2.4	0.961 ± 0.86 ^b
<i>D. drepanolobium</i>	2	0.023 ± 0.03 ^d	0 ± 0 ^d	0/0	0 ± 0 ^d
	5	0.005 ± 0.008 ^d	0.025 ± 0.05 ^d	0/0.025	0 ± 0 ^d
	12	0.272 ± 0.54 ^{cd}	4.30 ± 4.2 ^b	1.26/3.04	0.350 ± 0.39 ^{cd}
	16.5	0.028 ± 0.03 ^d	7.74 ± 3.52^a	3.33/4.42	0.938 ± 0.66 ^c
<i>D. nodosa</i>	2	0.014 ± 0.03 ^c	0 ± 0 ^c	0/0	0 ± 0 ^c
	5	0.015 ± 0.04 ^c	0.034 ± 0.06 ^c	0/0.034	0 ± 0 ^c
	12	0.045 ± 0.11 ^c	0.079 ± 0.16 ^c	0/0.079	0.238 ± 0.33 ^{bc}
	16.5	0.014 ± 0.03 ^c	0.860 ± 1.07 ^{bc}	0.21/0.65	0.620 ± 0.51 ^{bc}
	26	0.080 ± 0.14 ^c	26.06 ± 18.26^a	20.4/5.6	2.20 ± 0.74 ^b
<i>G. rhachiflexuosa</i>	2	0.009 ± 0.02 ^{bc}	0 ± 0 ^d	0/0	0 ± 0 ^d
	5	0 ± 0 ^d	0 ± 0 ^d	0/0	0 ± 0 ^d
	12	0.008 ± 0.01 ^{bc}	0.105 ± 0.13 ^{bc}	0/0.105	0.248 ± 0.32 ^{abc}
	16.5	0 ± 0 ^d	0.171 ± 0.27 ^{bc}	0/0.171	0.293 ± 0.29 ^{abc}
	23	0.009 ± 0.02 ^{bc}	1.18 ± 1.44^a	0.25/0.93	0.654 ± 0.92 ^{ab}
<i>L. recurvata</i>	2	0.002 ± 0.004 ^b	0 ± 0 ^b	0/0	0 ± 0 ^b
	5	0.023 ± 0.04 ^b	0.006 ± 0.01 ^b	0/0.006	0 ± 0 ^b
	12	0.012 ± 0.03 ^b	0.267 ± 0.35 ^{ab}	0/0.267	0.060 ± 0.12 ^b
	16.5	0.002 ± 0.004 ^b	0.654 ± 1.56 ^{ab}	0.24/0.41	0.122 ± 0.15 ^{ab}

Continuación Cuadro 7

	26	0.136 ± 0.26 ^b	1.75 ± 2.82^a	0.60/1.15	0.318 ± 0.25 ^{ab}
<i>M. bernoullii</i>	2	0.002 ± 0.004 ^b	0 ± 0 ^b	0/0	0 ± 0 ^b
	5	0.008 ± 0.02 ^b	0.005 ± 0.008 ^b	0/0.005	0 ± 0 ^b
	12	0 ± 0 ^b	0.019 ± 0.05 ^b	0/0.019	0.097 ± 0.19 ^{ab}
	16.5	0 ± 0 ^b	0.403 ± 0.87 ^{ab}	0/0.403	0.122 ± 0.15 ^{ab}
	26	0.012 ± 0.03 ^b	1.68 ± 2.66^a	0.40/1.28	0.568 ± 0.69 ^{ab}
<i>M. pergamentacea</i>	2	0.005 ± 0.01 ^d	0 ± 0 ^d	0/0	0.002 ± 0.004 ^d
	5	0.031 ± 0.05 ^d	0.020 ± 0.02 ^d	0/0.020	0.002 ± 0.004 ^d
	12	0.031 ± 0.06 ^d	0.230 ± 0.28 ^{cd}	0/0.230	0.346 ± 0.34 ^{cd}
	16.5	0.160 ± 0.21 ^{cd}	0.451 ± 0.45 ^{cd}	0.009/0.44	0.918 ± 0.59 ^{bc}
	26	0.015 ± 0.03 ^d	4.79 ± 3.38^a	2.3/2.5	2.18 ± 2.11 ^b
<i>P. rhachipterygium</i>	2	0.051 ± 0.07 ^b	0 ± 0 ^b	0/0	0 ± 0 ^b
	5	0.054 ± 0.04 ^b	0.003 ± 0.008 ^b	0/0.003	0 ± 0 ^b
	12	3.576 ± 3.16^a	2.23 ± 2.51 ^{ab}	0.42/1.81	0.634 ± 0.39 ^{ab}

Los resultados se expresan como los valores promedios por tipo de epífilo ± DE, n = 6 (3 réplicas cada uno) para cada mes. Los súper índices con letras distintas indican diferencias significativas en las coberturas de cada especie (p<0.05). L-CER=Líquenes Con Estructuras Reproductoras. L-SER= Líquenes Sin Estructuras Reproductoras. Se resaltan los meses y el tipo de epífilo con mayor cobertura.

Con respecto a los análisis estadísticos sobre la probabilidad de colonización por epífilos de las ocho especies estudiadas, a diferencia de la cobertura (Cuadro 5 y Fig. 13), la probabilidad de colonización sólo mostró un ligero incremento a los 16.5 meses en *D. drepanolobium*, y a los 26 meses en *M. bernoullii* y *M. pergamentacea* (Fig. 16). Por otro lado, el tipo de epífilos y la edad de las pinnas determinaron

significativamente la probabilidad de colonización en cada una de las ocho especies de helechos estudiados, y su interacción también fue significativa a excepción de *B. portoricensis*, *M. bernoullii* y *M. pergamentacea* (Cuadro 9; Fig. 17). Las pinnas de mayor edad de todas las especies de helechos presentaron las más altas probabilidades de colonización por líquenes foliícolas, sin diferencias significativas con las probabilidades estimadas para las algas verdes en las pinnas de *L. recurvata*, *M. bernoullii*, *D. nodosa* y *G. rhachiflexuosa*, y las hepáticas sólo presentaron una probabilidad de colonización notable en las hojas de *P. rhachipterygium* (Fig. 17). *L. recurvata*, *M. bernoullii*, *D. nodosa* y *G. rhachiflexuosa* como se mencionó anteriormente, tuvieron una probabilidad de colonización similar por los líquenes y las algas verdes, sin embargo, en los porcentajes de cobertura calculados para estos taxa, los líquenes fueron predominantes seguidos de las algas verdes (Cuadro 7).

Cuadro 8. Efecto de la edad de las pinnas de ocho especies de helechos, sobre la probabilidad de su colonización por epífilos. Grados de libertad=1; significancia $p < 0.05$; * $p = 0.0001$, ** $p = 0.00001$.

Especie	ChiSquare de Wald	Valor-P
<i>B. portoricensis</i>	309.90	*
<i>D. nodosa</i>	2910.21	**
<i>D. drepanolobium</i>	750.00	*
<i>G. rhachiflexuosa</i>	209.94	*
<i>L. recurvata</i>	185.45	*
<i>M. bernoullii</i>	365.89	*
<i>M. pergamentacea</i>	911.96	*
<i>P. rhachipterygium</i>	267.43	*

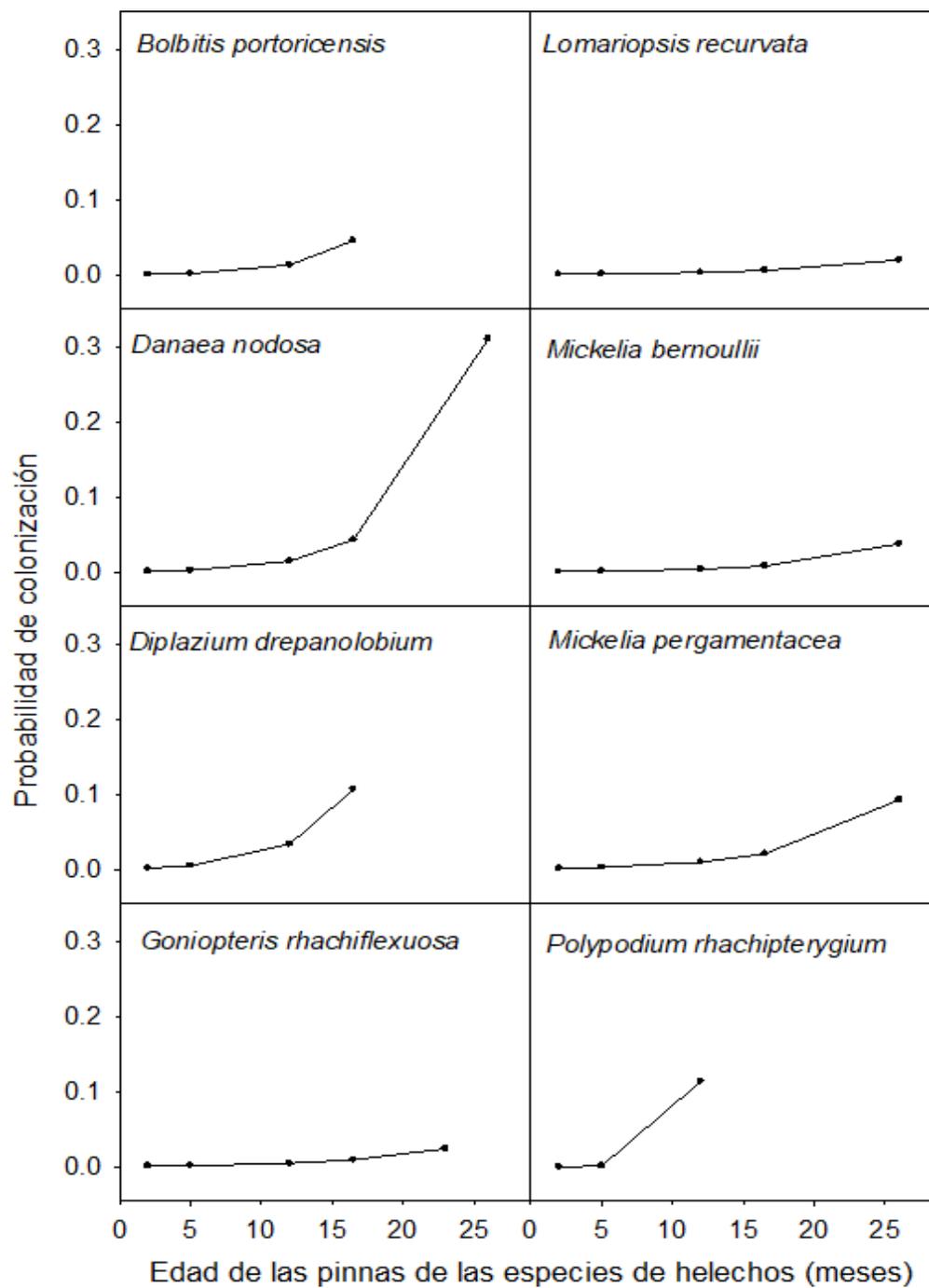


Fig. 16. Probabilidad de colonización por epífilos en las pinnas de ocho especies de helechos a lo largo del tiempo.

Cuadro 9. Efecto del tipo de epífilo, de la edad de las pinnas y de su interacción sobre la probabilidad de su colonización por epífilos en las ocho especies de helechos estudiadas. GL = grados de libertad; ns= no significativo ($p < 0.05$).

Espece	Fuente de variación	ChiSquare de Wald	GL	Valor-P
<i>B. portoricensis</i>	Tipo de epífilo (T)	118.61	2	0.0001
	Edad de las pinnas (E)	308.32	1	0.0001
	T x E			ns
<i>D. nodosa</i>	Tipo de epífilo	183.28	2	0.0001
	Edad de las pinnas	196.34	1	0.0001
	T x E	2731.01	2	0.0001
<i>D. drepanolobium</i>	Tipo de epífilo	172.48	2	0.0001
	Edad de las pinnas	111.79	1	0.0001
	T x E	25.86	2	0.0001
<i>G. rhachiflexuosa</i>	Tipo de epífilo	80.135	2	0.0001
	Edad de las pinnas	27.22	1	0.0001
	T x E	37.48	2	0.0001
<i>L. recurvata</i>	Tipo de epífilo	31.79	2	0.0001
	Edad de las pinnas	74.65	1	0.0001
	T x E	5.78	2	ns
<i>M. bernoullii</i>	Tipo de epífilo	22.69	2	0.0001
	Edad de las pinnas	0.07	1	0.0001
	T x E	22.51	2	ns
<i>M. pergamentacea</i>	Tipo de epífilo	311.34	2	0.0001
	Edad de las pinnas	74.22	1	0.0001
	T x E			ns
<i>P. rhachipterygium</i>	Tipo de epífilo	4.09	2	0.013
	Edad de las pinnas	4.07	1	0.043
	T x E	7.436	2	0.024

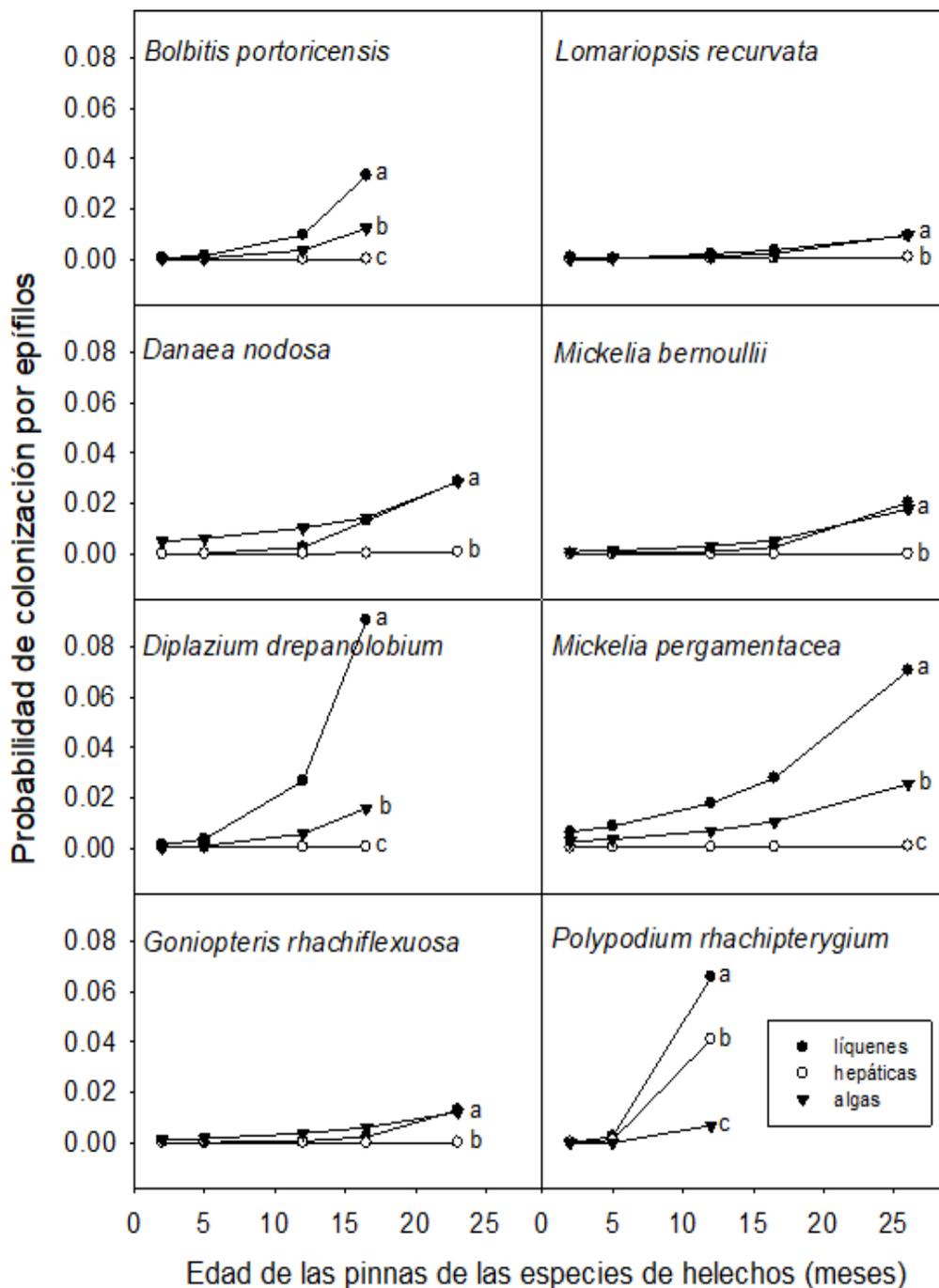


Fig. 17. Probabilidad de colonización por tres tipos de epífilos de las pinnas de ocho especies de helechos a lo largo del tiempo. Letras distintas indican diferencias significativas para cada especie ($p < 0.05$).

Las láminas de plástico transparente que se colocaron en la zona de estudio presentaron bajas coberturas de hepáticas foliosas, líquenes foliícolas y algas verdes (0.004-1.32%); así mismo, fue poca la cobertura de líquenes foliícolas con estructuras reproductoras (Cuadro 10).

Cuadro 10. Coberturas por epífilos en las láminas de plástico colocadas como control de la microtopografía en la Estación de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México.

Meses	Totales (%)	Tipo de epífilo (%)			
		Hepáticas foliosas	Líquenes foliícolas		Algas verdes
			L-CER/L-SER		
4	0.004 ± 0.01	0.002 ± 0.00	0.002 ± 0.00	0/0.002	0.0 ± 0.00
13	0.780 ± 1.19	0.013 ± 0.02	0.054 ± 0.07	0/0.054	0.713 ± 1.12
16	1.32 ± 2.23	0.035 ± 0.06	0.169 ± 0.27	0.06/0.106	1.12 ± 1.98

Los resultados se expresan como los valores promedios de la cobertura total y por tipo de epífilo ± DE, n=5 (3 réplicas cada uno). L-CER=Líquenes Con Estructuras Reproductoras; L-SER= Líquenes Sin Estructuras Reproductoras.

8.4. Humectabilidad de las superficies adaxiales foliares

El ángulo de contacto promedio de gotas de agua en las superficies adaxiales de las hojas de las ocho especies estuvo entre 62.51°- 72.39° (Fig. 18), por lo que según Koch *et al.* (2008) al presentar ángulos de contacto $\geq 10^\circ$ y $\leq 89^\circ$, las superficies adaxiales de todos los taxa se encontraron dentro de la categoría de “hidrofílicas”.

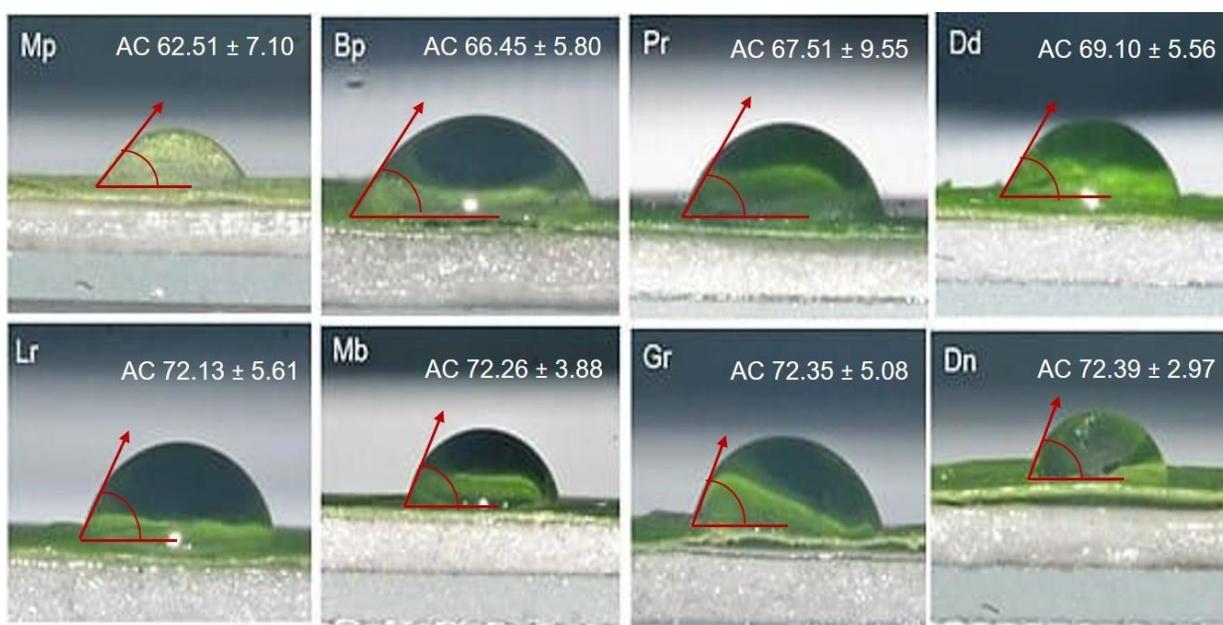


Fig. 18. Ángulos de contacto de gotas de agua en superficies adaxiales foliares de las especies de helechos estudiadas (en orden ascendente). Promedios de los ángulos \pm DE, n= 8 (3 pinnas de cada uno). **Mp**=*M. pergamentacea*, **Bp**=*B. portoricensis*, **Pr**= *P. rhachipterygium*, **Dd**=*D. drepanolobium*, **Lr**=*L. recurvata*, **Mb**=*M. bernoulli*, **Gr**=*G. rhachiflexuosa* y **Dn**=*D. nodosa*; AC=ángulo de contacto.

8.5. Microtopografía de hojas de helechos al microscopio electrónico de barrido (MEB)

La microtopografía de las ceras cuticulares de la superficie adaxial foliar de las ocho especies de helechos se caracterizó por ser simple, consistiendo de una película lisa sin microestructuras superpuestas como los cristales de ceras. Con base en la ultraestructura de la epidermis (paredes anticlinales), se observaron tres superficies (Lellinger, 2002): 1) con pliegues abundantes y delgados (Bp, Mp, y Lr), 2) con pliegues más separados y con las paredes anticlinales más gruesas formando una retícula (Dn), y 3) con una superficie irregular ligeramente rugosa (Mb, Pr, Dd y Gr) (Fig. 19).

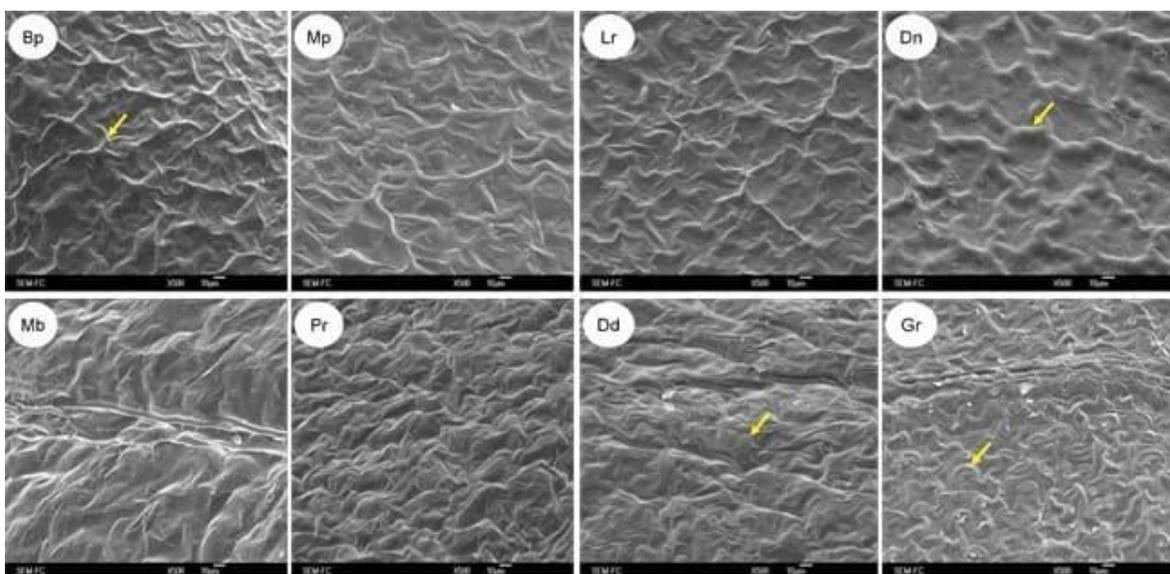


Fig. 19. Ceras cuticulares adaxiales foliares de helechos al microscopio electrónico de barrido. 1. **(Bp)** *B. portoricensis*, **(Mp)** *M. pergamentacea*, **(Lr)** *L. recurvata* con conspicuos pliegues delgados. 2. **(Dn)** *D. nodosa*, con pliegues más gruesos y la superficie reticulada. 3. **(Mb)** *M. bernoullii*, **(Pr)** *P. rhachipterygium*, **(Dd)** *D. drepanolobium* y **(Gr)** *G. rhachiflexuosa*, con una superficie irregular ligeramente rugosa. En **Dd** y **Gr** se observan los lóbulos de las células epidérmicas.

8.6. Composición química de las ceras cuticulares adaxiales de helechos

Como los resultados del estudio de la composición química de las ceras cuticulares y la microtopografía al MEB de las ocho especies de helechos se publicaron previamente (Cerón-Carpio *et al.*, 2019, Anexo 13.5), aquí se resumen sólo brevemente. En las ocho especies la cantidad de ceras obtenidas en los extractos con cloroformo (CHCl_3) fue en un intervalo promedio de 21-740 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Mediante CG-EM en las ceras cuticulares de los ocho taxa se encontraron altas cantidades de ácidos grasos (68-91% del total de las ceras), de los cuales el ácido hexadecanoico (30.7-48.2%) y octadecanoico (20.7-32.1%) fueron predominantes. En menores cantidades las ceras presentaron alcanos (6.2-13.2%), aldehídos (<11.3%), ésteres (<4.1%), cetonas (<1.4%) y alcoholes primarios (<1.0%). En adición se encontraron cuatro metabolitos secundarios, de los cuales tres fueron fenoles: el ácido benzoico presente en cinco taxa (*B. portoricensis*, *D. drepanolobium*, *L. recurvata*, *M. bernoullii* y *P. rhachipterygium*), así como el 2-etilfenol y el ácido cinámico exclusivos de *D. nodosa*; y un sesquiterpeno en *D. drepanolobium*.

Los taxa estudiados se separaron en tres grupos con base a la disimilitud de la composición química de las ceras cuticulares obtenidas con CHCl_3 , y destacó que las dos únicas especies con hábito hemiepífito y de distinto género (*L. recurvata* y *M. bernoullii*) se agruparon en el mismo grupo (Fig. 20).

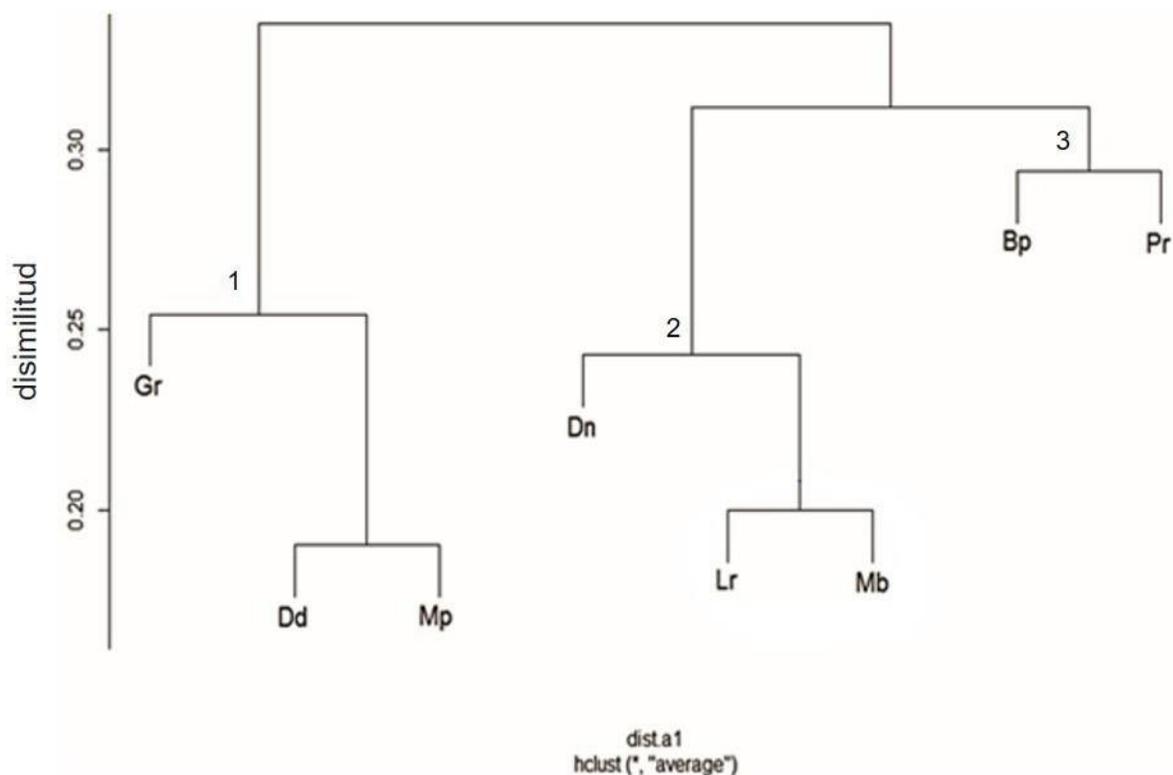


Fig. 20. Análisis de agrupamiento de las ceras cuticulares extraídas con CHCl_3 (correlación cofenética 0.605). 1) (**Gr**) *G. rhachiflexuosa*, (**Dd**) *D. drepanolobium* y (**Mp**) *M. pergamentacea*. 2) (**Dn**) *D. nodosa*, (**Lr**) *L. recurvata* y (**Mb**) *M. bernoullii* (hemiepífitas). 3) (**Bp**) *B. portoricensis* y (**Pr**) *P. rhachipterygium*.

Por otro lado, en los extractos obtenidos en metanol, la cantidad de ceras varió en un rango de 6-33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En el análisis por UPLC-ESI-HRMS en modo negativo se corroboró la identidad de dos componentes: el ácido felúrico (m/z 193.0497, error de masa= -2.1 ppm, fragmentos m/z 178.0263, 149.0588 y 134.0362) en *B. portoricensis* y un tipo flavonoide glucósidico (m/z 477.1759, error de masa= -0.4 ppm, fragmentos m/z 315.1222, 297.112 y 162.8386) en *M. bernoullii*.

9. Discusión

9.1. Composición de epífilos

Los líquenes son el componente dominante de las comunidades de epífilos de la selva alta (Lücking y Bernecker-Lücking, 2005). En la presente investigación también fueron el tipo de epífilo representativo en las hojas senescentes de las especies de helechos terrestres y hemiepífitas, a excepción de *P. rhachipterygium* en la que prevalecieron las hepáticas foliosas. Los ciclos de vida cortos de los líquenes de 12-36 meses corresponden con la longevidad de la hoja (Pinokiyo *et al.*, 2006). Esto coincidió con los resultados obtenidos, ya que las coberturas de líquenes con cuerpos fructíferos incrementaron en los helechos conforme sus hojas se acercaban a la etapa de senescencia; además, fueron mayores sus coberturas con estructuras reproductoras en los taxa con menor longevidad foliar (*P. rhachipterygium* y *D. drepanolobium*, <17.8 meses), y en *B. portoricensis* (20.8 meses); y de acuerdo a Lücking (1998a) los líquenes se reproducen rápido para colonizar con éxito las hojas de vida corta (<24 meses).

En las hojas de angiospermas en la estación de “Los Tuxtlas”, *Porina* Ach. es el género de líquenes más diverso, *Coenogonium subluteum* (Rehm) Kalb & Lücking que coloniza hojas de vida corta (12-24 meses) es la especie más representativa, y por otro lado *Mazosia rotula* (Mont.) A. Massal., sólo coloniza hojas de vida larga (76-101 meses) (Martínez-Colín, 2016). En el presente estudio de helechos, *Porina* también fue el género más diverso (ocho spp.), y *C. subluteum* estuvo en la mayoría de los taxa; sin embargo, colonizó hojas de cualquier longevidad (14.4-38.76 meses), y *M. rotula* se estableció en *D. nodosa* con hojas menos longevas (30.7

meses) que las angiospermas en “Los Tuxtlas”. De los taxa estudiados, fue considerable el número de especies liquénicas (27 spp.) de *D. nodosa*, ya que correspondió al 53% de la riqueza de líquenes foliícolas que Martínez-Colín (2016) citó para las hojas de angiospermas con mayor número de líquenes foliícolas en la estación de “Los Tuxtlas”, es decir, la palma *Astrocaryum mexicanum* Liebm. ex Mart. y el bejuco *Salacia megistophylla* Standl. (51 spp., respectivamente). La alta longevidad foliar de ambas especies de angiospermas se ha estimado de > 50 meses (Martínez-Colín *et al.*, 2021), y su mayor riqueza de especies foliícolas se ha correlacionado con su alta longevidad foliar que permite el tiempo suficiente para que ocurra la sucesión de las comunidades de líquenes foliícolas y que se desarrolle una composición particular de especies foliícolas (Martínez-Colín, 2016). Lücking (1998a) citó para las palmas del sotobosque una longevidad foliar de hasta 76 meses, y menciona que las preferencias de los líquenes foliícolas por las especies de forófito son generalmente bajas, pero que la alta riqueza de especies de foliícolas ocurre generalmente en hojas que tienen una longevidad de más de 24 meses; por lo que, la alta longevidad foliar (30.7 meses) de *D. nodosa* contribuyó al mayor número de especies liquénicas sobre sus hojas, y probablemente al observar pinnas de mayor edad cercanas a la senescencia en las especies con hojas más longevas (*L. recurvata*, *M. bernoullii* y *M. pergamentacea*) pudiera ser mayor el número de especies foliícolas. Contrario a lo anterior, los taxa que tuvieron una menor riqueza de especies foliícolas (<16 spp.), fueron las especies con menor longevidad foliar (*P. rhachipterygium*, *D. drepanolobium*, *B. portoricensis* y *G. rhachiflexuosa*) (<24 meses); y de acuerdo a Martínez-Colín (2016) los forófitos con hojas de vida corta

(entre 12 y 24 meses), tienden a tener pocas especies foliícolas que están adaptadas a una colonización rápida (p. ej. *Coenogonium subluteum*).

En la composición de epífilos algales, *Phycopeltis* spp. fue el segundo grupo importante en las hojas de la mayoría de los taxa. Esta alga verde es común en las hojas de los trópicos húmedos, donde vive de manera libre e incorporada al talo de los líquenes (Pinokiyo *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2015), y en éstos es el fotobionte común del sotobosque de la selva alta perennifolia (Martínez-Colín, 2016). Está presente en angiospermas y helechos (*Asplenium* L., *Blechnum spicant* (L.) Sm., *Dryopteris aemula* (Aiton) Kuntze, *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman, y *Pteridium* L., Rindi y Guiry, 2002; *Huperzia* Bernh., Zhou, 2007). La presencia de *Phycopeltis* en las especies de helechos estudiadas fue similar a la de los líquenes, ya que estuvo en las hojas de todos los taxa, y su probabilidad de colonización fue similar a las estimadas para los líquenes en las especies hemiepífitas y terrestres como *D. nodosa* y *G. rhachiflexuosa*. Aunque *Phycopeltis* es común en las hojas tropicales, ciertas características de las hojas no favorecen su presencia. Binoy *et al.* (2017) lo encontraron en 25 familias de angiospermas a excepción de Malvaceae, por la presencia de indumento como pelos estrellados, así como compuestos fenólicos (flavonoides) y terpenos; estos compuestos estuvieron en las ceras cuticulares de las especies investigadas y al parecer no interfirieron en la colonización de *Phycopeltis*.

Las hepáticas foliosas sólo predominaron en *P. rhachipterygium* que crecía a la orilla de los ríos. En el resto de los taxa estudiados que estaban más alejados de los ríos, las hepáticas prácticamente estuvieron ausentes y dominaron los líquenes. Al igual

que en el presente trabajo, Sonnleitner *et al.* (2009) quienes estudiaron las coberturas de hepáticas foliosas del sotobosque de la selva tropical de Costa Rica, observaron que éstas fueron inferiores en las laderas con menor humedad y mayores en las cañadas con una humedad ligeramente más alta, concluyendo que este factor abiótico influyó en su crecimiento. Voglgruber (2011) confirmó estos resultados, ya que los taxa que crecían en las laderas con menor humedad, entre ellos *P. cervina*, presentaron mayores coberturas de líquenes que de hepáticas foliosas. Lo anterior coincide con el mejor crecimiento de las hepáticas foliosas en hábitats muy húmedos (Coley *et al.*, 1993; Coley y Kursar, 1996), especialmente a lo largo de las corrientes de agua (Frahm *et al.*, 2003), porque cuentan con filidios generalmente uniestratificados (Delgadillo-Moya y Juárez-Martínez, 2014) con los cuales absorben el agua por capilaridad (Ardiles *et al.*, 2008). Además, las hepáticas requieren de una alta y constante disponibilidad de agua para realizar su actividad fotosintética, mientras que los líquenes la realizan mejor con menor contenido de agua y se reduce con altas cantidades de agua (Coley y Kursar 1996). Finalmente, la predominancia de hepáticas en *P. rhachipterygium* pudo afectar el crecimiento de los líquenes, ya que al parecer pueden desplazar a éstos e incluso también a las algas (Mežaka *et al.*, 2019).

9.2. Longevidad foliar y coberturas de epífilos

Los helechos de la selva tropical tienen una longevidad foliar promedio de 18-28.8 meses (Lücking, 2008) y hasta 44.76 meses (Voglgruber, 2011). En el presente estudio, la longevidad foliar de helechos varió dentro del rango anterior, a excepción de *P. rhachipterygium* (14.4 meses) que tuvo hojas ligeramente menos longevas, pero

todavía dentro del rango mencionado para plantas vasculares tropicales (14.4-73.2 meses) (Lücking, 2008). *Danaea nodosa* fue una de las especies con mayor longevidad foliar con un promedio 30.7 meses. Para la misma especie, Sharpe y Mehltreter (2010) citaron una longevidad foliar de 42 meses en una selva tropical de Puerto Rico. En “Los Tuxtlas”, sólo algunos individuos alcanzaron una longevidad comparable entre 38.4-45.6 meses, lo que indica que, independientemente de la variación entre individuos que posiblemente están creciendo en diferentes microhábitats, de acuerdo con Kikuzawa y Lechowicz (2011) la longevidad foliar para una misma especie puede variar sustancialmente entre sitios con diferentes características ambientales (luz, precipitación, nutrientes del suelo, etc.).

La cobertura de epífilos en los taxa estudiados fue menor en los primeros meses e incrementó con la edad de las pinnas; y en las especies en las que fue posible evaluar las coberturas de epífilos en pinnas con edades cercanas al límite de su longevidad foliar promedio (*P. rhachipterygium*, *D. drepanolobium*, *B. portoricensis* y *D. nodosa*), incrementaron considerablemente la cobertura de epífilos en los últimos meses que les quedaba de vida a sus hojas (1.3-4.7 meses). Esto se ha observado en otros estudios, en los que la edad de la hoja ha jugado un papel importante en la cobertura de epífilos (Mežaka *et al.*, 2019), que incrementa con el tiempo (Mueller y Wolf-Mueller, 1991; Coley y Kursar, 1996), siendo inicialmente lenta seguida por un periodo de crecimiento acelerado (Voglgruber, 2011), conforme la hoja se acerca a la senescencia (Coley *et al.*, 1993). Así mismo, en *P. rhachipterygium* y *D. drepanolobium* (ambas con menor edad foliar), fue mayor el porcentaje de cobertura de epífilos a los 12 y 16.5 meses,

respectivamente, seguidas de *B. portoricensis* que presentó una longevidad foliar similar a la de *D. drepanolobium*; en particular en las especies con más alta longevidad foliar (*L. recurvata* y *M. bernoullii*, ambas hemiepífitas, y *M. pergamentacea*), los valores de cobertura fueron bajos a los 26 meses, y *M. pergamentacea* hasta los 26 meses alcanzó la misma cobertura que en menor tiempo (12 meses) presentó *P. rhachipterygium*. Así mismo, mediante el análisis de regresión polinomial entre la cobertura a los 12 meses y la longevidad foliar, la cobertura fue mayor en las especies con menor longevidad foliar que el resto con hojas más longevas. Por lo que, pudo influir la longevidad foliar de los helechos estudiados en las coberturas de epífilos, la cual de acuerdo con Coley *et al.* (1993), Lücking (1998a y b) y Voglgruber (2011) ha sido una de las características foliares de los forófitos que se han relacionado más con la cobertura de epífilos. En otros estudios, también se han encontrado diferencias significativas en la cobertura de epífilos entre especies con hojas de distinta longevidad foliar. Forófitos de clima tropical con menor longevidad foliar (*Alseis blackiana*, 12 meses; y *Costus laevis*, 18.7 meses) en 12 y 18 meses respectivamente, se colonizaron más rápido (27% y 28.03%) que los de mayor longevidad foliar (*Ouratea lucens*, 60 meses; y *Asplundia pittieri*, 52.08 meses) con coberturas apenas del 2% y 4.8% cada una (Coley *et al.*, 1993; Coley y Kursar, 1996; Voglgruber, 2011). En estos estudios los porcentajes de cobertura mencionados para las especies con menor longevidad foliar, se calcularon a los 12 y 18 meses cuando se encontraban en su máxima edad foliar; y se ha observado que la cobertura incrementa conforme las hojas se acercan más a la senescencia (Coley *et al.*, 1993). Probablemente al calcular coberturas de epífilos

en la máxima edad foliar de las especies estudiadas con menor longevidad foliar, los porcentajes de cobertura de epífilos pudieran ser mayores.

Las diferencias en la tasa de colonización de epífilos entre las hojas de forófitos con distinta longevidad foliar, se deben supuestamente a que las hojas longevas tienen mejores defensas físicas (pelos, glándulas) y químicas (Coley y Kursar, 1996; Coley y Barone, 1996) que las protegen contra la herbivoría, organismos patógenos y el ambiente (Coley *et al.*, 1993; Coley y Kursar, 1996). Estos mecanismos de defensa, al parecer son una adaptación específica de las hojas longevas para retrasar la colonización (Coley *et al.*, 1993; Lücking, 1998a), ya que no les conviene una cobertura considerable de epífilos en un corto tiempo (Coley *et al.*, 1993). Sin embargo, en la presente tesis *Mickelia pergamentacea* que fue la especie con hojas más longevas, al parecer no estuvo mejor defendida que el resto de las especies de helechos, aunque tuvo un alto contenido de ácido hexadecanoico (48.2%), no presentó compuestos fenólicos y su composición química fue muy similar a *D. drepanolobium* con menor longevidad foliar, por lo que esto habría que confirmarlo. Por otro lado, el impacto de la longevidad foliar sobre las coberturas de epífilos no fue muy notorio en *G. rhachiflexuosa*, ya que tuvo una longevidad foliar intermedia, pero su cobertura fue baja. Esta última especie presentó una alta herbivoría desde las hojas en desarrollo hasta las de mayor edad; así como daños severos causados por un hongo (Dr. Carlos A. Contreras Paredes, com. pers. 2019) (Anexos 13.4a y b); y en “Los Tuxtlas” se ha citado en sus hojas un alto porcentaje de hojas infectadas y dañadas por hongos (García-Guzmán y Dirzo, 2001); y de acuerdo a De Paiva *et al.* (2018) aunque no citan el porcentaje de herbivoría, mencionan que

en la zona de estudio sus hojas son dañadas por *Atta cephalotes* (L.) (hormigas arrieras). El efecto de la herbivoría en la colonización de epífilos ha sido poco estudiado, al respecto Monge-Nájera (1989) no encontró que las coberturas de hepáticas epífilas fueran afectadas por la herbivoría en las hojas de *Piper* L. Sin embargo, se ha observado que las hojas con márgenes continuos, es decir, poco sinuosas, son importantes para que el diámetro del talo liquénico pueda crecer antes de alcanzar el margen de la hoja, y hay especies liquénicas que no producen cuerpos fructíferos hasta que el talo ha alcanzado cierto diámetro (Lücking, 1998a); así mismo, la disponibilidad de superficie es importante para el arribo de los propágulos vegetativos de los epífilos (Monge-Nájera y Blanco, 1995). Por lo que, probablemente la alta pérdida y daño del tejido foliar de *G. rhachiflexuosa*, que disminuyó considerablemente la continuidad del margen de sus hojas y la superficie, pudo contribuir en su baja cobertura de epífilos, lo cual se podría corroborar en estudios futuros.

9.3. Humectabilidad, microtopografía de las hojas y coberturas de epífilos

Con base a Sridar *et al.* (2014), en las selvas tropicales donde la lluvia es abundante, las hojas requieren reducir la humectabilidad para evitar la acumulación de agua, ésta propiedad se ha estudiado menos en las hojas tropicales, y se han citado para algunas especies (*Moringa oleifera* Lam., *Euphorbia milii* Des Moul., *Caesalpinia ferrea* Mart.) superficies adaxiales hidrofóbicas y superhidrofóbicas con ángulos de contacto $>140^\circ$ hasta 151° . Se consideró que las hojas de las especies de helechos estudiadas que crecen en la selva tropical, probablemente pudieran ser repelentes

al agua, pero todas fueron hidrofílicas al tener ángulos de contacto en un rango de 62.51°- 72.39°. De acuerdo a Neinhuis y Barthlott (1997) es menos común la presencia de hojas hidrofóbicas en las zonas tropicales, ya que la lluvia erosiona los cristales de ceras tridimensionales (3 D) que influyen considerablemente en la hidrofobicidad de las hojas. Estas microestructuras 3 D estuvieron ausentes en las hojas de los ocho taxa, y su microtopografía simple con ceras lisas y con similares pliegues cuticulares, probablemente determinó la hidrofilia de sus hojas; ya que la humectabilidad de las hojas depende considerablemente de la microtopografía de las ceras cuticulares (Wang *et al.*, 2015), y las topografías foliares simples y relativamente lisas son más hidrofílicas (Hall y Burke, 1974; Koch *et al.*, 2008). Por otro lado, aunque en la humectabilidad de las hojas pueden influir la composición química y el contenido de las ceras (Wang *et al.*, 2015), las diversas abundancias relativas de los componentes químicos de las ceras cuticulares de las especies de helechos, no generaron diferencias en la humectabilidad de las hojas entre los taxa al ser todas hidrofílicas, en particular los ácidos grasos que predominaron como el ácido hexadecanoico, y que de acuerdo a Agrawal *et al.* (2017) es altamente repelente al agua. Ante la ausencia de cristales de cera repelentes al agua en la superficie foliar de los taxa, probablemente la considerable abundancia de ácidos grasos esté contribuyendo a la eliminación de agua de las superficies de sus hojas. Las superficies hidrofílicas de las hojas jóvenes (cuatro meses) de los helechos forófitos, pudo favorecer el establecimiento de los epífilos y el crecimiento de sus coberturas; ya que estas superficies retienen fácilmente la película de agua sobre las hojas (Wang *et al.*, 2015). La cual es importante para que las hepáticas foliosas

y los líquenes se adhieran a las hojas, debido a que usan una capa polisacárida de mucílago (Frahm *et al.*, 2003; Voglgruber, 2011), que es soluble en agua y muy adhesiva (Lücking, 1998a; Voglgruber, 2011). Los líquenes foliícolas requieren de agua suficiente sobre la hoja para asegurar su continua adherencia, al necesitar suficiente mucílago para llenar el espacio entre la hoja y la cobertura del talo (Lücking, 1998a). La película de agua sobre las superficies foliares, favorece la acumulación sobre las hojas de los nutrientes transportados por el agua de lluvia (Monge-Nájera y Blanco, 1995), la hidratación de los líquenes y el cociente de fotosíntesis/respiración del fotobionte (Barreno y Pérez-Ortega, 2003), y facilita a las hepáticas foliosas la absorción de agua por capilaridad (Ardiles *et al.*, 2008).

Por otro lado, en las láminas de plástico con una microtopografía lisa las coberturas de líquenes fueron bajas en comparación a las superficies foliares con pliegues cuticulares de los taxa estudiados, en particular los de menor longevidad foliar. Lücking y Bernecker-Lücking (2002) en una selva tropical de Costa Rica, usaron plásticos del mismo material (polietileno) que los plásticos de esta tesis, sin embargo, tenían una microtopografía ondulada y observaron que a los 12 meses se incrementó la riqueza de especies liquénicas (32 spp.), y en el presente estudio en los plásticos la riqueza fue inferior (un morfotipo). Esto quizás se deba a que en las superficies rugosas el flujo de agua tendrá más resistencia para desplazarse y ser eliminada (Lau y Afshar, 2013), lo que puede beneficiar la adhesión de los epífilos, y de acuerdo a Lücking (1998a) las depresiones de los pliegues cuticulares favorecen la sujeción de las hifas de los hongos liquenizados; en contraste, en las superficies lisas

la tasa de flujo de agua es alta (Lau y Afshar, 2013), y esto puede remover las esporas de los epífilos (Bentley, 1987; Dean y Smith, 1978).

Por otra parte, en las ceras cuticulares de los taxa estudiados, el ácido hexadecanoico juega un papel importante en la defensa química, ya que actúa en la detección temprana y defensa contra bacterias y hongos patógenos (Krishnan *et al.*, 2016; Walley *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos como el ácido benzoico en *B. portoricensis*, *D. drepanolobium*, *L. recurvata*, *M. bernoullii* y *P. rhachipterygium*, el 2-etilfenol y el ácido cinámico en *D. nodosa*, y el ácido ferúlico en *B. portoricensis*, de acuerdo con Durdevic *et al.* (2007) y San Francisco y Cooper-Driver (1984) tienen propiedades antimicrobianas. Así mismo, se ha observado que estos compuestos decrecieron *in vitro* en 50% el crecimiento de hongos y bacterias (San Francisco y Cooper-Driver, 1984). El sesquiterpeno en las ceras cuticulares de *D. drepanolobium* se produce como una respuesta al estrés de las plantas (Torres, 2010). Estos compuestos químicos en las hojas de los helechos pudieron afectar la colonización, ya que Voglgruber (2011) ha sugerido que las ceras superficiales pueden inhibir la extensión de los epífilos. Este mismo autor encontró en hojas longevas y senescentes cambios en la abundancia de alcanos y lo correlacionó con las coberturas de epífilos para el helecho *P. cervina*. Yang y Ohlrogge (2009) citan que hay una disminución de ácidos grasos del 80% en las hojas senescentes de angiospermas. De acuerdo con estas ideas, probablemente el ácido hexadecanoico que predominó en los ocho taxa, y los metabolitos secundarios que presentaron, disminuyeron su producción en las hojas senescentes y esto pudo favorecer el incremento de epífilos.

La composición química de las ceras cuticulares fue muy similar entre las dos especies hemiepífitas (*L. recurvata* y *M. bernoullii*), básicamente en los componentes químicos presentes en los ácidos grasos y alcanos, y por la ausencia de aldehídos (Cerón-Carpio *et al.*, 2019). Lo anterior, además de su alta longevidad foliar, pudo también influir en su similar cobertura, pero no se pueden excluir otros factores como los microambientales; ya que aunque se tomaron de éstas especies pinnas sólo hasta los 2 m de altura, para disminuir la posible variación microambiental a la altura en la que crecen con relación a las especies terrestres estudiadas; las coberturas de líquenes sobre las hojas pueden variar con relación a la humedad relativa del aire y la intensidad de luz relativa (Lücking, 1998a). Así mismo, aunque el resto de las especies estudiadas se encontraban al igual que las hemiepífitas debajo del sotobosque, las posibles variaciones microambientales pudieron influir en la cobertura de epífilos, lo cual se podría estudiar en futuras investigaciones.

10. Conclusiones

1. Las pinnas de mayor edad de todas las especies presentaron principalmente líquenes foliícolas, hepáticas foliosas y algas verdes. Los líquenes predominaron en la mayoría de los helechos estudiados, y la alta longevidad foliar de *D. nodosa* influyó en su mayor riqueza de especies foliícolas.
2. Las hepáticas foliosas sólo predominaron en la especie que crece a orillas de los ríos (*P. rhachipterygium*), donde típicamente hay una mayor humedad ambiental; por lo que, se sugiere que en la predominancia de los epífilos sobre las hojas influyen considerablemente los factores microambientales.
3. La longevidad foliar pudo influir en la cobertura de epífilos. A los 12 meses en todas las especies, la cobertura por epífilos fue mayor en las especies con menor longevidad foliar (*P. rhachipterygium* y *D. drepanolobium*), que en el resto de los taxa en particular con relación a los de hojas más longevas (*L. recurvata*, *M. bernoullii* y *M. pergamentacea*).
4. Las superficies foliares adaxiales de todas las especies fueron hidrofílicas, por lo que, las diferencias en la composición y el contenido químico de las ceras cuticulares no generaron entre ellas variación en el tipo de humectabilidad, y la hidrofilia de las hojas pudo contribuir a la adhesión y el desarrollo de los epífilos.
5. La microtopografía foliar con pliegues de los taxa pudo facilitar la retención de agua sobre las hojas y el establecimiento de los epífilos; en

contraste, la superficie lisa de los plásticos que acelera el flujo de agua se considera que influyó en su baja cobertura de epífilos.

6. La presencia de metabolitos secundarios y la alta abundancia de ácido hexadecanoico en las ceras cuticulares de los helechos posiblemente limitan la colonización de epífilos. Esta posible estrategia de defensa química requiere más estudios en el futuro.
7. Las hojas de vida corta, las superficies hidrofílicas y la microtopografía con pliegues de las especies estudiadas contribuyeron en el establecimiento y desarrollo de los epífilos.

Los resultados y conclusiones de la presente tesis son una aportación novedosa al conocimiento de cómo las características foliares de los helechos pueden influir en la cobertura de epífilos y en la riqueza de las especies de líquenes foliícolas de la selva tropical. Este ecosistema ha sufrido perturbaciones que afectan la diversidad de las especies de forófitos, y es importante su conservación para que se siga manteniendo la interacción de las especies hospederas y la comunidad de epífilos. Así mismo, se espera que también estimule futuras investigaciones en este tema poco estudiado en nuestro país.

11. Sugerencias para estudios futuros

1. Determinar la composición y contenido químico de las ceras de un mayor número de especies de helechos y en diferentes ambientes para determinar el rango de humectabilidad y las diferencias entre especies y entre hojas jóvenes y senescentes, con respecto a las coberturas de epífilos.
2. Llevar a cabo bioensayos de confrontación para evaluar el efecto de los metabolitos secundarios y del ácido hexadecanoico de las ceras de los helechos sobre la colonización por líquenes y hepáticas foliosas.
3. Realizar estudios sobre la composición química de las ceras de especies de helechos con diferente longevidad foliar, para corroborar si las hojas más longevas realmente invierten en más defensas químicas que inhiben la colonización por epífilos.

12. Referencias

- Acebey, A., R. T. Krömer, M. Vázquez-Torres y J. D. Tejero-Díez. 2015. Helechos y Licófitos de la Reserva de la Biósfera “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. *Botanical Sciences* 93 (2): 1-32.
- Agrawal, N., S. Munjal, A. M. Zubair y N. Khare. 2017. Superhydrophobic palmitic acid modified ZnO nanoparticles. *Ceramics International* 43(16): 14271-14276.
- Ardiles, V., J. Cuvertino y F. Osorio. 2008. Una introducción al mundo de los musgos, hepáticas y antocerotes que habitan los bosques de Chile. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile; 168 pp.
- Baker, E. A. y R. E. Gaskin. 1987. Composition of leaf epicuticular waxes of *Pteridium* subspecies. *Phytochemistry* 26 (10): 2847-2848.
- Bárceñas, A. P. 2007. Comparación de la zonación altitudinal de los líquenes foliícolas en los volcanes San Martín Tuxtla y Santa Marta, “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. Tesis maestría en Ciencias Biológicas (ambiental), Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; 59 pp.
- Barrantes, R., L. D. 2016. Descripción de las microestructuras superficiales de algunas especies de orquídeas con hidropelencia en busca de patrones de estructuras superhidrofóbicas. Tesis de licenciatura en Biología; Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. 43 pp.
- Barreno, R. E. y S. Pérez-Ortega. 2003. Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructura del Principado de Asturias y KRK; 595 pp.
- Barthlott, W., C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen y H. Wilhelmi. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 237-260.
- Bentley, B. L. 1987. Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. *Ann. Missouri Botanical Garden*. 74: 234-241.

- Binoy, T. Thomas, M. V. Bhagya y V. P. Thomas. 2017. Morphological and ecological characterization of *Phycopeltis aurendinacea* (Montagne) De Toni (Ulvophyceae, Trentepohliales) in Southern Western Ghats: A brief study. *Journal Algal Biomass Utilization*. 8 (4): 131-134.
- Binoy, T. Thomas, M. V. Bhagya y V. P. Thomas. 2019. Epiphyllous algae of *Trentepohlia* Martius in Southwestern Ghats, India, including one new species and three new records. *Taiwania* 64 (2): 103-110.
- Brewer, C. A. y W. K. Smith. 1997. Patterns of leaf surface wetness for montane and subalpine plants. *Plant, Cell and Environment* 20: 1-11.
- Briley, D. L. 1994. Polyester media development for inkjet printers. *Hewlett Packard Journal* 45(1): 28-34.
- Brune, T. y K. Haas. 2011. *Equisetum* species show uniform epicuticular wax structures but diverse composition patterns. *AoB Plants* 2011: plr009.
- Buschhaus, C. y R. Jetter. 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces? *Journal of Experimental Botany* 62 (3): 841-853.
- Camacho-Vázquez, C., E. Ruiz-May, J. A. Guerrero-Analco, J. M. Elizalde-Contreras, E. Enciso-Ortiz, G. Rosas-Saito, L. López-Sánchez, A. Kiel-Martínez, I. Bonilla-Landa, J. L. Monribot-Villanueva, J. L. Olivares-Romero, P. Gutierrez-Martinez, J. C. Tafolla-Arellano, M. Tiznado-Hernandez, F. Quiroz-Figueroa, A. Birke y M. Aluja. 2019. Filling gaps in our knowledge on the cuticle of mangoes (*Mangifera indica*) by analyzing six fruit cultivars: architecture/structure, postharvest physiology and possible resistance to fruit fly (Tephritidae) attack. *Postharvest Biology Technology* 148: 83-96.
- Cerón-Carpio, A. B., B. Pérez-García, J. L. Monribot-Villanueva, A. L. Kiel-Martínez, S. Espinosa-Matías, J. A. Guerrero-Analco y K. Mehlreter. 2019. Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology* 85: 13-20.
- Christenhusz, M. J., M. Xian-chun Z. y H. Schneider. 2011. A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns. *Phytotaxa* 19: 7-54.

- Coley, P., T. A. Kursar y J. L. Machado. 1993. Colonization of tropical rain forest leaves by epiphylls: Effects of site and host plant leaf lifetime. *Ecology* 74 (2): 619-623.
- Coley, P. y J. A. Barone. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review Ecology Systematics*. 27:305-35.
- Coley, P. y T. A. Kursar. 1996. Causes and consequences of epiphyll colonization. In: S. Mulkey, S., R. L. Chazdon y A. P. Smith (Eds.). *Tropical forest plant ecophysiology*. Chapman y Hall, United States of America 337-362 pp.
- Dean, M. J. y A. P. Smith. 1978. Behavioral and morphological adaptations of a tropical plant to high rainfall. *Biotropica* 10 (2): 152-154.
- Delgadillo-Moya, C. y M. A. Cárdenas S. 1990. *Manual de briofitas*. 2ª edición. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; 135 pp.
- Delgadillo-Moya, C. y C. Juárez-Martínez. 2014. Biodiversidad de Anthocerotophyta y Marchantiophyta en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 106-109.
- De los Ríos, M. A. 2000. Estudio ultraestructural y enzimático de los simbiontes líquénicos: aspectos microclimáticos y relaciones talo-sustrato. Tesis doctoral en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid; 187 pp.
- De Paiva, F. R., L. E. Nascimento da Costa, I. C. Leão Barros, A. F. Morais de Oliveira y K. Mehlreter. 2018. Selective fern herbivory by leaf-cutter ants of *Atta cephalotes* (L.) in Brazil. *Brazilian Journal of Botany* 41(4): 923-929.
- Dragota, S. y M. Riederer. 2007. Epicuticular wax crystals of *Wollemia nobilis*: morphology and chemical composition. *Annals of Botany* 100 (2): 225-231.
- Durdevic, L., M. Mitrovic, P. Pavlovic, S. Bojovic, S. Jaric, L. Oberan, G. Gajic y O. Kostic. 2007. Total phenolics and phenolic acids content in leaves, rhizomes and rhizosphere soil under *Ceterach officinarum* D.C., *Asplenium trichomanes* L., and *A. adiantum-nigrum* L. in The Gorge of Sicevo (Serbia). *Ekologia (Bratislava)* 26(2):164-173.

- Estébanez, P. B., I. Draper D. A. y R. Medina B. 2011. Briófitos: una aproximación a las plantas terrestres más sencillas. Real Sociedad Española de Historia Natural 9: 2-56.
- Eze, J. M. O. y G. K. Berrie. 1977. Further investigations into the physiological relationship between an epiphyllous liverwort and its host leaves. Annals Botany. 41:351-358.
- Flores, J. S. 1971. Estudio de la vegetación del cerro el Vigía de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 94 pp.
- Frahm, J. P., B. O' Shea, T. Pocs, T. Koponen, S. Piipo, J. Enroth, P. Rao e Y. Fang. 2003. Manual of tropical bryology. Tropical Bryology 23: 1-195.
- Franich, R. A., S. J. Goodin y E. Hansen. 1985. Wax esters of the New Zealand silver fern, *Cyathea dealbata*. Phytochemistry 24 (5): 1093-1095.
- García-Guzmán, G. y R. Dirzo. 2001. Patterns of leaf-pathogen infection in the understory of a Mexican rain forest: incidence, spatiotemporal variation, and mechanisms of infection. American Journal of Botany 88(4): 634-645.
- Goldsmith, G. R., L. Patrick B., A. Shenkin, N. Salinas, B. Blonder, R. E. Martin, R. Castro-Ccosco, P. Chambi-Porroa, S. Diaz, B. J. Enquist, G. P. Asner e Y. Malhi. 2017. Variation in leaf wettability traits along a tropical montane elevation gradient. New Phytologist 214: 989-1001.
- Gradstein, S. R. 1997. The taxonomie diversity of epiphyllous bryophytes. Abstracta Botanica 21(1): 15-19.
- Gradstein, S. R. y R. Wilson. 2008. Protonemal Neoteny in Bryophytes. In: Mohamed H, B. B. Baki, A. Nasrulhaq-Boyce y PKY Lee (eds.). Bryology in the New Millennium. Kuala Lumpur: University of Malaya; 1-11 pp.
- Hall, D. M. y W. Burke. 1974. Wettability of leaves of a selection of New Zealand plants. New Zealand Journal of Botany 12: 283-98.
- Hallen, J. 2005. Trail width and epiphyllous coverage of *Chamaedorea* spp. Department of Natural Resources, University of Minnesota; 1-7 pp.

- Herrera, T. y M. Ulloa. 2004. El reino de los hongos, micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica; 552 pp.
- Herrera-Campos, M. A., R. Lücking, R. E. Pérez-Pérez, R. Miranda-González, N. Sánchez, A. Bárcenas-Peña, A. Carrizosa, A. Zambrano, B. D. Ryan y T. H. Nash. 2014. Biodiversidad de líquenes en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:82-99.
- Holder, C. D. 2007. Leaf water repellency as an adaptation to tropical montane cloud forest environments. *Biotropica* 39(6): 767-770.
- Holder, C. D. 2011. The relationship between leaf water repellency and leaf traits in three distinct biogeographical regions. *Plant Ecology* 212:1913-1926.
- Huidobro, S. M. E., J. L. Gama F. e I. Frutis M. 2014. Líquenes del centro de México, guía de campo. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala; 147 pp.
- IUSS (Unión Internacional de las Ciencias del Suelo) Working Group WRB. 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma.
- Ivey, T. y N. De Silva. 2001. A test of the function of drip tips. *Biotropica* 33 (1): 188-191.
- Jeffree, C. E. 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C, editors. *Biology of the plant cuticle*. Oxford: Blackwell Publishing, 11-110 pp.
- Jenks, M. A., A. M. Rashotte, H. A. Tuttle y K. A. Feldmann. 1996. Mutants in *Arabidopsis thaliana* altered in epicuticular wax and leaf morphology. *Plant Physiology* 110: 377-385.
- Jetter, R. y M. Riederer. 2000. Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *Journal of Chemical Ecology* 26 (2): 399-412.

- Jetter, R. y S. Schäffer. 2001. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface, dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology* 126: 1725-1737.
- Jetter, R., L. Kunst y A. L. Samuels. 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer M, Müller C, editors. *Biology of the plant cuticle*. Oxford: Blackwell Publishing, 145-175 pp.
- Kikuzawa, K. y M. J. Lechowicz. 2011. *Ecology of Leaf Longevity*. Ecological Research Monographs. Springer; 145 pp.
- Koch, K., K. Dieter H., L. Schreiber, W. Barthlott y C. Neinhuis. 2006. Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. *Environmental and Experimental Botany* 56: 1-9.
- Koch, K. y H. J. Ensikat. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular selfassembly. *Micron* 39: 759-772.
- Koch, K., B. Bhushan y W. Barthlott. 2008. Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. *Soft Matter* 4: 1943-1963.
- Koch, K., H. Florian B. y W. Barthlott. 2009. Hierarchically sculptured plant surfaces and superhydrophobicity. *Langmuir* 25 (24): 14116-14120.
- Komposch, H. y J. Hafellner. 2000. Diversity and vertical distribution of lichens in a Venezuelan tropical lowland forest. *Selbyana* 21(1,2):11-24.
- Kraichak, E. 2012. Asexual propagules as an adaptive trait for epiphyllly in tropical leafy liverworts (Lejeuneaceae). *American Journal of Botany* 99 (9): 1436-1444.
- Kraichak, E. 2013. Adaptive traits and community assembly of epiphyllous Bryophytes. Ph.D. in Integrative Biology, Graduate Division, University of California, Berkeley; 63 pp.

- Krishnan, K. R., F. James y A. Mohan. 2016. Isolation and characterization of n-hexadecanoic acid from *Canthium parviflorum* leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8(8): 614-617.
- Lau, T. W., y N. R. Afshar. 2013. Effect of Roughness on Discharge. *Journal of Civil Engineering, Science and Technology* 4(3):29-33.
- Lellinger, D. B. 2002. A modern multilingual glossary for taxonomic pteridology. *Pteridologia* 3, American Fern Society 186-193.
- Lorea, F. y R. Riba. 1990. Guía para la recolección y preparación de ejemplares para herbario de pteridofitas. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C. México, DF. 12 pp.
- López-Barrera, J. A., A. Avila-Ortega, J. Morales, J. Cervantes y R. Olayo. 2007. Surface modification of quarry stone by hexamethyldisiloxane plasma treatment. *Applied Organometallic Chemistry* 21:858-861.
- Lücking, R. 1998a. Ecology of foliicolous lichens at the "Botarrama" trail (Costa Rica), a neotropical rain forest site. Part II. Patterns of diversity and area cover, and their dependence on microclimate and phorophyte species. *Ecotropica* 4: 1-24.
- Lücking, R. 1998b. Ecology of foliicolous lichens at the "Botarrama" trail (Costa Rica), a neotropical rain forest. Part III. Phorophyte ranges and patterns of phorophyte preferences. *Phyton* 38 (1): 195-219.
- Lücking, R. 1998c. Short communications plasticolous lichens in a tropical rain forest at selva biological station, Costa Rica. *Lichenologist* 30(3): 287-301.
- Lücking, R. y A. Bernecker-Lücking. 2002. Distance dynamics, and diversity in tropical rainforest: an experimental approach using foliicolous lichens on artificial leaves. I Growth performance and succession. *Ecotropica* 8:1-13.
- Lücking, R., V. Wirth, L. I. Ferraro y M. E. S. Caceres. 2003. Foliiicolous lichens from Valdivian temperate rain forest of Chile and Argentina: evidence of an austral element, with the description of seven new taxa. *Global Ecology Biogeography* 12: 21-36.

- Lücking, R. y P. Martínez-Colín. 2004. Rapid lichen guides: Follicolous lichens of the world. 2004. The Field Museum; 39 pp.
- Lücking, R. y A. Bernecker-Lücking. 2005. Drip-Tips do not impair the development of epiphyllous rain-forest lichen communities. *Journal of Tropical Ecology* 21 (2): 171-177.
- Lücking, R. 2008. Follicolous lichenized fungi. *Flora Neotropica Monograph*. The New York Botanical Garden; 103: 1-866 pp.
- Malombe, I., K. Wambua M., T. Pócs y J. Patiño. 2016. Edge effect on epiphyllous bryophytes in Taita Hills fragmented afro-montane forests. *Journal of Bryology* 38 (1): 33-46.
- Manubolu, M., L. Goodla, B. Godwin, N. Chandar, S. Ravilla y V. R. Obulum. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of wax from *Actiniopteris radiata* (Sw.) Link. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 16 (3): 387-392.
- Martínez-Colín, P. 2016. Análisis de la estructura de la comunidad de los líquenes foliícolas en la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz, México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México; 112 pp.
- Martínez-Colín, P., R. Lücking y Ma. de los A. Herrera-Campos. 2021. Diversity begets diversity: Phorophyte and microsite relations of follicolous lichens in the lowland rain forest at "Los Tuxtlas" Biosphere Reserve (Veracruz, Mexico). *Ecological Research* 1-16 pp.
- Mateus, V. L. N. 2011. Composición y riqueza de los líquenes foliícolas de la estación ambiental de Tutunendo (Chocó biogeográfico). Tesis de maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 120 pp.
- Mehlreter, K. y M. Palacios-Ríos. 2003. Phenological studies of *Acrostichum danaeifolium* (Pteridaceae, Pteridophyta) at a mangrove site on the Gulf of Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 19: 155-162.

- Mežaka, A., M. Y. Bader, N. Salazar A. y G. Mendieta-Leiva. 2019. Epiphyll specialization for leaf and forest successional stages in a tropical lowland rainforest. *Journal of Vegetation Science* 31: 118-128.
- Mickel, J. T. y A. R. Smith. 2004. The Pteridophytes of Mexico. *The New York Botanical Garden* 88:1-1054 pp.
- Monge-Nájera, J. 1989. The relationship of epiphyllous liverworts with leaf characteristics and light in Monte Verde, Costa Rica. *Cryptogamie - Bryologie et Lichenologie* 10 (4): 345-352.
- Monge-Nájera, J. y M. A. Blanco. 1995. The influence of leaf characteristics on epiphyllous cover: a test of hypotheses with artificial leaves. *Tropical Bryology* 11: 5-9.
- Morales, T. y E. Moreno. 2010. Contribución al conocimiento de los briofitos epífilos de Venezuela. Facultad de Agronomía (Herbario), Venezuela. *Ernstia* 20 (1): 47-70.
- Morán, R.C. y R. Riba (Eds.). 1995. "Psilotaceae a Salviniaceae". En: Davidse G., M. Sousa y S. Knapp (Eds. gales.). *Flora Mesoamericana I*. Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden and The Natural History Museum, México, DF; 470 pp.
- Mueller, G. U. y B. Wolf-Mueller. 1991. Epiphyll deterrence to the leafcutter ant *Atta cephalotes*. *Oecologia* 86: 36-39.
- Mustelier, K. y D. Reyes M. 1992. La familia Lejeuneaceae (Hepaticopsida) en Cuba. *Tropical Bryology* 6: 169-170.
- Nash, T. H. 2008. *Lichen biology*. 2nd. ed. Cambridge University Press; 486 pp.
- Neinhuis, C. y W. Barthlott. 1997. Characterization and distribution of waterrepellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany* 79: 667-677.
- Mycobank. <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>. Consulta: 18 de diciembre 2020.

- Olarinmoye, S. O. 1974. Ecology of epiphyllous liverworts: growth in three natural habitats in Western Nigeria. *Journal Bryologist* 8: 275-289.
- Pessin, L. J. 1922. Epiphyllous plants of certain regions in Jamaica. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 49: 1-14.
- Pinokiyo, A., K. P. Singh y J. S. Singh. 2006. Leaf-colonizing lichens: their diversity, ecology and future prospects. *Current Science* 90 (4): 509-518.
- PubChem. 2020. National Center for Biotechnology Information. Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Reiner-Drehwald, M. E. 1995. La familia Lejeuneaceae (hepaticae) en Misiones, Argentina: Estudio taxonómico-florístico. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; 237 pp.
- Rich, P. 1994. Quantitative and qualitative characterization of epicuticular wax from chemically induced bloomless and sparse-bloom mutants of *Sorghum bicolor*. Ph.D. Purdue University of West Lafayette; 104 pp.
- Richardson, S. J. y L. R. Walker, 2010. Nutrient ecology of ferns. In: Mehltreter, K., L. R. Walker y J. M. Sharpe (eds.). *Fern Ecology*. Cambridge University Press; 111-139 pp.
- Riederer, M. 2006. Introduction biology of the plant cuticle. In: *Biology of the plant cuticle*. Riederer, M. y C. Muller (Eds.). Blackwell; 1-10 pp.
- Rindi, F. y M. D. Guiry. 2002. The genus *Phycopeltis* (Trentepohliaceae, Chlorophyta) in Ireland: a taxonomic and distributional reassessment. *Phycologia* 41 (4): 421-431.
- Roskoski, J., P. 1981. Epiphyll dynamics of a tropical understory. *Oikos* 37 (2): 252-256.
- San Francisco, M. y G. Cooper-Driver. 1984. Anti-microbial activity of phenolic acids in *Pteridium aquilinum*. *American Fern Journal* 74(3):87-96.
- Sanders, W. B. y R. Lücking. 2002. Reproductive strategies, relichenization and thallus development observed in situ in leaf-dwelling lichen communities. *New Phytologist* 155: 425-435.

- Scheele, C., E. Wollenweber y F. J. Arriaga-Giner. 1987. New flavonoids from cheilanthoid ferns. *Journal of Natural Products* 50 (2):181-187.
- Sharpe, J. M. y K. Mehlreter. 2010. Ecological insights from fern population dynamics. In: Mehlreter, K., Walker, L. R. and Sharpe, J. M. (Eds.). *Fern Ecology*. Cambridge University; 61-110 pp.
- Sridar, S., S. Raman y R. Kumar. 2014. Nature's design for superhydrophobicity in tropical leaves. *Surface Innovations* 3:144-150.
- Siems, K., F. Weigt y E. Wollenweber. 1996. Drimanes from the epicuticular wax of the fern *Nephrolepis biserrata*. *Phytochemistry* 41 (4): 1119-1121.
- Somfai, T. 2019. Strategies for the preservation of a b/w motion picture film collection in safety film support. Master thesis; Facultad de Ciencias e Tecnología, Universidad de Nova Lisboa; 39 pp.
- Sonnleitner, M., S. Dullinger, W. Wanek y H. Zechmeister. 2009. Microclimatic patterns correlate with the distribution of epiphyllous bryophytes in a tropical lowland rain forest in Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology* 25: 321-330.
- Tafolla-Arellano, J. C., A. González-León, M. E. Tiznado-Hernández, L. Zacarías G. y R. Báez-Sañudo. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (1): 3-12.
- Tanaka, N., H. Wada, V. Dietz y E. Wollenweber. 1992. Leaf surface terpenoids of the tree fern *Lophosoria quadripinnata*. *Phytochemistry* 31 (1): 347-34.
- Tanner, E. V. J. 1983. Leaf demography and growth of the tree-fern *Cyathea pubescens* Mett. ex Kuhn in Jamaica. *Botanical Journal of the Linnean Society* 87: 213-227.
- Torres, D., L. D. 2010. Detección de fitoalexinas en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en respuesta a inoculación con aislamientos de actinomicetos. Tesis de licenciatura en Ciencias Microbiológicas. Facultad de Ciencias Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá; 41 pp.

- Vetter, J. 2018. Secondary metabolites of ferns. In: Fernandez, H. (Ed.), Current Advances in Fern Research. Springer, 307-327 pp.
- Voglgruber, A. 2011. Leaf wax compounds of tropical understorey plants affect epiphyll community growth. Masterarbeit, Fakultät für Lebenswissenschaften, University of Vienna; 82 pp.
- Wagner, P., R. Fürstner, W. Barthlott y C. Neinhuis. 2003. Quantitative assessment to the structural basis of water repellency in natural and technical surfaces. *Journal of Experimental Botany* 54 (385): 1295-1303.
- Walley, J. W., D. J. Kliebenstein, R. M. Bostock y K. Dehesh. 2013. Fatty acids and early detection of pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 16(4): 520-526.
- Wanek, W. y K. Pörtl. 2005. Phyllosphere nitrogen relations: reciprocal transfer of nitrogen between epiphyllous liverworts and host plants in the understorey of a lowland tropical wet forest in Costa Rica. *New Phytologist* 166: 577-588.
- Wang, H., H. Shi e Y. Wang. 2015. The wetting of leaf surfaces and its ecological significances wetting and wettability. In: Aliofkhazraei M. (Ed.). *Wetting and Wettability*, IntechOpen; 11: 295-321 pp.
- Yang, Z. y J. B. Ohlrogge. 2009. Turnover of fatty acids during natural senescence of *Arabidopsis*, *Brachypodium*, and Switchgrass and in *Arabidopsis* b-oxidation mutants. *Plant Physiology* 150: 1981-1989.
- Yoshimitsu, Z., A. Nakajima, T. Watanabe y K. Hashimoto. 2002. Effects of surface structure on the hydrophobicity and sliding behaviour of water droplets. *Langmuir* 18: 5818-5822.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical analysis* (5th ed.). Prentice-Hall/Pearson; 944 pp.
- Zhou, Han-Hua. 2007. *Phycopeltis epiphyton* (Trentepohliaceae) on leaves of *Huperzia* in China. *Plant Diversity* 29(05): 527-528.
- Zhu, H., Z. Zhao, S. Xia, Z. Hu y G. Liu. 2015. Morphological examination and phylogenetic analyses of *Phycopeltis* spp. (Trentepohliales, Ulvophyceae) from Tropical China. *PLOS ONE* 10(2): 1-19.

13. Anexos

13.1. Ficha técnica de las láminas transparentes de plástico (control de la microtopografía).

Caserta - 3M VSD Technical Service
Date: 05/06/97
Product: CG3460

TECHNICAL DATA SHEET CG3460

General Description

Film designed for HP ink jet printers, providing a coloured image on a transparent background. This film is designed for multiple feeding on most printers and is striped on short side, so it can also be used on printers requiring a stripe for sensing of jams.

Physical characteristics

film base:	polyester
weight:	140 g/m
thickness:	0.1 mm (4 mils) nominal
dimension:	A4 (210 mm x 297 mm)
coating:	on one side
film flatness:	< 15 mm (mean value among the four corners)
haze:	< 9 %
transmission:	90 %
yellowness index:	< 8%

Compatibility

Most HP and other ink jet printers.

Packaging

50 sheets per box

Storage and Handling Conditions

Image quality is affected by environmental conditions. Following conditions are advised:

Printing conditons:

- temperature between 15 °C and 30 °C
- humidity between 20 % and 80 % RH

Storing conditions:

- temperature between 20 °C and 25 °C
- humidity between 40 % and 60 % RH

13.2. Listado de líquenes foliícolas en la superficie adaxial de las pinnas de mayor edad de ocho taxa de helechos de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. Familias según Lücking y Martínez-Colín (2004).

Familia	Especies
Arthoniaceae	<i>Arthonia accolens</i> Stirt.
Gomphillaceae	<i>Arthonia lecythidicola</i> (Bat. & H. Maia) Lücking & Serus. <i>Aulaxina microphana</i> (Vain.) R. Sant. <i>Echinoplaca</i> aff. <i>strigulacea</i> (Müll. Arg.) R. Sant. <i>Gyalectidium filicinum</i> Müll. Arg. <i>Tricharia</i> sp.
Lyrommataceae	<i>Lyromma nectandrae</i> Bat. & H. Maia
Pilocarpaceae	<i>Byssoloma leucoblepharum</i> (Nyl.) Vain. <i>Byssoloma</i> sp. <i>Calopadia</i> sp.
Porinaceae	<i>Coenogonium subluteum</i> (Rehm) Kalb & Lücking <i>Porina alba</i> (R. Sant.) Lücking <i>Porina epiphylla</i> (Fée) Fée <i>Porina leptosperma</i> Müll. Arg. <i>Porina nitidula</i> Müll. Arg. <i>Porina rubentior</i> (Stirt.) Müll. Arg. <i>Porina rubescens</i> (Lücking) Hafellner & Kalb <i>Porina tetramera</i> (Malme) R. Sant. <i>Porina triseptata</i> (Vezda & Lücking) Lücking <i>Trichothelium alboatrum</i> Vain. <i>Trichothelium annulatum</i> (P. Karst.) R. Sant. <i>Trichothelium bipindense</i> F. Schill. <i>Trichothelium epiphyllum</i> Müll. Arg. <i>Trichothelium minus</i> Vain. <i>Trichothelium mirum</i> Lücking
Ramalinaceae	<i>Bacidina</i> sp.
Roccellaceae	<i>Mazosia melanophthalma</i> (Müll. Arg.) R. Sant. <i>Mazosia phyllosema</i> (Nyl.) Zahlbr. <i>Mazosia rotula</i> (Mont.) A. Massal. <i>Opegrapha filicina</i> Mont.
Strigulaceae	<i>Phyllobathelium leguminosae</i> (Cavalc. & A. A. Silva) Lücking & Serus. <i>Strigula phyllogena</i> (Müll. Arg.) R. C. Harris <i>Strigula smaragdula</i> Fr.

13.3. Líquenes foliícolas de la superficie adaxial de las pinnas de mayor edad de cada especie de helecho de “Los Tuxtlas”, Veracruz, México. n=18 pinnas por especie.

Liquen foliícola	Helecho forófito							
	Bp	Dd	Dn	Lr	Mb	Mp	Pr	Gr
<i>A. accolens</i>	-	-	✓	-	-	✓	-	-
<i>A. lecythidicola</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>A. microphana</i>	-	-	✓	-	-	✓	-	-
<i>Bacidina</i> sp.	-	✓	-	-	-	-	-	-
<i>B. leucoblepharum</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>Byssoloma</i> sp.	-	-	✓	✓	-	-	✓	-
<i>Calopadia</i> sp.	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>C. subluteum</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
<i>E. strigulacea</i>	-	✓	-	-	-	-	-	-
<i>G. filicinum</i>	-	✓	✓	-	-	-	-	-
<i>L. nectandrae</i>	-	-	-	-	-	✓	-	-
<i>M. melanophtalma</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>M. phyllosema</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>M. rotula</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>O. filicina</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>P. leguminosae</i>	-	✓	-	-	-	-	-	-
<i>P. alba</i>	-	✓	✓	-	-	-	-	-
<i>P. epiphylla</i>	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	-
<i>P. leptosperma</i>	-	-	✓	-	-	✓	-	-
<i>P. nitidula</i>	-	✓	✓	✓	-	-	-	-
<i>P. rubentior</i>	-	✓	✓	✓	-	✓	-	✓
<i>P. rubescens</i>	-	-	✓	✓	-	✓	-	-
<i>P. tetramera</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>P. triseptata</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>S. phyllogena</i>	-	✓	✓	-	-	✓	-	-
<i>S. smaragdula</i>	-	✓	-	-	-	-	-	-
<i>Tricharia</i> sp.	-	✓	-	-	-	-	-	-
<i>T. alboatrum</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>T. annulatum</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-
<i>T. bipindense</i>	-	-	✓	-	-	-	-	-

Continuación Cuadro 13.3.

<i>T. epiphyllum</i>	-	✓	✓	-	-	-	-	-
<i>T. minus</i>	-	✓	✓	-	-	-	-	-
<i>T. mirum</i>	-	✓	✓	-	-	-	-	-

Bp = *B. portoricensis*, **Dd** = *D. drepanolobium*, **Dn** = *D. nodosa*, **Lr** = *L. recurvata* (hemiepífita), **Mb** = *M. bernoulli* (hemiepífita), **Mp** = *M. pergamentacea*, **Pr** = *P. rhachipterygium* y **Gr** = *G. rhachiflexuosa*.

13.4a. Superficie adaxial de las pinnas de *G. rhachiflexuosa* con daños en el tejido.



Pinnas de *G. rhachiflexuosa* con daños. Foto 1) pinnas de dos meses con posible hongo que al parecer dañaba a las células epidérmicas al ponerlas de color blanco. 2-4) pinnas de cinco meses con el tejido blanco tornándose café. 5-6) pinnas de 12 meses con tejido café y la superficie perforada.

13.4b. Hoja de *G. rhachiflexuosa* dañada por herbivoría.



Hoja de *G. rhachiflexuosa* recién desarrollada o expandida. Se observan las pinnas dañadas por herbivoría, lo que pudo contribuir en las bajas coberturas de epífilos presentes en sus pinnas.

13.5. Artículo publicado de la tesis. "Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico". *Biochemical Systematics and Ecology* 85(2019):13-20.

Biochemical Systematics and Ecology 85 (2019) 13–20



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochemsyseco



Chemical composition and micromorphological structure of cuticular leaf waxes of eight tropical fern species of Mexico



Amparo B. Cerón-Carpio^{a,b}, Blanca Pérez-García^b, Juan L. Monribot Villanueva^c, Ana L. Kiel-Martínez^c, Silvia Espinosa-Matias^d, José A. Guerrero-Analco^{c,*}, Klaus Mehlreter^{c,**}

^a Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Ciudad de México, 09340, Mexico

^b Área de Botánica Estructural y Sistemática Vegetal, Depto. de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Ciudad de México, 09340, Mexico

^c Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster BioMimic*, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, 91070, Veracruz, Mexico

^d Laboratorio de Microscopía de Barrido, Facultad de Ciencias, Depto. de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Ciudad de México, 04510, Mexico

* Red de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, A.C., Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, 91070, Veracruz, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Alkanes
Cuticle
Hemiepiphytes
Hexadecanoic acid
Pteridophytes
Secondary metabolites

ABSTRACT

Plants of the humid tropics seal their leaf surfaces with hydrophobic waxes to keep them dry and clean by repelling water and diminishing the adhesion of spores of pathogenic and epiphyllous organisms. We investigated the chemical composition and micromorphological structure of waxes of the upper leaf surfaces of six terrestrial (*Diplazium drepanolobium* A.R.Sm., *Bolbitis portoricensis* (Spreng.) Hennisman, *Mickelia pergamentacea* (Maxon) R.C.Moran, Labiak and Sundue, *Danaea nodosa* (L.) Sm., *Polypodium rhachipterygium* Liebm. and *Goniopteris rhachitexuosa* (Riba) Salino and T.E.Almeida) and two hemiepiphytic (*Mickelia bernoullii* (Kuhn ex Christ) R.C.Moran, Labiak and Sundue and *Lomariopsis recurvata* Fée) tropical fern species. Wax extracts were obtained with CHCl₃ and MeOH, analyzed by GC-MS and ultra-high-performance LC-MS, and wax compounds were identified with the library NIST 2.0D, NIST/EPA/NIH (NIST05), and the database Metlin, respectively. In addition, n-alkanes were identified by comparing their retention times and spectrometric means against standards (C₁₀–C₄₀). In all taxa, the wax layer consisted of one of three types of coatings, none building wax crystals. With CHCl₃ and MeOH extraction, we obtained 21–740 µg/cm² and 6–33 µg/cm² of cuticular waxes, respectively. In all eight species, fatty acids were the most abundant wax component (68–91% of total), of which hexadecanoic (30.7–48.2%) and octadecanoic (20.7–32.1%) acids were predominant. In lower abundance, alkanes (6.2–13.2%), aldehydes (< 11.3%), esters (< 4.05%), ketones (< 1.4%) and primary alcohols (< 1.0%) were detected. All compounds had carbon chains of C₉–C₃₆ length, as reported for wax metabolites of mosses and seed plants. Five phenolic compounds were also detected: benzoic acid in five taxa (*B. portoricensis*, *D. drepanolobium*, *L. recurvata*, *M. bernoullii* and *P. rhachipterygium*), cinnamic acid and 2-ethylphenol in *D. nodosa*, ferulic acid in *B. portoricensis*, and a type of flavonoid in *M. bernoullii*. A sesquiterpene was found in *D. drepanolobium*. The composition of leaf waxes in hemiepiphytic species did not vary as much as in terrestrial species, because of their high similarity of fatty acids and alkanes, and the lack of aldehydes.

1. Introduction

All aerial plant tissues that are in contact with the environment are covered by cuticular waxes (Gülz, 1994), which consist of a complex mixture of aliphatic compounds such as alcohols, fatty acids, aldehydes,

ketones, and esters, as well as cyclic compounds such as pentacyclic triterpene acids, triterpene alcohols, triterpene ketones, and triterpene esters, hydroxycinnamic acid derivatives, and flavonoids (Müller and Riederer, 2005). Cuticular waxes protect the leaves from abiotic and biotic stress by confining water loss of the underlying tissues, serving as

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: amparo_belgica@xanum.uam.mx (A.B. Cerón-Carpio), bpg@xanum.uam.mx (B. Pérez-García), juan.monribot@inecol.mx (J.L. Monribot Villanueva), ana.kiel@inecol.mx (A.L. Kiel-Martínez), semfc2010@gmail.com (S. Espinosa-Matias), joseantonio.guerrero@inecol.mx (J.A. Guerrero-Analco), klaus.mehlreter@inecol.mx (K. Mehlreter).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.04.008>

Received 22 January 2019; Received in revised form 16 April 2019; Accepted 21 April 2019
0305-1978/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

a first barrier against UV radiation and acting as a defense against herbivorous insects (Jetter and Sodhi, 2011; Sharma et al., 2018). Because of their hydrophobicity, cuticular waxes increase the water repellency of the leaf surfaces and decrease the adhesion of contaminating particles such as dust and spores, and the proliferation of pathogenic fungi and bacteria as well as leaf-colonizing, epiphyllous (= foliicolous) mosses and lichens (Riederer, 2006; Voglgruber, 2011). Our current knowledge of leaf cuticular waxes of diverse vascular plant lineages is limited, because research was mainly focused on temperate plants and crops, but rarely considered plants of tropical and subtropical biomes (Riederer and Markstädter, 1996).

Although ferns are the second largest lineage of vascular plants and sister group of seed plants and could provide important insights into the biochemical evolution of terrestrial plants, their cuticular waxes have been poorly studied (Jetter and Riederer, 2000; Guo et al., 2018). Furthermore, most ferns are of more recent phylogenetic origin and evolved in the shadow of angiosperms (Schneider et al., 2004). For this reason, the cuticular waxes of tropical understory ferns may have undergone a different biochemical evolution than in angiosperms, because the former had to adapt to the new angiosperm-dominated forests.

Former studies have examined the chemical composition of leaf waxes of 21 fern species belonging to 13 families (eleven tropical taxa and the rest temperate-subtropical) (Bottari et al., 1972), one tree fern species *Cyathea dealbata* (G. Forst.) Sw. (Franich et al., 1985), *Polypodium cervina* (L.) Kaulf., *Actinopteris radiata* (Sw.) Link (Voglgruber, 2011; Manubolu et al., 2013) and five species of temperate climates (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, *Cryptogramma crassa* (L.) R. Br. ex Hook., *Polypodium glycyrrhiza* D.C. Eaton, *Polystichum munitum* (Kaulf.) C. Presl and *Gymnocarpium dryopteris* (L.) Newman) (Guo et al., 2018). Entirely new wax compounds have been isolated from some ferns: hopane, a new terpenoid, in *Lophosoria quadripinnata* (J.F. Gmel.) C. Chr (Tanaka et al., 1992) and three new drimanes of sesquiterpenoid type in *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott (Siems et al., 1996). Epicuticular wax crystals have been reported from some species of *Equisetum* L. (Brune and Haas, 2011) and *Osmunda regalis* L. (Jetter and Riederer, 2000).

The objective of our study was to characterize the chemical composition and micromorphological structure of leaf cuticular waxes of eight tropical fern species for which no previous data were available and focus the analyses on the adaxial (upper) leaf surface, which is exposed to UV radiation, precipitation and sedimentation of dust particles and spores. In addition, we aimed to discern possible differences and similarities in the cuticular wax composition of fern species of different growth forms (terrestrial vs. hemiepiphytes) and to compare our results with other species of ferns, mosses and seed plants.

2. Materials and methods

2.1. Solvents

All solvents used for wax extraction, liquid and gas chromatography, coupled to mass spectrometry analysis were HPLC and MS grade (trademarks: J. T. Baker and Sigma-Aldrich, respectively). All obtained extracts were filtered using membrane filters PTFE 0.2 µm (Acrodisc CR 13 mm Syringe filter) before injection of samples into the chromatographs.

2.2. Leaf samples and wax extraction

Leaf samples of eight fern species were collected in October 2017 in the rainforest understory at the Biological Station of “Los Tuxtlas”, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Veracruz, México (95°04′–95°09′W, 18°34′–18°36′N; 118–700 m a.s.l.). The eight studied species belong to six families following the classification of Christenhusz et al. (2011). Six species were terrestrial: *Diplazium drepanolobium* (Athriaceae), *Bolbitis portoricensis* and *Mickelia pargamentacea* (Dryopteridaceae), *Danaea nodosa* (Marattiaceae),

Polypodium rhachipterygium (Polypodiaceae) and *Goniopteris rhachiflexuosa* (Thelypteridaceae); and two were hemiepiphytic: *Mickelia bernoullii* (Dryopteridaceae) and *Lomariopsis recurvata* (Lomariopsidaceae). The two hemiepiphytic taxa start growth as terrestrial plants until their rhizomes find a host tree and climb up 2–6 (10) m attached with their roots to the trunk; their leaves are typically spreading horizontally rather than hanging down (A. B. Cerón-Carpio, pers. obs.). Species were collected (Lorea and Riba, 1990) and identified following Mickel and Smith (2004); voucher specimens (A. B. Cerón-Carpio et al., 2654–2657, 2659, 2660, 2663 and 2666) were deposited at the herbaria UAMIZ (Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico City) and HUAP (Universidad Autónoma de Puebla, Puebla).

Three leaf samples per species, consisting of six pinnae each (=leafflets, 64–584 cm² per sample) (Jetter et al., 2006), were put into hermetically locked plastic bags. Samples came from completely expanded, undamaged, healthy leaves that were processed immediately after collection. Samples were washed at the local laboratory with distilled water to eliminate impurities and kept at room temperature until their surface was dry (ca. 40 min). The adaxial surface of three pinnae was thoroughly washed thirty times (12–45 mL depending on the leaf area of each species) with chloroform (CHCl₃) and of the other three pinnae with methanol (MeOH) (Voglgruber, 2011). Each obtained extract was deposited in separate vials and transported in a cooler box with gel ice packs to the laboratory of natural products chemistry of the Instituto de Ecología A.C., where they were rotoevaporated at reduced pressure to dryness (Büchi RII, Büchi, Switzerland). Wax quantities were calculated by dividing the obtained dry weight of wax (µg) by the foliar area (cm²) of each replicate. Foliar areas were obtained by scanning and analyzing each sample with ImageJ software v. 1.50i.

2.3. Gas-chromatography and mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS analyses were performed as described by Camacho-Vázquez et al. (2019). Dried CHCl₃ extracts (three replicates per species) were re-dissolved in 1 mL of dichloromethane (CH₂Cl₂), put into GC vials of 2 mL and vigorously mixed on a vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Afterwards, they were dried in two cycles of 5 min by use of a nitrogen evaporator (RapidVap/Vertex Evaporator, Labconco). The derivatizations of acidic components were carried out with MTBSTFA (N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide) as follows: 100 µL of dichloromethane (CH₂Cl₂) and 50 µL of MTBSTFA were added to the samples. The mixture was sonicated at 60 °C for 30 min. One µL of the reaction mixture was injected into the GC-MS. Samples were analyzed in a gas chromatograph (GC-2010 Plus, Shimadzu) equipped with a ZB-5MSi column (30 m × 0.25 mm DI X 0.25 µm) and coupled to a single quadrupole mass spectrometer (QP2010 Ultra System, Shimadzu). We used helium as carrier gas at a constant flow of 0.80 mL/min. Injection of 1 µL of samples was performed in “Splitless” mode with source and interface temperatures of the spectrometer set at 200 and 250 °C, respectively. The oven temperature was held at 100 °C for 5 min, and then increased at a rate of 4 °C/min to 250 °C, which was kept for 10 min. Electron impact (70eV) spectra of analytes were obtained in total scan mode (SCAN) within a range of 35–500 m/z (atomic mass units). Wax components were tentatively identified by comparison of their spectrometric fingerprints with the library NIST version 2.0D, NIST/EPA/NIH (NIST05), considering matches with similarity index ≥ 74%. In addition, n-alkanes were identified by co-analysis and comparison of their retention times and spectrometric means with those of a commercial standard mixture of C₁₀–C₄₀ (trademark: Fluka, cat. 68281-2 ML-F).

2.4. Ultra-high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry (UPLC-ESI-HRMS)

UPLC-ESI-HRMS analyses were performed as described by

Camacho-Vázquez et al. (2019). Dried MeOH extracts (three replicates per species) were dissolved in 1 mL of MeOH (with 0.1% formic acid) and transferred into UPLC vials of 1.5 mL. Of each sample, 1 μ L was injected into a liquid chromatograph (Acquity class I, Waters™) coupled to quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Synapt G2-Si HDMi, Waters™). The UPLC was equipped with a column Acquity BEH (1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm) and temperatures of the column and sample were set to 40 and 15 °C, respectively. We injected 1 μ L used as mobile phase water and acetonitrile, both with 0.1% of formic acid, at a flow rate of 0.3 mL/min. The gradient of the liquid phase based on its acetonitrile concentration was: 0–13 min, linear gradient, 1–80%; 13–14 min, 80% isocratic; 14–15 min, linear, 80–81%. The mass spectrometric analysis was performed with an electrospray ionization source in negative and positive mode with a voltage of the capillary, sample cone and source block of 3,000, 40 and 80 V, respectively. The temperature of the source and desolvation were 100 and 20 °C, respectively. The gas flow of desolvation was 600 L/h and the pressure of the nebulizer was 6.5 Bar. Leucine-enkephalin was used as an internal standard reference (556.2771, [M+H]⁺; 554.2615, [M-H]⁻). Analytical conditions were set to the following parameters: mass range 50–1200 Da, function 1 CE of 6 V; function 2 CER 10–30 V, and search time of 0.5 s. Data were acquired and processed with MassLynx software (version 4.1). Tentative identification of compounds was realized on basis of its exact molecular ion mass and the comparison of its fragmentation pattern with the public database Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) using as search criterion an error value of less than 5 ppm.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

To analyze the micromorphological structure of cuticular waxes, a fresh leaf segment (1 cm²) was placed with the adaxial surface facing upwards onto a sample holder. After drying at room temperature and the usual gold-palladium sputtering (Denton Vacuum Desk II sputter coater) (Barthlott et al., 1998), photomicrographs were taken with a SEM (Jeol JSM-5310LV), at 45° tilt. Images were acquired by ORION software and processed with Adobe Photoshop CS5 v. 12.0. Micromorphological wax classification followed Barthlott et al. (1998).

2.6. Statistical analysis

To analyze similarities of the chemical wax composition (obtained from CHCl₃ extraction) among the eight species, we performed a hierarchical cluster analysis (function “hclust”) of the Bray-Curtis similarities of presence/absence data in R-Studio v. 1.1.453, and applied for clustering the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA). To identify differences and similarities between the different species, with the waxes analyzed by UPLC-ESI-HRMS, a multivariate analysis of main components (PCA) was carried out with the MarkerLynx program v. 4.1, which takes into account the retention times, mass/charge (m/z) ratios and abundance values for grouping based on the chemical composition of the different sample profiles.

3. Results and discussion

3.1. Wax quantity and composition determined by means of GC-MS

The amount of cuticular waxes of the eight fern species obtained from CHCl₃ extraction ranged from 21 to 740 μ g/cm², a range that is comparable to cuticular wax quantities obtained from angiosperms (11.2–770 μ g/cm²; Maiti et al., 2016; Tsubaki et al., 2012). Cuticular waxes of the eight species contained high amounts of fatty acids (68–91% of the wax total) and minor quantities of alkanes (6.2–13.2%), aldehydes (< 11.3%), esters (< 4.1%), ketones (< 1.4%) and primary alcohols (< 1.0%) (Table 1).

As in our study, fatty acids, alkanes, aldehydes, esters, ketones and primary alcohols have been found in the waxes of other lineages of

plants as in the mosses *Syntrichia caninervis* Mitt (Xu et al., 2009) and *Funaria hygrometrica* Hedw. (Busta et al., 2016), the gymnosperm *Ginkgo biloba* L. (Gülz et al., 1992), angiosperms (Jetter et al., 2000; Van Maarseveen and Jetter, 2009) such as the model plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Buschhaus and Jetter, 2012) and some other fern species (Brune and Haas, 2011; Guo et al., 2018; Manubolu et al., 2013; Voglgruber, 2011) (Table 2). Although most plant taxa shared the same basic cuticular wax composition, the quantities of specific compounds vary considerably (Guo et al., 2018). Riederer and Markstädter (1996) suggested that plants may adapt their cuticular wax composition to specific environmental factors. A comparison of chloroform extracts of our eight tropical fern species with five temperate species (Guo et al., 2018) highlights the possibly thicker wax layer of tropical vs. temperate ferns (21–740 μ g/cm² vs. 3.9–16.9 μ g/cm²) and the predominance of fatty acids (68–91%) in tropical species vs. long-chained alkyl esters in temperate species (60–95%; Guo et al., 2018). These differences might reflect an evolutionary adaptation of plants to different climates, because the leaves of tropical ferns are longer-lived (Mehlreter and Sharpe, 2013) and exposed to higher amounts of rainfall. Thicker wax layers may protect these tropical ferns from nutrient leaching. However, only future studies on a larger number of fern species and using the same analytical techniques can verify this assumption. In addition, forthcoming studies should test how much the cuticular wax composition may vary within the same species under different environmental conditions and over a broader biogeographic range, and which environmental factors are responsible for inducing such alterations.

In the studied fern species growing in the same ecosystem, chemical wax composition did not vary much for homologues of fatty acids and alkanes, because five and four of the total of these compounds, respectively, were present in all species. To the contrary, a single aldehyde, tetradecanal (C₁₄), was shared among three of the fern species (*D. drepanolobium*, *M. pergamentacea* and *G. rhachiflexuosa*) whereas the other four aldehydes were exclusive to certain taxa (*B. portoricensis*, *D. drepanolobium*, *D. nodosa* and *G. rhachiflexuosa*). A single ketone, 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one, was detected in the waxes of *D. drepanolobium* and *G. rhachiflexuosa*.

Wax compounds of the studied fern species presented homologues with carbon chains of C₉–C₃₆, all within the range of carbon chain lengths reported previously in ferns (C₉–C₆₀) (Baker and Gaskin, 1987; Franich et al., 1985; Jetter and Riederer, 2000; Manubolu et al., 2013). Our results also confirmed the predominance of even-numbered carbon chain lengths of homologues of fatty acids, aldehydes, esters and primary alcohols, that has been found by Sharma et al. (2018). However, we also found a predominance of even-numbered carbon chains in alkanes (five of which were confirmed with authentic standards) and the single ketone, which contrasts with findings of Jetter et al. (2006), who in most of the described works reported a preference of odd-numbered carbon chains. Though, this supposed contradiction might be the consequence of the low number of species of very different phylogenetic and biogeographic origins studied so far, Voglgruber (2011) also found a slight predominance of even-numbered alkane homologues in *P. cervina*, as did Kundu and Sinhababu (2013) in some angiosperms (*Ficus* L.). On the other hand, the ketone 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one (C₁₈) found in *D. drepanolobium* and *G. rhachiflexuosa* is a common volatile component of plants often as part of the floral odor bouquet (Schulz et al., 2011), and has been found in the essential oils of roots and leaves of the fern *Adiantum flabellulatum* L. (Kang et al., 2009) and in extracts of the whole plant of the aquatic fern *Azolla nilotica* Mett. (Arai et al., 1998).

Within fatty acids, hexadecanoic (30.7–48.2%) and octadecanoic (20.7–32.1%) acids prevailed in our study, as did hexadecanoic acid in the palm *Copernicia cerifera* (Arruda) Mart. (54.6%; Deroux et al., 2003), the desert moss *S. caninervis* (35.7%; Xu et al., 2009), and several angiosperms (< 39.2%; Arunkumar et al., 2018; Li and Ishikawa, 2006). In plants, fatty acids, particularly hexadecanoic acid, fulfill a significant function in the early detection and defense against

Table 1
Relative abundance (%) of cuticular wax compounds in CHCl₃ extracts of the adaxial leaf surfaces of eight fern species^a and total amounts ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of extracted waxes (at the bottom of the table).

Compound	^b RT (min)	^c SI (%)	^d Relative abundance (%)							
			Bp	Dd	Dn	Lr	Mb	Mp	Pr	Gr
Alkanes										
Hexadecane (n-C16) ^e (isomer)	25.72	88	–	–	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.6	0.3 ± 0.03	–	0.5 ± 0.1
Heptadecane (n-C17)	25.95	93	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.7	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.04
Octadecane (n-C18) ^e	26.32	88	–	0.3 ± 0.03	–	–	–	–	–	–
Eicosane (n-C20) ^e	27.02	93	2.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	2.9 ± 0.8	1.3 ± 0.4	3.3 ± 0.6	0.5 ± 0.3	3.8 ± 0.7	0.7 ± 0.2
Heneicosane (n-C21)	33.11	95	1.8 ± 0.7	0.9 ± 0.3	1.7 ± 0.6	2.2 ± 0.4	3.5 ± 1.4	0.6 ± 0.04	4.9 ± 1.0	0.6 ± 0.1
Tetracosane (n-C24) ^e	32.86	87	3.0 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.7 ± 1.4	2.6 ± 1.1	1.9 ± 0.01	1.9 ± 0.1	–	–
Hexacosane (n-C26) ^e	34.83	94	0.6 ± 0.1	–	–	–	–	0.6 ± 0.02	–	0.6 ± 0.1
2-methylhexacosane (2-MeC26)	35.72	90	–	–	0.4 ± 0.02	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.6	–	–	–
2-methyloctacosane (2-MeC28)	33.89	91	–	–	–	1.0 ± 0.1	–	–	–	–
Dotriacontane (n-C32)	49.99	92	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5	1.2 ± 0.3	–	3.3 ± 0.4	–	1.3 ± 0.1
Hexatriacontane (n-C36)	53.77	92	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.5	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.5	4.1 ± 0.2	2.4 ± 0.02	2.3 ± 0.5
Fatty acids										
Nonanoic acid (C9:0)	23.32	86	2.3 ± 1.0	0.6 ± 0.2	2.9 ± 1.5	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Decanoic acid (C10:0)	26.29	85	–	0.3 ± 0.1	–	–	–	0.3 ± 0.03	–	–
Dodecanoic acid (C12:0)	31.90	93	2.6 ± 0.3	1.9 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.5 ± 0.3	2.9 ± 0.6	2.2 ± 0.1	3.2 ± 0.5	1.6 ± 0.2
Tetradecanoic acid (C14:0)	36.88	92	4.1 ± 0.4	3.9 ± 0.2	4.7 ± 1.2	4.5 ± 0.2	6.3 ± 0.1	7.0 ± 0.3	5.1 ± 0.9	3.8 ± 0.4
Pentadecanoic acid (C15:0)	39.24	91	–	1.0 ± 0.7	2.9 ± 0.8	3.3 ± 0.3	3.6 ± 0.4	4.1 ± 0.4	–	2.4 ± 0.2
Hexadecanoic acid (C16:0)	41.52	96	35.3 ± 3.8	32.7 ± 0.6	30.7 ± 3.5	40.4 ± 2.0	39.2 ± 2.4	48.2 ± 2.0	39.2 ± 1.4	34.3 ± 0.7
Heptadecanoic acid (C17:0)	43.75	89	–	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.2	–	1.8 ± 0.1	–	1.4 ± 0.04
9-Octadecenoic acid (C18:1) ^f	45.65	94	21.8 ± 3.4	17.0 ± 6.0	–	11.3 ± 3.3	–	5.9 ± 1.7	–	15.4 ± 1.1
Octadecanoic acid (C18:0)	46.33	96	24.2 ± 3.2	20.7 ± 1.0	21.9 ± 1.1	25.6 ± 2.1	25.6 ± 2.7	24.3 ± 0.4	32.1 ± 4.7	28.2 ± 3.4
9-Hexadecenoic acid (C16:1) ^f	40.96	78	3.4 ± 0.8	–	–	5.5 ± 2.2	7.0 ± 1.6	–	8.1 ± 1.0	4.7 ± 0.6
Esters										
Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)-propyl ester (C ₁₂)	16.05	92	1.7 ± 1.1	–	–	–	–	–	–	–
Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-1-(1-methylethyl)-1,3-propanediyl ester (C ₁₆)	23.87	91	–	–	–	–	–	–	–	0.6 ± 0.1
Isopropyl myristate (C ₁₇)	30.31	86	0.7 ± 0.1	–	0.6 ± 0.1	–	0.9 ± 0.1	–	–	–
2-Propenoic acid, pentadecyl ester (C ₁₈)	26.60	91	0.5 ± 0.1	–	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1
2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester (C ₁₈)	42.45	89	–	–	0.7 ± 0.3	–	–	–	–	–
Isopropyl palmitate (C ₁₉)	35.46	90	0.6 ± 0.2	–	–	0.4 ± 0.03	–	–	–	–
Aldehydes										
Tridecanal (C ₁₃)	24.21	94	–	–	0.4 ± 0.03	–	–	–	–	–
Tetradecanal (C ₁₄)	24.24	95	–	0.3 ± 0.1	–	–	–	0.4 ± 0.1	–	0.7 ± 0.2
7-Hexadecenal (C ₁₆)	30.20	81	0.3 ± 0.1	–	–	–	–	–	–	–
Hexadecanal (C ₁₆)	35.40	96	–	11.0 ± 2.0	–	–	–	–	–	–
Heptadecanal (C ₁₇)	30.11	87	–	–	–	–	–	–	–	0.3 ± 0.2
Primary alcohols										
2-Isopropyl-5-methyl-1-hexanol (C ₁₀)	25.77	74	–	–	–	0.1 ± 0.02	–	–	–	0.1 ± 0.01
2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol (C ₁₁)	25.59	76	–	–	–	–	–	–	1.1 ± 0.1	–
2-Butyl-1-octanol (C ₁₂)	25.75	88	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.03	0.7 ± 0.2	–	–	0.2 ± 0.1	–	–
2-Hexyl-1-decanol (C ₁₆)	28.53	82	–	–	–	–	1.1 ± 0.9	–	–	–
Ketones										
6,10,14-trimethylpentadecan-2-one (C ₁₈)	30.87	93	–	1.0 ± 0.4	–	–	–	–	–	0.3 ± 0.1
Phenolic compounds										
Benzoic acid, 4-methyl (C ₈)	22.55	92	4.5 ± 1.2	0.6 ± 0.2	–	0.7 ± 0.1	2.4 ± 1.2	–	2.4 ± 0.6	–
Cinnamic acid (C ₉)	45.53	91	–	–	16.5 ± 5.8	–	–	–	–	–
2-Ethylphenol (C ₉)	24.38	81	–	–	7.0 ± 1.9	–	–	–	–	–
Sesquiterpene (C ₁₅)	27.68	91	–	0.6 ± 0.2	–	–	–	–	–	–
Mean (\pm SE) quantity of waxes ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$):			349 \pm 61	61 \pm 25	72 \pm 44	740 \pm 322	219 \pm 128	71 \pm 55	51 \pm 9	21 \pm 13

^a Species: Bp = *Bolbitis portoricensis*, Dd = *Diplazium drepanolobium*, Dn = *Danaea nodosa*, Lr = *Lomariopsis recurvata*, Mb = *Mickelia bernoullii*, Mp = *M. pergamentacea*, Pr = *Polypodium rhachipterygium*, and Gr = *Goniopteris rhachiflexuosa*.

^b RT = Retention time (minutes).

^c SI = Similarity Index (%), tentative identifications with the library NIST version 2.0D, NIST/EPA/NIH (NIST05), and standard mixture of alkanes C₁₀–C₄₀.

^d Means (\pm SE) of n = 3.

^e Identity of compound confirmed by comparison of retention times with authentic standard.

^f Double bond configuration (*cis* or *trans*) cannot be assigned to tentative identifications based on NIST.

Table 2
Characteristic wax compounds (% relative abundance) of some plant lineages.

	Fatty acids	Alkanes	Primary alcohols	Esters	Aldehydes	Ketones	References
Mosses							
<i>Synurichia caninervis</i>	4–7	74–82	1–6	8–9	–	–	Xu et al. (2009)
<i>Funaria hygrometrica</i>	0.2–1	0.3–6	1–3	40–85	0.6	–	Busta et al. (2016)
Ferns							
<i>Equisetum</i> spp. subg. <i>Equisetum</i>	34–60	2	24	18	53	–	Brune and Haas (2011)
<i>Polyborya cervina</i> (adaxially)	~26	59	0.1	–	–	–	Vogelgruber (2011)
<i>Actinopteris radiata</i>	26	16	19	–	–	–	Manubolu et al. (2013)
<i>Pteridium aquilinum</i>	–	< 2	< 2	~95	< 2	–	Guo et al. (2018)
<i>Cryptogramma crispa</i>	–	~8	< 2	~89	–	–	Guo et al. (2018)
<i>Polypodium glycyrrhiza</i>	< 2	~13	< 2	~60	< 2	–	Guo et al. (2018)
<i>Polystichum munium</i>	< 2	~9	< 2	~76	–	–	Guo et al. (2018)
<i>Gymnocarpium dryopteris</i>	–	< 2	< 2	~60	< 2	30	Guo et al. (2018)
Gymnosperms							
<i>Ginkgo biloba</i>	39	1	26	0.7	5	–	Gülz et al. (1992)
Angiosperms							
<i>Prunus laurocerasus</i>	2	72	9	–	1	–	Jetter et al. (2000)
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	0.2–3	19–37	4–8	2–9	3–7	–	Van Maarseveen and Jetter (2009)
<i>Arabidopsis thaliana</i> mutant gl1 (adaxially)	30	40	20	–	10	–	Buschhaus and Jetter (2012)

pathogenic organisms, especially bacteria and fungi (Krishnan et al., 2016; Walley et al., 2013). In the studied tropical fern species, such a defensive compound might be highly desirable, because the risk of pathogenic infections clearly increases under hot and humid climates (García-Guzmán and Heil, 2014). Some of the other wax components in the studied fern species: three phenols and one sesquiterpene (Table 1) also play an important role in plant defense. Benzoic acid, a phenol, has been found in five taxa (*B. portoricensis*, *D. drepanolobium*, *L. recurvata*, *M. bernoullii* and *P. rhachipterygium*), 2-ethylphenol and cinnamic acid only in *D. nodosa*. These phenols have been detected previously in other eusporangiate (*Marattia kaulfussii* J. Sm. ex Hook.; Bohm and Tryon, 1967) and leptosporangiate ferns (e.g. *Asplenium* spp., *Pteridium aquilinum*; Durdevic et al., 2007; San Francisco and Cooper-Driver, 1984), and play a substantial role in the defense against pathogenic microorganisms. For example, it has been observed that phenolic acids present in our species, decreased *in vitro* 50% of the growth of fungi and bacteria (e.g. *Botrytis cinerea* Pers. and *Erwinia* spp. respectively; San Francisco and Cooper-Driver, 1984). In extracts of *D. drepanolobium* a sesquiterpene was detected, and this class of terpenes is produced in some ferns as volatile substances after herbivore damage and act as phytoalexins (Vetter, 2018). Consequently, we assume that the presence of this compound in the waxes of the studied tropical ferns may serve as a first line of defense against herbivores, but future studies should corroborate its possible defensive function in ferns.

3.2. Wax quantity and composition determined by means of UPLC-ESI-HRMS

We recovered 6–33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of cuticular waxes from the MeOH extracts: *D. nodosa* ($6 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), *M. pergamentacea* (8 ± 0.7), *G. rhachiflexuosa* (9 ± 3.2), *B. portoricensis* (11 ± 4.2), *M. bernoullii* (12 ± 3.4), *D. drepanolobium* (16 ± 5.0), *L. recurvata* (27 ± 7.6) and *P. rhachipterygium* (33 ± 3.5), considerably less than with CHCl_3 extracts, because of the hydrophobic nature of most wax compounds (Müller and Riederer, 2005).

With UPLC-ESI-HRMS in negative mode, we could corroborate the identity of two compounds: ferulic acid (193.0497 m/z, error -2.1 ppm, fragments m/z 178.0263, 149.0588 and 134.0362) and one glycosidic flavonoid (477.1759 m/z, error -0.4 ppm, fragments m/z 315.1222, 297.112 and 162.8386). Ferulic acid that was found in *B. portoricensis*, has been already reported for some ferns (Bohm and Tryon, 1967; San Francisco and Cooper-Driver, 1984). The glycosidic flavonoid (dichotoinin) detected in *M. bernoullii* requires further structural elucidation, because until now it has been reported exclusively for the angiosperm *Hopaea dichotoma* Willd. (Ghosal et al., 1985).

Interestingly, although the focus of our study was not chemotaxonomic, the three main fern clades tended to cluster chemotaxonomically according to the PPG I (2016) phylogeny (Fig. 1): 1) Marattiales (*D. nodosa*), 2) Eupolypods I (*L. recurvata*, *M. pergamentacea*, *M. bernoullii*, *B. portoricensis* and *P. rhachipterygium*), and 3) Eupolypods II (*D. drepanolobium* and *G. rhachiflexuosa*). However, some samples did not fit perfectly into the three clades (two outliers: Dd and Gr in Eupolypods I rather than Eupolypods II; Fig. 1) and indicated some intraspecific variation of the wax composition. Consequently, it would be important to increase the number of species of each major clade to corroborate the obtained results and to contribute to the biochemical systematics of fern species.

3.3. Cluster analysis

Based on the similarity of the chemical wax composition from CHCl_3 extracts, the eight fern species were separated into three groups (Fig. 2): Group 1) *B. portoricensis* and *P. rhachipterygium* because of their high similarity in fatty acids (90%) and alkanes (73%), and the lack of aldehydes with exception of C_{16} in *B. portoricensis*. Group 2) *D. nodosa*, *L. recurvata* and *M. bernoullii* shared mostly alkanes (82%), specifically 2-methylhexacosane (C_{27}), and fatty acids (70%). The aldehyde tridecanal (C_{13}), however, separated the terrestrial *D. nodosa* from the two hemiepiphytic *L. recurvata* and *M. bernoullii*, which shared the lack of aldehydes. Group 3) *G. rhachiflexuosa*, *D. drepanolobium* and *M. pergamentacea* were similar in their composition of alkanes (64%) and fatty acids (80%), but *G. rhachiflexuosa* was more distant to the other two species because of the presence of the primary alcohol (C_{10}), ester (C_{16}) and heptadecanal of the former and the presence of decanoic acid of the two latter species. The high similarity in wax composition of the two hemiepiphytic species from two different genera is striking and might be the consequence of their climbing rhizomes that expose their leaves to the different environmental conditions of the drier shrub layer rather than to the wetter herb layer, to which the terrestrial species are bound.

The cluster analysis (Fig. 2) and PCA ordination (Fig. 1) of species based on wax compounds of CHCl_3 and MeOH extracts, respectively, did not agree. It is unclear, why the less lipophilic wax compounds of MeOH extracts should be more phylogenetically conservative than the wax compounds of CHCl_3 extracts, and the latter more functionally correlated (e.g. to hemiepiphytic life forms, see above) than the former. However, the MeOH extracts isolated very few wax compounds when compared to CHCl_3 . To draw any further conclusions on the phylogenetic evolution or ecological convergence of specific cuticular wax compounds, a larger number of species of major clades and life forms must be sampled.

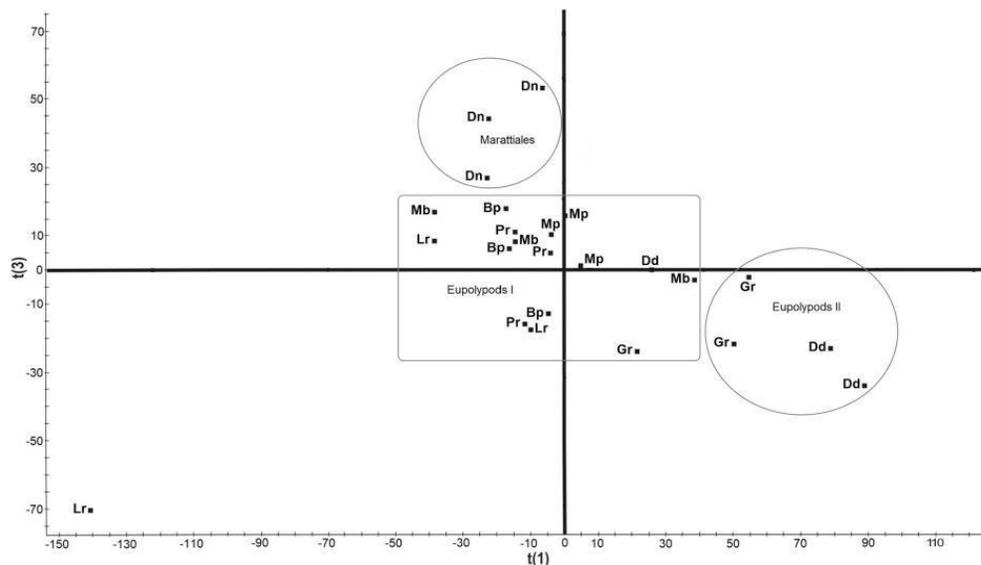


Fig. 1. Ordination (PCA) of eight studied fern species based on their cuticular wax composition (variance 67%). Three major fern clades (indicated by circles and rectangles) tended to group together chemotaxonomically. 1) Marattiales: Dn = *D. nodosa*. 2) Eupolypods I: Lr = *L. recurvata*, Mp = *M. pergamentacea*, Mb = *M. bernoullii*, Bp = *B. portoricensis* and Pr = *P. rhachipterygium*. 3) Eupolypods II: Dd = *D. drepanolobium* and Gr = *G. rhachiflexuosa*.

3.4. Wax micromorphology

Wax micromorphology of the adaxial leaf surface of the eight fern species was characterized by its simplicity, consisting of an epicuticular smooth film without superposed microstructures such as wax crystals. Based on the epidermal ultrastructure (anticlinal walls), we observed three surfaces (Lellinger, 2002): 1) with abundant thin folds in *B. portoricensis*, *L. recurvata*, and *M. pergamentacea*, 2) folds more separate but with anticlinal walls thicker forming a network in *D. nodosa* and 3) slightly rough irregular surface in *M. bernoullii*, *P. rhachipterygium*, *D.*

drepanolobium and *G. rhachiflexuosa* (Fig. 3). Thin wax films are the most common cuticle surface patterns in plants (Barthlott et al., 1998). The absence of wax crystals in our studied species was expected, because Neinhuis and Barthlott (1997) reported their rareness in plants of tropical evergreen forests and assumed that heavy amounts of rainfall would erode them. However, the abundance of saturated fatty acids in the studied fern species clearly provides the leaf surface with strong hydrophobic properties to repel water. This water repellency effect has been used to build strongly hydrophobic nanoparticles by covering them with hexadecanoic acid (Agrawal et al., 2017).

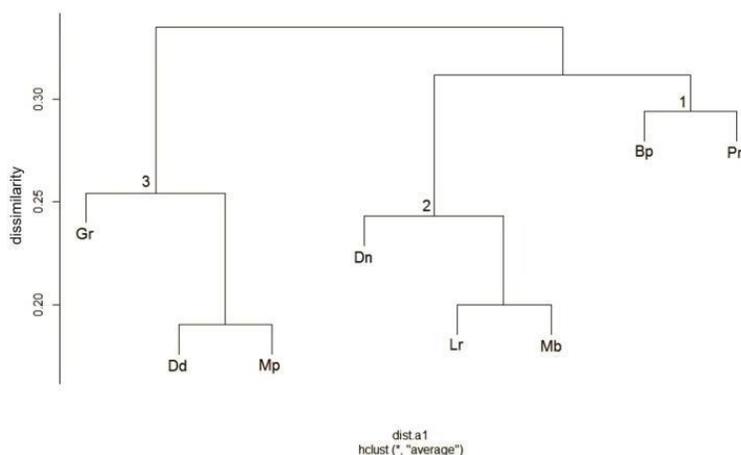


Fig. 2. Cluster analysis of cuticular waxes extracted with CHCl_3 (cophenetic correlation index 0.605). 1) (Bp) *B. portoricensis* and (Pr) *P. rhachipterygium*, 2) (Dn) *D. nodosa*, (Lr) *L. recurvata* and (Mb) *M. bernoullii*, and 3) (Gr) *G. rhachiflexuosa*, (Dd) *D. drepanolobium* and (Mp) *M. pergamentacea*.

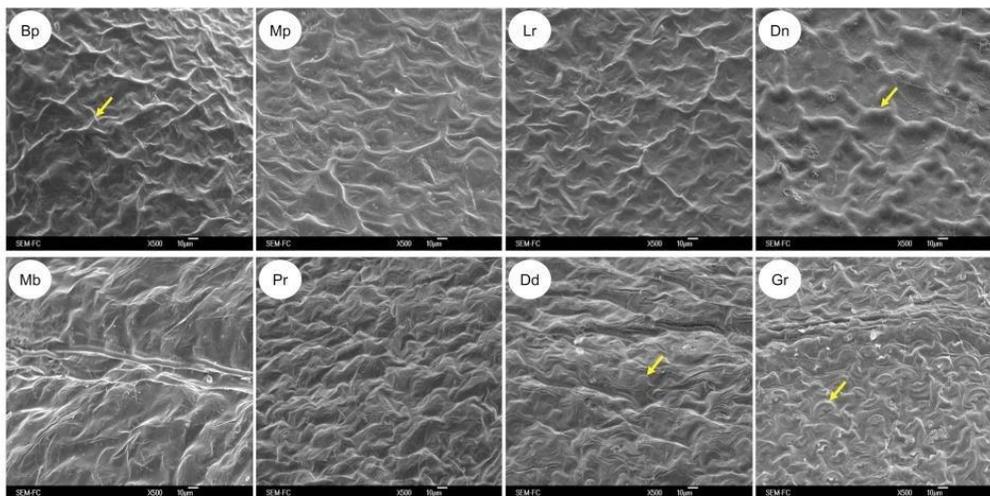


Fig. 3. SEM view of cuticular waxes of the adaxial leaf surface of ferns. 1. (Bp) *B. portoricensis* (thin fold), (Mp) *M. pergamentacea* and (Lr) *L. recurvata* with conspicuous thin folds. 2. (Dn) *D. nodosa* with thicker folds and reticulate surface. 3. (Mb) *M. bernoullii*, (Pr) *P. rhachipterygium*, (Dd) *D. drepanolobium* and (Gr) *G. rhachiflexuosa*, with slightly rough irregular surface. In Dd and Gr the lobes of the epidermal cells are observed.

4. Conclusions

Cuticular waxes of eight studied tropical fern species presented a similar composition than that reported for mosses and angiosperms, characterized by the predominance of fatty acids, especially hexadecanoic and octadecanoic acid. However, differences were found in the minor wax components such as aldehydes and ketones, and some secondary metabolites were even taxon-specific. The simple microstructure of the wax layer of these tropical ferns might be an adaptation to the heavy amounts of rainfall. We propose to investigate the chemical composition and micromorphology of more species and life forms of tropical ferns, over a wider biogeographic range, and of leaves of different developmental stages, to gain a better understanding of the variety of observed structural patterns, their possible adaptation to specific life forms, their variation along geographic gradients, and the deterioration of cuticular waxes during the leaf life span under tropical climatic conditions. Finally, the ecological function and significance of the leaf waxes beyond their water repellency such as stimuli or repellence against herbivores require more attention.

Acknowledgments

The first author acknowledges the doctorate program in biological and health sciences of the Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa (UAM-I), and the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla for the facilities in obtaining the doctorate degree (scholarship of the Secretaría de Educación Pública (SEP) vía the Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior; PRODEP-511-6/17-7318). KM acknowledges the financial support of the Instituto de Ecología, A.C. (20030-10796). We thank Dra. Larissa Guillen for allowing us to use the GC-MS equipment, Rosamond Coates (Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”) for logistical support, and Victor M. Vásquez Reyes (Red de Ecología Funcional, INECOL) for help during collection and processing of plant material. We also thank two anonymous reviewers for their helpful suggestions.

References

Agrawal, N., Munjal, S., Zubair, A.M., Khare, N., 2017. Superhydrophobic palmitic acid modified ZnO nanoparticles. *Ceram. Int.* 43 (16), 14271–14276. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.07.176>.

- Arai, Y., Nakagawa, T., Hitosugi, M., Shiojima, K., Ageta, H., Abdel-Halim, O.B., 1998. Chemical constituents of aquatic fern *Azolla nilotica*. *Phytochemistry* 48 (3), 471–474. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01126-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01126-6).
- Arunkumar, N., Gulsar, B.J., Gopalakrishnan, N., Hiriyannaiah, P.A., 2018. The biochemical correlation between the epicuticular wax of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and the wax of different mealybug species. *Phytoparasitica* 46 (2), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0656-8>.
- Baker, E.A., Gaskin, R.E., 1987. Composition of leaf epicuticular waxes of *Pteridium* subspecies. *Phytochemistry* 26 (10), 2847–2848. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83602-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83602-X).
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., Wilhelm, H., 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* 126 (3), 237–260. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x>.
- Bohm, B.A., Tryon, R.M., 1967. Phenolic compounds in ferns: I. A survey of some ferns for cinnamic acid and benzoic acid derivatives. *Can. J. Bot.* 45 (5), 585–593. <https://doi.org/10.1139/b67-065>.
- Bottari, F., Marsili, A., Morelli, I., Pacchiani, M., 1972. Aliphatic and triterpenoid hydrocarbons from ferns. *Phytochemistry* 11 (8), 2519–2523. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88528-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88528-3).
- Brune, T., Haas, K., 2011. *Equisetum* species show uniform epicuticular wax structures but diverse composition patterns. *AoB Plants* 2011 <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr009>.
- Buschhaus, C., Jetter, R., 2012. Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: b-Amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. *Plant Physiol.* 160 (2), 1120–1129. <https://doi.org/10.1104/pp.112.198473>.
- Busta, L., Budke, J.M., Jetter, R., 2016. The moss *Funaria hygrometrica* has cuticular wax similar to vascular plants, with distinct composition on leafy gametophyte, calyptra and sporophyte capsule surfaces. *Ann. Bot.* 118 (3), 511–522. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw131>.
- Camacho-Vázquez, C., Ruiz-May, E., Guerrero-Analco, J.A., Elizalde-Contreras, J.M., Enciso-Ortiz, E., Rosas-Saito, G., López-Sánchez, L., Kiel-Martínez, A., Bonilla-Landa, I., Monribot-Villanueva, J.L., Olivares-Romero, J.L., Gutiérrez-Martínez, P., Tafolla-Arellano, J.C., Tiznado-Hernández, M., Quiroz-Figueroa, F., Birke, A., Aluja, M., 2019. Filling gaps in our knowledge on the cuticle of mangoes (*Mangifera indica*) by analyzing six fruit cultivars: architecture/structure, postharvest physiology and possible resistance to fruit fly (Tephritidae) attack. *Postharvest Biol. Technol.* 148, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.006>.
- Christenhusz, M.J.M., Zhang, X. Ch, Schneider, H., 2011. A linear sequence of extant families and genera of Lycophytes and ferns. *Phytotaxa* 19 (1), 7–54. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.19.1.2>.
- Deroux, M., Laguna, A., Méndez, E., Cora, M., 2003. Chemical study of the carnauba (*Copernicia cerifera* Martius) wax. *CENIC Ciencias Químicas* 34 (2), 85–89.
- Durdevic, L., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Bojovic, S., Jaric, S., Oberan, L., Gajic, G., Kostic, O., 2007. Total phenolics and phenolic acids content in leaves, rhizomes and rhizosphere soil under *Ceterach officinarum* D.C., *Asplenium trichomanes* L., and *Adiantum-nigrum* L. in the Gorge of Sicevo (Serbia). *Ekol. (Bratisl.)* 26 (2), 164–173.
- Franch, R.A., Goodin, S.J., Hansen, E., 1985. Wax esters of the New Zealand silver fern, *Cyathea dealbata*. *Phytochemistry* 24 (5), 1093–1095. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83191-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83191-X).
- García-Guzmán, G., Heil, M., 2014. Life histories of hosts and pathogens predict patterns

- in tropical fungal plant diseases. *New Phytol.* 201 (4), 1106–1120. <https://doi.org/10.1111/nph.12562>.
- Ghosal, S., Jaiswal, D.K., Singh, S.K., Srivastava, R.S., 1985. Dichotosin and dichotosinin, two adaptogenic glucosyloxyflavans from *Hapaea dichotoma*. *Phytochemistry* 24 (4), 831–833. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84903-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84903-1).
- Gülz, P.G., 1994. Epicuticular leaf waxes in the evolution of the plant kingdom. *J. Plant Physiol.* 143 (4–5), 453–464. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81807-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81807-9).
- Gülz, P.G., Müller, E., Schmitz, K., 1992. Chemical composition and surface structures of epicuticular leaf waxes of *Ginkgo biloba*, *Magnolia grandiflora* and *Liriodendron tulipifera*. *Z. Naturforsch.* 47c, 516–526. <https://doi.org/10.1515/znc-1992-7-805>.
- Guo, Y., Jun, L.J., Busta, L., Jetter, R., 2018. Coverage and composition of cuticular waxes on the fronds of the temperate ferns *Pteridium aquilinum*, *Cryptogramma crispa*, *Polypodium glycyrrhiza*, *Polystichum munitum* and *Gymnocarpium dryopteris*. *Ann. Bot.* 122 (4), 555–568. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy078>.
- Jetter, R., Riederer, M., 2000. Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *J. Chem. Ecol.* 26 (2), 399–412. <https://doi.org/10.1023/A:1005409405771>.
- Jetter, R., Sodhi, R., 2011. Chemical composition and microstructure of waxy plant surfaces: triterpenoids and fatty acid derivatives on leaves of *Kalanchoe daigremontiana*. *Surf. Interface Anal.* 43 (1–2), 326–330. <https://doi.org/10.1002/sia.3430>.
- Jetter, R., Schäffer, S., Riederer, M., 2000. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant. Cell Environ.* 23 (6), 619–628. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00581.x>.
- Jetter, R., Kunst, L., Samuels, A.L., 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–175.
- Kang, W.Y., Ji, Z.Q., Wang, J.M., 2009. Composition of the essential oil of *Adiantum flabellulaum*. *Chem. Nat. Compd.* 45 (4), 575–577. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9371-5>.
- Krishnan, K.R., James, F., Mohan, A., 2016. Isolation and characterization of n-hexadecanoic acid from *Canthium parviflorum* leaves. *J. Chem. Pharm. Res.* 8 (8), 614–617.
- Kundu, S., Sinhababu, A., 2013. Analysis of n-alkanes in the cuticular wax of leaves of *Picus glomerata* Roxb. *J. Appl. and Nat. Sci.* 5 (1), 226–229. <https://doi.org/10.31018/jans.v5i1.311>.
- Lellinger, D.B., 2002. A modern multilingual glossary for taxonomic pteridology. *Pteridologia* 3, 186–193 American Fern Society.
- Li, G., Ishikawa, Y., 2006. Leaf epicuticular wax chemicals of the Japanese knotweed *Fallopia japonica* as oviposition stimulants for *Ostrinia latipennis*. *J. Chem. Ecol.* 32 (3), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9022-7>.
- Lorea, F., Riba, R., 1990. Guía para la recolección y preparación de ejemplares para herbario de pteridofitas. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C. México, D.F., pp. 12.
- Maiti, R., Rodríguez, H.G., González, E.A., Kumari, A., Sarkar, N.C., 2016. Variability in epicuticular wax in 35 woody plants in Linares, Northeast Mexico. *For. Res.* 5 (1), 1–3. <https://doi.org/10.4172/2168-9776.1000162>.
- Manubolu, M., Goodla, L., Chandar, B.G.N., Ravilla, S., Obulum, V.R., 2013. Chemical composition and antibacterial activity of wax from *Actinopteris radiata* (Sw.) Link. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 16 (3), 387–392. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.764185>.
- Mehlreiter, K., Sharpe, J.M., 2013. Causes and consequences of the variability of leaf lifespan of ferns. *Fern Gaz.* 19 (6), 193–202.
- Mickel, J.T., Smith, A.R., 2004. *The pteridophytes of Mexico*. The New York Botanical Garden 88, 1–1054.
- Müller, C., Riederer, M., 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 31 (11), 2621–2651. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-7617-7>.
- Neinhuis, C., Barthlott, W., 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Ann. Bot.* 79 (6), 667–677. <https://doi.org/10.1006/ambo.1997.0400>.
- PPG I (The Pteridophyte Phylogeny Group), 2016. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *J. Syst. Evol.* 54 (6), 563–603. <https://doi.org/10.1111/jse.12229>.
- Riederer, M., 2006. Introduction biology of the plant cuticle. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell, pp. 1–10.
- Riederer, M., Markstädter, C., 1996. Cuticular waxes: a critical assessment of current. In: Kerstiens, G. (Ed.), *Plant Cuticles*. Bios scientific publishers, UK, pp. 189–221.
- San Francisco, M., Cooper-Driver, G., 1984. Anti-microbial activity of phenolic acids in *Pteridium aquilinum*. *Am. Fern J.* 74 (3), 87–96. <https://doi.org/10.2307/1546543>.
- Schneider, H., Schuettpele, E., Pryer, K.M., Cranfill, R., Magallón, S., Lupia, R., 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* 428 (6982), 553–557. <https://doi.org/10.1038/nature02361>.
- Schulz, S., Yildizhan, S., Van Loon, J.J.A., 2011. The biosynthesis of hexahydrofarnesylacetone in the butterfly *Pieris brassicae*. *J. Chem. Ecol.* 37 (4), 360–363. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9939-y>.
- Sharma, P., Kothari, S.L., Rathore, M.S., Gour, V.S., 2018. Properties, variations, roles, and potential applications of epicuticular wax: a review. *Turk. J. Bot.* 42 (2), 135–149. <https://doi.org/10.3906/bot-1702-25>.
- Siems, K., Weigt, F., Wollenweber, E., 1996. Driamenes from the epicuticular wax of the fern *Nephrolepis biserrata*. *Phytochemistry* 41 (4), 1119–1121. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00753-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00753-9).
- Tanaka, N., Wada, H., Dietz, V., Wollenweber, E., 1992. Leaf surface terpenoids of the tree fern *Lophosoria quadripinnata*. *Phytochemistry* 31 (1), 347–349. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83074-U](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83074-U).
- Tsubaki, S., Ozaki, Y., Yonemori, K., Azuma, J., 2012. Mechanical properties of fruit-cuticular membranes isolated from 27 cultivars of *Diospyros kaki* Thunb. *Food Chem.* 132 (4), 2135–2139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.039>.
- Van Maarseveen, C., Jetter, R., 2009. Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. de la Bathie) leaves. *Phytochemistry* 70 (7), 899–906. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.011>.
- Vetter, J., 2018. Secondary metabolites of ferns. In: Fernandez, H. (Ed.), *Current Advances in Fern Research*. Springer, pp. 307–327.
- Voglgruber, A., 2011. Leaf wax compounds of tropical understorey plants affect epiphyll community growth. Masterarbeit, University of Vienna. Fakultät für Lebenswissenschaften, pp. 82.
- Walley, J.W., Kliebenstein, D.J., Bostock, R.M., Dehesh, K., 2013. Fatty acids and early detection of pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (4), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.011>.
- Xu, S.J., Jiang, P.A., Wang, Z.W., Wang, Y., 2009. Crystal structures and chemical composition of leaf surface wax depositions on the desert moss *Syntrichia caninervis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 37 (6), 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.012>.

Impacto de las características foliares de helechos sobre la colonización de epífitos en la Estación Biológica Tropical Los Tuxtlas, Veracruz, México.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:30 horas del día 5 del mes de marzo del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DRA. BLANCA PEREZ GARCIA
- DR. JOSE ANTONIO GUERRERO ANALCO
- DR. OSCAR LUIS BRIONES VILLARREAL
- DRA. ROSA EMILIA PEREZ PEREZ
- DR. KLAUS VOLKER MEHLTRETHER



Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
 DE: AMPARO BELGICA CERON CARPIO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

AMPARO BELGICA CERON CARPIO
 ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
 DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. BLANCA PEREZ GARCIA

VOCAL

DR. JOSE ANTONIO GUERRERO ANALCO

VOCAL

DR. OSCAR LUIS BRIONES VILLARREAL

VOCAL

DRA. ROSA EMILIA PEREZ PEREZ

SECRETARIO

DR. KLAUS VOLKER MEHLTRETHER

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella