



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA RELACIÓN
NOGAL PECANERO (*Carya illinoensis*)-
GUSANO BARRENADOR DE LA NUEZ
(*Acrobasis nuxvorella*)**

por:

Sandra Virginia Higuera-Acuña

**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS

Hermosillo. Sonora

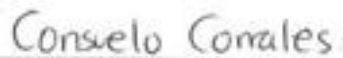
Agosto del 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Sandra Virginia Higuera Acuña, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro
Directora de Tesis



MC Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado
Asesora



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Asesor



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por lo que me dá y por lo que no me dá.

Agradezco a mi mamá y a mi papá por ser personas auténticas, honorables, trabajadores ejemplares y por todo su amor y sus cuidados.

Gracias a mi esposo por su amor, su ternura, alegría, paciencia y apoyo.

A mis hijos e hijas, gracias por su paciencia, comprensión y cariño. Gracias por creer. Gracias por hacer su mejor esfuerzo.

A mis hermanas y hermanos por su cariño, apoyo y ejemplo.

A Don Jorge.

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero a este proyecto. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD AC) por abrirme sus puertas y a cada una de las personas que labora en esta prestigiada institución. Un especial agradecimiento a todo el personal del laboratorio de Ecología Química del CIAD por su dedicación, compromiso y ejemplar trabajo en equipo, en especial a su titular la Dra. Irasema Vargas Arispuro por predicar con el ejemplo y ser una profesional tan dedicada. A la M.C. Consuelo Corrales no tengo palabras para agradecer el entusiasmo con que colaboró en este proyecto, su compromiso y profesionalismo pero sobre todo su paciencia, su amabilidad y sencillez. Muchas gracias por todo su apoyo y por instruirme en las técnicas de extracción y el uso del equipo HPLC. A la Q. B. Socorro Vallejo gracias por todas sus enseñanzas, por su entrega y compromiso, por siempre tener lista una sonrisa,

AGRADECIMIENTOS (continúa)

aún en situaciones adversas, y por su invaluable ayuda con el equipo de rotavapor y el liofilizador. A mis compañeras de laboratorio Azucena Gándara, Rosy Maycoba y Paola Campa, gracias por su apoyo. Al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por su asesoría y por permitir que parte de este trabajo se realizara en el laboratorio de Fisiología Vegetal de CIAD AC y al personal a su cargo por su valiosa ayuda, especialmente al buen Francisco por su apoyo con el equipo LECO, a la admirable Marisol y al siempre atento Emmanuel. Al Dr. Fernando Ayala por su asesoría, su accesibilidad y por permitir el uso de equipo en el Laboratorio de Tecnologías Emergentes. A la Dra. Guadalupe Corella-Madueño de la Universidad de Sonora (UNISON) por su apoyo en la obtención de material biológico para la realización de este proyecto. A todos los que laboran en el área de Ciencia de los Alimentos. A mis queridas Dras. Luz, Gaby, Ana María, Eliza, Marisela, Anita, Evelia, Ciria, Aída, Susana, Gloria, Mary, Nydia, y Ana María. A mis estimados profesores. A cada uno de mis queridos compañeros de generación, porque cada uno me ha dejado una enseñanza y también a los estudiantes de doctorado que tanto me apoyaron. Al personal administrativo y del área de docencia, especialmente a Laura, Verónica, Argelia y Héctor, siempre dispuestos a dar su apoyo. Al personal de biblioteca Fernando y Luis por su amabilidad y a todos los que de alguna forma contribuyeron para la realización de este trabajo. ¡Muchas gracias! ¡Dios los bendiga a todos!

DEDICATORIA

A Dios.

A mi mamá y a mi papá: Carmen y Urbano, con todo mi amor.

A mi esposo, amigo, confidente y compañero José Luis.

A mis hijas Beatriz Gabriela, Diana Cecilia.

A mis hijos Carlos Andrés, Alán Ricardo.

A mis hermanas Carmen, Norma, Paty, Laura, Lou.

A mis hermanos Javier, Urbano, Tony, Juan, Jesús.

A todos mis familiares y amigos que, aunque lejos, siempre están presentes.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.	ix
LISTA DE FIGURAS.	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	10
<i>Acrobasis nuxvorella</i> (Neuzing) Lepidóptera: Pyralidae	10
Características generales del insecto.	10
Insecto Holometábolo y monófago	11
Formación de cutícula	11
Insecto plaga del nogal pecanero	14
Nogal pecanero (<i>Carya illinoensis</i>)	14
Características generales del cultivo	14
Distribución geográfica e Importancia del cultivo.	15
Fenología del Nogal	16
Compuestos fenólicos (CF)	17
Generalidades	17
CF presentes en el nogal	18
Importancia de los CF en la relación planta-Insecto	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Colecta de material	22
Material vegetal	22
Material biológico	22
Preparación de Extractos de Planta de Nogal, variedad Western	23

CONTENIDO (Continúa)

Extracción de CF (material vegetal y GBN)	23
Identificación de Compuestos Fenólicos.	24
Determinación de Proteína Total en Nogal.	25
Preparación de material	25
Determinación de proteína.	26
Análisis estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Material Biológico	27
Extractos de brotes y tegumento de almendra de nogal pecanero	27
CF presentes en extractos de nogal pecanero	29
Compuestos Fenólicos Presentes en Estructuras del Insecto y su posible Función Biológica	33
Exuvias de larvas	33
Pupas	33
Exoesqueletos del insecto	34
Heces	38
Compuestos Fenólicos Identificados en la Planta y no Identificados en las estructuras del insecto.	38
Transformación de flavonoides a catequinas	38
Ácidos Fenólicos y Fenoles Simples	41
Proteína Total en Tejido del Nogal Pecanero	42
Resumen de resultados	46
CONCLUSIÓN	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Acoplamiento del ciclo vital del gusano barrenador de la nuez (<i>Acrobasis nuxvorella</i>) a las etapas fenológicas de nogal pecanero (<i>Carya illinoensis</i>)	7
Cuadro 2.	Ejemplos de algunos insectos que utilizan compuestos fenólicos.	9
Cuadro 3.	Rendimiento obtenido en los extractos de brote y tegumento de almendra de Nogal Pecanero (<i>Carya illinoensis</i>), variedad “Western”.	28
Cuadro 4.	Compuestos Fenólicos Identificados en extractos de Brotes de Nogal Pecanero (<i>Carya illinoensis</i>), variedad “Western”, clasificados por Familia Química	30
Cuadro 5.	Compuestos Fenólicos identificados en extractos de tegumento de almendra de Nogal Pecanero (<i>Carya illinoensis</i>) variedad “Western” clasificados por familia química	31
Cuadro 6.	Compuestos Fenólicos Identificados en exuvias, pupas de larvas, exoesqueletos de palomillas y heces de larvas de Gusano Barrenador de la Nuez (<i>Acrobasis nuxvorella</i>)	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principales Estados Productores de Nuez Pecana (*Carya illinoensis*) en el Mundo 4
- Figura 2.** Larva de Gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) alimentándose dentro de tallo de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) . . . 5
- Figura 3.** Larva de Gusano Barrenador de la Nuez (*Acrobasis nuxvorella*) alimentándose dentro de fruto de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 6
- Figura 4.** Ciclo de vida del Gusano Barrenador de la Nuez (*Acrobasis nuxvorella*). 8
- Figura 5.** Esquema del proceso de esclerotización de insectos en el que a partir de la tirosina se obtienen fenoles que se oxidan en quinonas, las cuáles intervienen en la estabilización cuticular 13
- Figura 6.** Espectro UV del Ácido Elágico identificado en Tegumento de almendra de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*) comparado con del estándar puro de Ácido Elágico . 32
- Figura 7.** Esquema de la síntesis de cumarina. 37
- Figura 8.** Esquema de conversión de flavonoides a catequina . 40
- Figura 9.** Gráfica de Porcentaje de Proteína en estructuras de nogal pecanero 43

LISTA DE FIGURAS (Continúa)

- Figura 10.** Esquema del proceso de esclerotización de insectos en el cuál los fenoles no provienen de la tirosina sino que se obtienen directamente de la dieta del insecto y se oxidan en quinonas para la estabilización cuticular . 45

RESUMEN

Acrobasis nuxvorella mejor conocido como gusano barrenador de la nuez (GBN) es una plaga monófaga primaria del nogal pecanero (*Carya illinoensis*), capaz de destruir los tallos y frutos de su planta hospedera, la cual es rica en compuestos fenólicos. Hasta el momento no hay información de la influencia de los compuestos fenólicos en esta relación planta-insecto. El objetivo de este estudio fue determinar la función de los compuestos fenólicos (CF) en la relación nogal pecanero-GBN, mediante la identificación de los CF presentes en tejidos de la planta (brotes y tegumentos de nuecesillas) que el GBN consume, en estructuras de desarrollo (exuvias de larvas, pupas y exoesqueletos) del insecto y en las heces de las larvas. La determinación de los CF se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se identificaron 19 CF en brotes y tegumento de nuecesillas, variedad "Western", ya que el insecto sólo se alimentó de esta variedad. De los 19 CF, 8 estuvieron presentes en las heces. La quinona de ácido gálico se identificó en exuvias de larvas, pupas y exoesqueletos de palomillas. La función de este compuesto en el insecto posiblemente esté relacionada con la estabilización de cutícula en el proceso de esclerotización. En exoesqueletos de la palomilla se identificaron cumarina y floridzina que son utilizados por los insectos para protegerse de la luz UV y para que los individuos de la misma especie puedan reconocerse. En los brotes y tegumento se identificaron once compuestos, que no estaban en las heces ni en las exuvias del insecto. Puede deberse a que el GBN tenga la capacidad de transformarlos en otras sustancias para ser usadas en el proceso de esclerotización, en el cual, el insecto utiliza proteínas adquiridas en la dieta para producir cutículas. La planta de nogal presentó bajo contenido de proteína total en tejidos que sirven de alimento al insecto, y una forma de ahorrarse la poca proteína de la dieta, es utilizar los compuestos fenólicos directamente de la planta. Podemos concluir que el GBN incorpora en su cutícula compuestos fenólicos que consume de su hospedero.

Palabras clave: nogal pecanero, gusano barrenador de la nuez, fenoles.
relación planta-insecto

ABSTRACT

Acrobasis Nuxvorella Neuzing (Lepidoptera: Pyralidae) better known as Pecan Nut Casebearer (PNC), is a pest primary monophagous of pecan (*Carya illinoensis*), being able to destroy the stems and fruits of their host plant, which is a plant rich in phenolic compounds (PhC). Until now, there is no information of effects of PhC on this plant-insect relationship. The objective of this study was to determine the function of the PhC in the relationship pecan-PCN, by analysis of the PhC present in plant tissue (new shoots growth and immature nutlets) and insect cuticle (exuviae from larvae, pupae and exoskeleton from adults) and insect larvae feces. The determination of the CF was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). Nineteen PhC were identified in new shoots and integument from nutlets of Western variety, since the insect was feeding with this variety. Of all 19 PhC, 8 were present in the feces and only gallic quinone was identified in exuviae of larvae, pupae and adult exoskeletons. This compound was reported to provide rigidity to the cuticle in the sclerotic process. In exoskeleton from adults one coumarin and phloridzin were found. These compounds have been reported to provide insects UV light protection and the intraspecie reconnaissance, respectively. There were 11 compounds that were identified in the tissue plant but they were not identified in the feces or the insect tissue. This may be because the PCN might have had the ability to metabolize and transform them into other substances for use it in production of cuticular agents, because in this process, the insect uses the protein from diet to produce cuticular agents. Pecan tissues presented a low content of total protein in tissues that the insect consume. A way to save the consumed protein from plant is to use PhC directly from the plant into the sclerotisation process. This results permit us concluded that the PhC from pecan were incorporated into the cuticle of PNC.

Keywords: pecan, pecan nut casebearer, phenols, plant-insect relationship

INTRODUCCIÓN

Carya illinoensis es una planta originaria de Norteamérica. La región productora de nuez pecana más importante se encuentra en los estados que forman la franja fronteriza entre México y Estados Unidos (Figura 1). La producción de nuez pecana en esta región cubre, prácticamente, la demanda mundial de este fruto seco (Hadjigeorgalis *et al*, 2005). La productividad de las plantas de nogal puede ser afectada por las plagas, entre las que se encuentran los insectos, particularmente *Acrobasis nuxvorella*, conocido como gusano barrenador de la nuez (GBN). Cuando esta plaga no se controla, puede llegar a consumir el 70% de las nuecesillas (Fú-Castillo *et al*, 2004). El GBN es una plaga que se alimenta exclusivamente de la planta de nogal pecanero y destruye estructuras de vital importancia para la planta, como tallos y frutos (Figuras 2 y 3). Esto coloca al GBN entre las plagas que más daño ocasiona a las nogaleras de todo el mundo (Harris y Jackman, 1991; SAGARPA 2012).

El GBN pasa el invierno como larva parcialmente desarrollada dentro de un hibernáculo, que es una estructura de seda que construye la larva. Este hibernáculo generalmente se localiza en la base de las yemas del árbol en dormancia o en estado de reposo (Aguilar, 1986). Se ha reportado, que la mayoría de los insectos que hibernan como larvas, salen de la hibernación cuando su hospedero inicia la brotación (Díaz, 2006; Meshkova, 2003). El GBN no es excepción de esta afirmación y es conocido que este insecto acopla su ciclo de vida a las etapas fenológicas del nogal pecanero (Cuadro 1). En este cuadro se puede observar la estrecha relación entre el insecto y la

planta, donde las larvas invernantes finalizan su estado de reposo en la misma época en que el nogal inicia su brotación (marzo), alimentándose de yemas durante 2 ó 3 días y después barrenan los brotes en desarrollo forman una pupa (abril) (Harris, 1983). Los adultos de la generación invernante emergen, se aparean y ovipositan en el período que se presenta la polinización en los árboles del nogal (mayo), coincidiendo las larvas del primer estadio de desarrollo de la primer generación, con la presencia de los racimos de nuecesillas (mayo), las cuales perforan por la base con facilidad (Fu-Castillo *et al.*, 2004; Nava, 2013). En los seis meses que requiere la planta para la producción de fruta (McEachern, 1985), se presentan, generalmente, cuatro generaciones (Tarango *et al.*, 2003, Fu-Castillo *et al.*, 2005).

En cada generación, el GBN va realizando una transformación completa iniciando el ciclo como huevo (figura 4), pasando por cuatro etapas larvales, y pupa, en donde sufre una metamorfosis para salir como palomilla (Ring y Harris, 1984; Corella-Madueño *et al.*, 2010). Para poder crecer, el insecto debe desprenderse de las cutículas. Esto lo hace en un proceso de muda continuo en el cual la hipodermis secreta enzimas que ablandan y digieren en parte la capa más interna de la cutícula (la endocutícula), provocando que el resto se desprenda. Inmediatamente comienza la secreción de una cutícula nueva. Mientras que no se endurece esta nueva cubierta, el insecto está relativamente indefenso por lo que requerirá de una dieta con alto contenido de proteína, que garantice la formación de cutícula necesaria para pasar de un estado a otro en su ciclo de vida y para producir compuestos fenólicos que den origen a quinonas para la estabilización cuticular. Sin esta estabilización, las cutículas quedarían blandas. De acuerdo a Bernays *et al.*, 1983, si los insectos consumen dietas pobres en proteína y con considerable contenido fenólico, podrían reservar su escasa proteína para otros procesos y no tendrían que llegar a formar compuestos fenólicos para la estabilización, sino emplear los de la dieta (Bernays *et al.*,

1983) Algunos de los compuestos fenólicos de las plantas han demostrado ser deterrantes para los insectos (Knüttell and Fiedler, 2001). También se han reconocido que algunos insectos utilizan estos compuestos para su beneficio, como en el caso de *Anacridium melanorhodon* (Cuadro 2), insecto que consume plantas que contienen ácido protocateico, probablemente para utilizarlo en el proceso de esclerotización, mientras que la palomilla *Yponomeuta malinellus* busca en su hospedero el contenido de rutina, la cual secuestra y guarda para utilizarla en la formación de patrones de sus alas, que le sirvan para el reconocimiento entre su especie. Las mariposas *Danaus plexippus*, utilizan compuestos fenólicos de tipo flavonoide y cumarinas, para protegerse de la radiación solar. Sobre *Acrobasis nuxvorella* (GBN) se desconoce si utiliza los compuestos fenólicos de los tejidos que consume de su hospedero ya que existen muy pocos estudios dedicados a la relación entre *Acrobasis nuxvorella* y *Carya illinoensis*. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de compuestos fenólicos en el nogal pecanero variedad Western que consume el GBN y en las cutículas de las estructura de desarrollo (exuvias de larvas, pupas y exoesqueletos) del insecto.



Figura 1. Principales Estados Productores de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*) en el Continente Americano



Figura 2. Larva de gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) alimentándose dentro de tallo de nogal pecanero (*Carya illinoensis*)



Figura 3. Larva de gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) alimentándose dentro de fruto de nogal pecanero (*Carya illinoensis*)

Cuadro 1. Acoplamiento del ciclo de vida del gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) a las etapas fenológicas de nogal pecanero (*Carya illinoensis*), de la variedad “Western”

Gusano Barrenador de la Nuez (<i>Acrobasis nuxvorella</i>)		Nogal Pecanero (<i>Carya illinoensis</i>)	
Generación	Etapa biológica	Fenología	Fecha
Invernante	Larvas	Inicio de brotación	Marzo 13
	Pupas		Abril 15
	Adultos		Abril 22
Primera	Huevecillos	Inicio de crecimiento de la nuez	Abril 27
	Larvas		Mayo 3
	Pupas		Mayo 25
	Adultos		Junio 2
Segunda	Huevecillos	Nueces de 2 centímetros de longitud	Junio 7
	Larvas		Junio 11
	Pupas		Julio 2
	Adultos		Julio 10
Tercera	Huevecillos		Julio 24
	Larvas		Julio 28
	Pupas		Agosto 20
	Adultos		Agosto 28

Tarango *et al.*, 2003



Figura 4. Ciclo de vida del gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*).
 Imágenes publicadas por: Corella-Madueño *et al.*, 2010;
 Knutson and Ree 2004; Harris, 1983.

Cuadro 2. Insectos que utilizan compuestos fenólicos.

Insecto	Nombre científico	Compuesto	Utilidad	Referencia
	<i>Yponomeuta malinellus</i>	rutina	Crear patrones de reconocimiento	Anaya-Lang, 2003
	<i>Danaus plexippus</i>	flavonoides, cumarina	Protección contra rayos solares	Wiesen et al., 1994 Berenbaum, 1983
	<i>Anacridium melanorhodon</i>	ácido protocatéico	Mejoran desarrollo (peso, talla, vigor)	Bernays et al., 1983
	<i>Acrobasis nuxvorella</i>	Desconocido		

Anaya Lang, 2003; Wiesen et al, 1994; Berenbaum, 1983; Bernays et al, 1983.

ANTECEDENTES

Acrobasis nuxvorella (Neuzing) Lepidóptera: Pyralidae

Características generales

El GBN es un insecto lepidóptero de la familia Pyralidae, atraviesa por varias etapas morfológicas para alcanzar la etapa de adulto, en la que se presenta como una palomilla de color gris a gris oscuro. Tiene una especie de cresta oscura de escamas en las alas anteriores y mide cerca de 0.84 cm de largo. Puede distinguirse entre hembras y machos por la posición de su orificio ventral (Corella-Madueño *et al.*, 2012). El apareamiento y la deposición de huevos se producen durante la noche y la hembra puede depositar de 50 a 150 huevos durante su vida (Aguilar *et al.*, 2007). Los huevos son pequeños y ovalados, de aproximadamente 0.36 X 0.65 mm. La primera generación de huevos se coloca dentro o cerca de los lóbulos del cáliz de los frutos después de la polinización (Aguilar, 1986). Los huevos de GBN inicialmente son de color blanco, que van cambiando gradualmente conforme van madurando, hasta tomar un color rojo, tres a cinco días antes de la eclosión. Cuando nacen las larvas que son de color blanco a amarillo, se alimentan inicialmente de los brotes (Mulder *et al.*, 1997). Las larvas en plena madurez son de color gris olivo, luego pasan a ser de color verde jade y adquieren una tonalidad café oscura (Corella-Madueño, *et al.*, 2012). Durante el estado larval permanecen dentro de las nueces inmaduras, alimentándose durante 4 ó 5 semanas. Se puede detectar la entrada de las larvas por la presencia de heces en la base de los frutos. Las larvas completamente desarrolladas pupan dentro de la nuez y emergen como

polillas que viven alrededor de 9 días. Cuando no hay nuez inmadura, el GBN permanece alimentándose dentro de los tallos del nogal (Figura 2) (Tarango y González, 2007).

Insecto Holometábolo y Monófago

El GBN es monófago (Harris y Jackman, 1991) porque se alimenta exclusivamente de nogal pecanero y es una plaga primaria porque destruye estructuras vitales de la planta, como son tallos y frutos (Harris, 1983). Es un insecto holometábolo, lo que significa que en su ciclo de vida pasa por la estructura de huevecillo, del cual eclosiona como larva y atraviesa por cuatro estadios larvales. Del último estadio se forma la pupa, dentro de la que permanece mientras sufre una metamorfosis hasta convertirse en palomilla adulta, que vive de 8 a 10 días, durante este tiempo, se aparea, oviposita y muere (Corella Madueño, 2010). Se producen 4 ciclos o generaciones del GNB (Cuadro 1) en el tiempo que dura la etapa productiva de cultivo de nuez pecana (aproximadamente 6 meses), demostrando un total acoplamiento del insecto a la fenología del nogal (Tarango y González, 2007). Este insecto requiere mucha energía para efectuar cada ciclo y además repetirlo varias veces en un tiempo muy corto. De acuerdo a Janz (2011) los insectos obtienen de su hospedero todos los recursos nutritivos necesarios para mantener su condición. El GBN en cada etapa larval, desprende parte de su cutícula (exuvias) al cambiar de un estadio larval a otro y cuando sale de la pupa, en forma de palomilla, nuevamente necesita formar cutícula para su exoesqueleto. Por lo tanto el proceso de formación de cutícula es muy importante para este insecto durante su ciclo de vida.

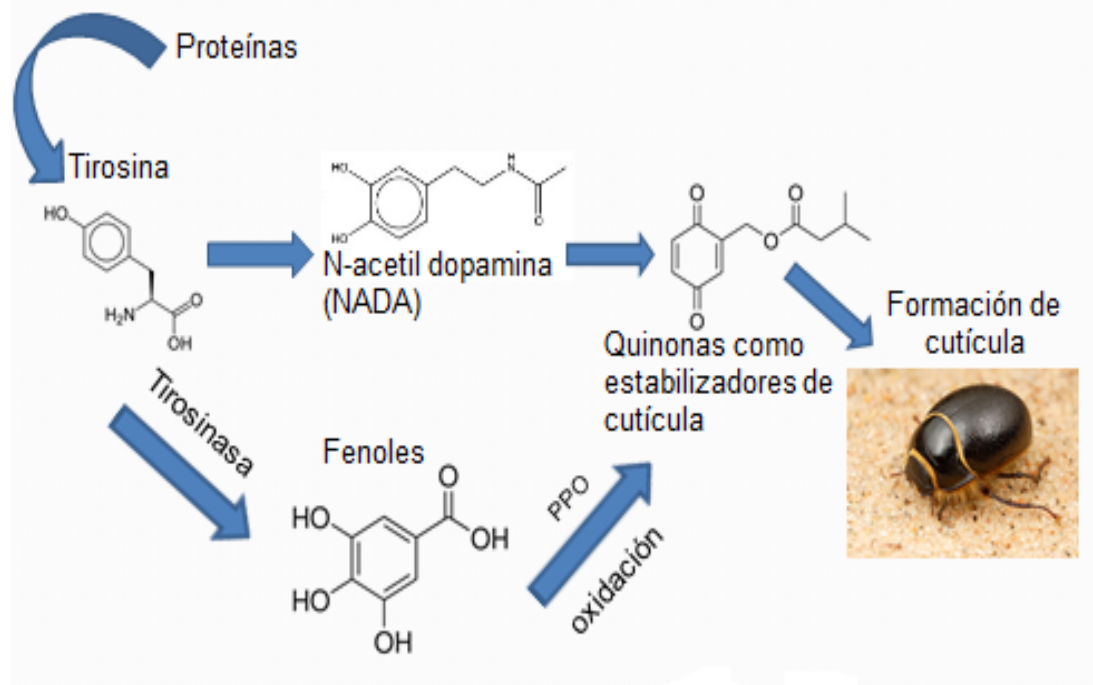
Formación de cutícula.

La cutícula es una capa que recubre externamente el cuerpo del insecto y tapiza ciertas superficies internas. Esta capa realiza importantes

funciones mecánicas proporcionando al organismo protección para evitar el rompimiento o deformación bajo presión (Hadley, 1984; Reynolds, 1987). La cutícula tiene una estructura laminar con capas dispuestas en paralelo a la superficie. En la zona exterior o epicutícula se distinguen de fuera a dentro, la capa de cemento (para protección), la capa de ceras (que evita las pérdidas de agua y es una barrera a la entrada de insecticidas) y la cuticulina, que es quizás la capa más importante, por ser barrera permeable selectiva y limitar el crecimiento al ser inelástica (Gillot, 1980). La procutícula o zona interna, está formada esencialmente por una matriz proteica en la que van embebidas gran número de largas fibras de quitina, que adoptan una disposición helicoidal (Hillerton, 1984; Reynolds, 1987). El principal componente de la procutícula es la quitina (polisacárido de N-acetilglucosamina) y su proporción va aumentando con la profundidad, oscilando el contenido normal medio entre un 25 y un 50 % (Davies, 1991). El segundo componente en importancia son las proteínas, conociéndose al menos 20 tipos diferentes de estas (Chen y Mayer, 1985). La zona externa se esclerotiza mediante la acción de quinonas (Hackman, 1984), constituyendo la exocutícula, el resto se denomina endocutícula.

En el proceso de formación de cutícula se requieren proteínas en grandes cantidades para obtener de ellas la fenilalanina y la tirosina, molécula de donde parte el proceso de formación de cutícula o esclerotización (Figura 5). La tirosina se transforma en compuestos fenólicos específicos (N-acetil dopamina) y estos compuestos al oxidarse se transforman en quinonas (Andersen, 1971). Existe la hipótesis propuesta por Bernays *et al* (1983) que cuando los insectos se alimentan de plantas pobres en proteínas, pero ricas en compuestos fenólicos, utilizan directamente los compuestos fenólicos de la dieta para transformarlos en quinonas, las cuales son utilizadas como estabilizadoras de cutícula. Bernays *et al* (1983) propone que es una adaptación del metabolismo del insecto para optimizar las proteínas cuando la planta hospedadora las contiene en baja

cantidad. De este modo, el insecto emplea las pocas proteínas que recibe para sus funciones vitales (Andersen, 2010; Bernays *et al*, 1983). En el caso del GBN, que se alimenta exclusivamente de nogal pecanero, necesita pasar por varios estadios para cumplir su ciclo de vida y ese ciclo lo realiza al menos 4 veces en un período de 6 meses, por lo cual su requerimiento de proteína o compuestos fenólicos es alto para producir cutícula y estabilizarla.



Andersen, 2010; Bernays *et al.*, 1983.

Figura 5. Esquema del proceso de esclerotización de insectos en el que a partir de la tirosina se obtienen fenoles que se oxidan en quinonas, las cuáles intervienen en la estabilización cuticular.

Insecto Plaga del Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*)

El GBN es una de las plagas de mayor impacto en la producción de nogal pecanero a escala mundial (Stevenson *et al.*, 2003). Este insecto se ha ido dispersando desde 1996 en los estados productores de nogal de México, siendo la Costa de Hermosillo en Sonora, la última región en la que se detectó la presencia de este insecto en el 2002, y para el 2004 el GBN en la Costa de Hermosillo ya se consideraba una plaga de importancia económica (Fú-Castillo *et al.*, 2004; Fú-Castillo, 2005; Fú *et al.*, 2006). En esta región productora de nuez, en el ciclo 2002-2003, en la época de brotación de los nogales (marzo), se cuantificaron severos daños en los brotes de los árboles con pérdidas del 80% de fruta y con presencia del insecto en el 67% de los huertos en producción (Fu-Castillo *et al.*, 2004). El potencial de daño varía. Cuando no se controla (Tarango, 2005), es posible perder la totalidad de la cosecha (Aguirre *et al.*, 1995) y en la región nogalera de Sonora, el insecto encontró las condiciones agroecológicas propicias para su desarrollo (Knutson and Ree, 2004).

Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*)

Características generales del cultivo

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*) es una planta perteneciente a la familia de las juglandáceas. Dependiendo de la variedad de que se trate, llega a medir de 12 hasta 40 metros de altura. Su fruto recibe el nombre de nuez pecana o nuez americana, para diferenciarlo de la nuez de Castilla o nuez europea (Cano y Medina, 2002). Este fruto se encuentra dentro de una cáscara indehisciente o endocarpio leñoso, formada de dos lóbulos carnosos comestibles. El árbol de nuez pecana es el único nogal de origen americano, ya que es nativo del sur de Estados Unidos y el norte de México. Para una mejor producción es muy importante considerar las condiciones

agroecológicas y éstas a su vez, están muy relacionadas con el área geográfica en la que se cultive (Harris and Jackman, 1991).

Distribución Geográfica e Importancia del Cultivo

En Norteamérica se encuentran los principales productores de nuez pecanera. Estados Unidos ocupa el primer lugar en producción en el mundo y México ocupa el segundo lugar (SAGARPA, 2012). La producción de nuez en la región nogalera en la franja fronteriza entre ambos países cubre, prácticamente, la demanda mundial de este fruto seco (Hadjigeorgalis *et al*, 2005). La exportación e importación de nuez pecana se observa principalmente en Estados Unidos. Actualmente son China y Estados Unidos los principales compradores de nuez pecana producida en México, la cual es apreciada por su alta calidad y sanidad. El año 2012, China compró ocho mil toneladas de nuez pecana cosechada en México (SAGARPA, 2012).

La producción de nuez pecana en México es de aproximadamente 96,277 toneladas, de las cuales 58,810 se cosechan en el estado de Chihuahua, principal estado productor de la República Mexicana, le siguen los estados de Coahuila, Sonora, Nuevo León y Durango. La producción de estos 5 estados, representan el 92% de la producción nacional. En este cultivo se emplean de 20 a 40 jornales por Ha, generando alrededor de 5,000 empleos indirectos en el campo (González-Hernández, 2009).

La productividad de las plantas de nogal puede ser afectada por varios factores, como son el clima, las enfermedades y el ataque de insectos. Todos estos factores están relacionados a su vez con cada etapa fenológica del cultivo ya que el ciclo vital de las plantas está gobernado por el clima, las enfermedades son consecuencia de las condiciones físicas y químicas en que se encuentre la planta y los insectos en general, adaptan su

ciclo biológico a las distintas etapas fenológicas de los cultivos (Knutson and Ree, 2004; Fu-Castillo *et al.*, 2005).

Fenología del Nogal

El nogal pecanero es un árbol caducifolio. Durante el reposo invernal permanece sin hojas, su actividad metabólica baja considerablemente y su crecimiento se reduce al mínimo, para poder resistir el frío de esta etapa (Espada, 2010), aunque el reposo profundo comprende los meses de Diciembre a Febrero, esta condición de reposo dura aproximadamente 6 meses (Wolstenholme, 1990; Lavee, 1973). Los otros seis meses es el tiempo que dura el ciclo productivo de la planta (Tarango y González, 2007).

En el Estado de Sonora, el nogal pecanero inicia su brotación a mediados de marzo, en abril se presenta la floración y el crecimiento de la nuecesilla. En los primeros días de mayo, las nuecesillas alcanzan cerca de 8 mm de diámetro y para junio alcanza los 2 cm. En los 45 días posteriores a la brotación ocurre el 75% del crecimiento total del brote (Cano y Medina, 2002; Marquad, 1990). Brotes vigorosos producen más flores, retienen más nueces y llenan mejor las almendras (Sparks, 1988). En julio y agosto continúan madurando y se cosechan desde finales de septiembre a finales de octubre. Una de las principales variedades de nogal pecanero que se produce en Sonora es: “Western” (González-Hernández, 2009).

Cada etapa fenológica de las plantas está relacionada con una gran variedad de compuestos y reacciones bioquímicas que son reguladas por acción enzimática. De estas reacciones se producen metabolitos primarios que tienen que ver con la nutrición, crecimiento y desarrollo de las plantas. Las plantas también producen otro tipo de metabolitos que no son considerados esenciales para las funciones principales de la planta, por lo que se conocen como metabolitos secundarios. El nogal pecanero se

considera una planta rica en metabolitos secundarios sobre todo los derivados de la vía de fenilpropanoides que son los compuestos fenólicos (Ávalos y Pérez–Urría, 2009).

Compuestos Fenólicos

Generalidades

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a otras estructuras. Aunque la mayoría de los compuestos fenólicos son polifenoles, los pertenecientes a la familia de los ácidos fenólicos son monofenoles. Se considera, por consenso, que los fenoles son sintetizados por las plantas para defenderse del ataque de patógenos y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. las antocianinas son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en el epicarpio o piel de las frutas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a quinonas de color pardo indeseable en algunos procesos (Paiva, 2000; Gimeno, 2004).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de herbívoros (Cejudo, 2010). Muchos son pigmentos que, al proporcionar color a flores y frutos, juegan un papel esencial en la reproducción, atrayendo ya sea a insectos polinizadores, o a organismos que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas para las plagas. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro. Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso, que comprende desde

moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, pasando por pigmentos flavonoides hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Schittko, 2001). Existen dos categorías de taninos: condensados e hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los taninos condensados y se hidrolizan más fácilmente. Los taninos generalmente están considerados como tóxicos debido a su capacidad de unirse a proteínas.

Compuestos Fenólicos Presentes en el Nogal

No existen muchos estudios de los compuestos fenólicos presentes en la planta de nogal, y los que están publicados están dirigidos a los compuestos fenólicos mayormente por su actividad antioxidante y antimicrobiana de las semillas. Entre los estudios publicados de compuestos fenólicos en nogal pecanero, está el de Ishak *et al.* (1980) quienes reportaron en tallo de nogal, la presencia de los flavonoides glicosilados: azaleatina 3-glucósido, azaleatina- 3-diglucósido y caryatina- 3-ramnoglucósido junto a azaleatina- 3-ramnosido. En las hojas, reportaron quercetina 3-glucósido, quercetina-3-galactosido, quercetina-3-ramnósido, quercetina- 3-arabinósido y kaempferol 3-monometilo. Se ha reportado el efecto antidiabético de los compuestos fenólicos del nogal pecanero. De la corteza del nogal se reportaron 7 flavonoides, entre los que se encontraban: caryatina-30 sulfato-metil éter y caryatina-30-metil-eter-7-OBd-glucósido (Abdallah *et al.*, 2011). En otro estudio se señalan 15 compuestos fenólicos en el nogal pecanero. Entre ellos el galato de metilo ácido hidroxibenzoico, 2,3-digalo- β -D-4C1-glucopiranosido, trifolina, kaempferol-3-O- β -D-4C1-galactopiranosido, Como también quercetina-3-O-(6'-O-galo) - β -D -4C1-galactopyranósidesida, así mismo, kaempferol-3-O-(6'-O-galo) - β -D-4C1-galactopiranosido, ácido

elágico, Ácido-3,3' dimetoxielégico, galato -3-O-epigallocatequina. La confirmación de la identificación de estos compuestos se realizó por Resonancia Magnética Nuclear (Pinheiro, *et al.*, 2009). Como se puede apreciar, varios estudios identifican compuestos fenólicos presentes en nogal; sin embargo, hasta el momento, no se han realizado estudios que relacionen los compuestos fenólicos del nogal con su insecto plaga *Acrobasis nuxvorella*. Es sabido que dependiendo del insecto, los compuestos fenólicos pueden ser deterrantes o atrayentes (Bernays *et al.*, 1983).

Importancia de los Compuestos Fenólicos en la Relación Planta-Insecto.

Los compuestos fenólicos pueden ser utilizados por algunos insectos para su desarrollo, como es el caso de *Anacridium melanorhodon* que fue alimentado, por el equipo de Bernays *et al.* (1983), con una dieta adicionada con ácido protocateico. Ellos observaron aumento en la talla y peso del insecto. Las mariposas y palomillas, "secuestran" flavonoides de su alimento en la etapa larval, lo cual significa que los almacenan sin metabolizarlos a otro compuesto para utilizarlos cuando son adultos. Tal es el caso de la quercetina la cual tiene un color amarillo y se ha demostrado su presencia en las alas de mariposas. Estudios en la mariposa monarca (*Danus plexippus*) reportan que guarda compuestos fenólicos flavonoides y cumarinas para utilizarlos en crear patrones de reconocimiento, para dar coloración a sus alas o para protegerse de radiaciones solares (Anaya-Lang, 2003; Wiesen *et al.*, 1994; Berenbaum, 1983). Se ha reportado que las hembras con contenido alto de flavonoides secuestrados y almacenados como pigmentos en sus alas, son más atractivas a los machos en búsqueda de pareja con fines reproductivos. La cantidad de flavonoides secuestrados puede ser 20% más en hembras que en machos (Wiesen *et al.*, 1994). La riqueza en flavonoides podría por lo tanto, aumentar la visibilidad (por la estimulación sensorial más eficaz del sistema visual), pero también, conferir información sobre la historia de la alimentación, y por lo tanto determinar la posible "fecundidad" de una

potencial pareja para mariposas, palomillas y otros insectos (Wiesen *et al.*, 1994). Hasta el momento no se tiene conocimiento de estudios que relacionen al gusano barrenador de la nuez con los compuestos fenólicos que consume de la planta de nogal pecanero, por lo que se desconoce el destino o función de estos compuestos en el insecto y su desarrollo en el caso de utilizarlos, generándose las interrogantes de cuáles compuestos fenólicos serían y cuál sería su función para su desarrollo.

HIPÓTESIS

Acrobasis nuxvorella (GBN) incorpora en sus estructuras de desarrollo (exuvia de larva, pupa y exoesqueleto de palomilla) compuestos fenólicos que consume de la planta de nogal pecanero (*Carya illinoensis*, K. Koch).

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar en las exuvias de larvas, pupas y exoesqueletos de Gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) la incorporación de compuestos fenólicos presentes en brotes y tegumentos de almendra de nogal pecanero (*Carya illinoensis*, K. Koch) variedad "Western" que le sirvió de alimento.

Objetivos Particulares

- a) Elaborar extractos hidroalcohólicos de brotes y nuecesillas de *Carya illinoensis* de variedad "Western".
- b) Identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de *Carya illinoensis*, variedad "Western", así como en exuvias, pupas, heces de larvas y exoesqueletos de adultos de *Acrobasis nuxvorella*.
- c) Determinar el porcentaje de proteína en tallo, brote, y nuecesilla de *Carya illinoensis* de la variedad "Western".
- d) Relacionar los compuestos presentes en *Carya illinoensis* con los de *Acrobasis nuxvorella* para definir si el insecto fue capaz de incorporar al menos un compuesto fenólico

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Material

Material Vegetal

En el huerto nogalero San Enrique, ubicado en la Costa de Hermosillo, Sonora, México (Longitud -111.635278, Latitud 28.850278) se colectaron brotes de 4 cm de longitud en Marzo del 2012 y nuecesillas de aproximadamente 2 cm de *Carya illinoensis* variedad "Western" en Mayo del 2012. Las muestras se transportaron al laboratorio de Ecología Química del CIAD A.C. y se procedió a separar el ruezno del contenido interno de la nuez al cual se le denominó "tegumento de nuecesilla", puesto que en esa etapa, la almendra, que será la parte comestible de la nuez, aún no se ha desarrollado y sólo se ha formado el tegumento, tejido que separará las almendras. Después de la formación del tegumento viene la etapa de llenado de las almendras.

Material Biológico

El GBN se obtuvo colectando nuecesillas inmaduras de aproximadamente 2 cm, infestadas de manera natural en el campo, se extrajeron las larvas y se criaron en el laboratorio, alimentándolas con tegumento de nuecesillas y brotes molidos. Durante su desarrollo, se fueron colectando las exuvias de las larvas y también las pupas, las cuales se almacenaron a 4° C hasta su análisis. Los exoesqueletos de las palomillas se obtuvieron de los adultos emergidos de las pupas. Las heces se

colectaron de las larvas cuando éstas estaban en su proceso de desarrollo (Corella-Madueño *et al.*, 2010).

Preparación de Extractos de Planta de Nogal

El material vegetal colectado, fresco y libre de presencia de larvas o huevecillos de insectos, se acondicionó para la preparación de los extractos. Las nuecesillas se disectaron en ruezno y tegumento para obtener el extracto hidroalcohólico únicamente del tegumento ya que es esta parte de donde se alimenta el insecto; los brotes se utilizaron completos. Se pesaron 500 g de material vegetal y se adicionó una solución de alcohol etílico-agua (70:30) hasta cubrir el material vegetal (brotes y tegumento de nuecesillas por separado). Se dejó en reposo por una semana en obscuridad. Transcurrido el tiempo, se filtró el material primero con gasa y después con papel filtro Whatman número 4. Del filtrado se eliminó el etanol en un rotavapor (Labconco, modelo D402-2, E.U.A.) a 39 °C y 120 rpm. La fracción acuosa no evaporada en el matraz se congeló a -80 °C y se liofilizó (Labconco, Freezone, modelo 4.5, E.U.A) para finalmente obtener un polvo seco que se utilizó para la extracción de compuestos fenólicos. La fracción que quedó pegada al matraz se disolvió en 3 ml de acetona, luego se puso a secar en atmósfera de nitrógeno. La obtención del rendimiento en porcentaje de los extractos de brotes y tegumentos de almendras, se hizo dividiendo el peso de cada extracto entre el del material fresco inicial, multiplicado por cien.

Extracción de Compuestos Fenólicos (en material vegetal y GBN).

Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizó la técnica descrita por Long y Harnly (2007). Este método consiste en analizar la misma muestra con 4 tratamientos diferentes, con la finalidad de identificar el

mayor número de compuestos fenólicos. Los 4 tratamientos se emplearon tanto para los extractos de nogal como para las estructuras de desarrollo y las heces de larvas del GBN. Brevemente se describen estos 4 tratamientos. El primero consistió en pesar 100 mg de material seco y molido, después se disolvió con 5 mL de metanol/agua (60/40 v/v), los 5 mL de muestra se sonicaron (sonicador Branson 2510, E.U.A., 40 KHz, 100 W) durante 60 min a temperatura ambiente, finalizando este paso una pequeña parte de la muestra se filtró y se analizó en el equipo HPLC. Para el segundo tratamiento, partiendo de la muestra sonicada, se tomaron 0.5 mL y se mezclaron con 0.1 mL de HCl al 37%, se calentó la mezcla a 85 °C durante dos horas, finalizado este paso, se adicionaron 0.4 mL de metanol, que nuevamente se sonicó durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se filtró la solución y se inyectaron 20 µL en el HPLC. Para el tercer tratamiento se tomó 1 mL de la solución sonicada, se llevó a sequedad a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno, se ajustó el pH a 1 con HCl (37%); posteriormente se adicionaron 550 µL de metanol y se dejó reposar bajo atmósfera de nitrógeno por 18 horas. Transcurrido este tiempo se filtró y se inyectó en el HPLC. Para el cuarto procedimiento de extracción, se tomaron 0.5 mL de la muestra sonicada original y esta cantidad se calentó a temperatura de 80 a 85°C durante 16 horas. Terminado el tiempo de calentamiento, se filtró y se analizó en el equipo HPLC.

Identificación de Compuestos Fenólicos

Se utilizó un equipo HPLC (HP, modelo 1100, E.U.A.), compuesto de una bomba cuaternaria, acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD), un inyector Rheodyne manual y se utilizó una columna Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm y 5 micras de partícula). Todas las muestras, previo a la inyección se filtraron con acrodisco de Nylon de 0.45 micras, se analizaron 20 µL de cada muestra. Para la identificación de los compuestos fenólicos se utilizó el

método de separación propuesta por Simirgiotis (2008), que consistió en una fase móvil de Ácido fórmico 1 % (A) y Acetonitrilo 100 % (B), usando un gradiente escalonado, iniciando con 80 % de A y 20 % de B, alcanzando el 100% de B en 60 min, con un flujo 0.3 mL/min. La detección se hizo a 250, 280 y 320 nm para monitorear la absorción UV/Vis de cada compuesto. El espectro UV/Vis (200-600 nm) fue grabado durante la elución de los compuestos. Cada cromatograma se analizó comparando los espectros ultravioletas de las muestras, con los espectros de compuestos de referencia de alta pureza estándares SIGMA-Aldrich almacenados en una biblioteca creada en el laboratorio de Ecología Química del CIAD A.C. Los compuestos que presentaron un factor de comparación superior a 900 y que coincidía el tiempo de retención con el del estándar de referencia, se eligieron para confirmar la identificación, la cual se realizó mediante la técnica de estandar externo, cuando la señal se incrementó en el cromatograma, se consideró positiva la presencia del compuesto fenólico en la muestra.

Determinación de Proteína Total en Nogal

Preparación de Materia

Para determinar el nitrógeno presente en el material vegetal que sirve de alimento al GBN, primero se deshidrató y se pulverizó. Se trocearon las muestras de la planta de nogal (tegumento de nuecesillas y brote) que representaron a las partes de la planta que sirvió de alimento al GBN, se colocaron en cajas Petri y se introdujeron en una estufa donde permanecieron una hora a temperatura de 40 °C. Posteriormente, se dejaron reposar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se pulverizaron en una licuadora Osterizer de una velocidad, modelo 450-10. Este material en polvo quedó listo para ser pesado y utilizarlo en la determinación de nitrógeno.

Determinación de Proteína

Para la determinación de proteína total contenida en estructuras de la planta, se cuantificó el nitrógeno contenido en estas estructuras, mediante el método descubierto por, Jean Baptiste André Dumas aproximadamente en 1831, utilizando un equipo Leco (TLECO® FP-528 C de E.U.A). De la cantidad de nitrógeno se estimó la cantidad de proteína, utilizando el factor de conversión de nitrógeno a proteína para vegetales recomendado por el fabricante del equipo. De cada muestra seca se pesó 0.1 g y se envolvió en papel aluminio. Posteriormente se colocó en el equipo Leco donde se sometió a una combustión a 850 °C para liberar el nitrógeno que se arrastró con la ayuda de gas helio hacia el detector. Después se determinó la cantidad de nitrógeno de cada muestra y se efectuó su conversión a porcentaje de proteína, multiplicando por el factor 6.25, recomendado por Leco, 2013. Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico del contenido de nitrógeno y porcentaje de proteína total de las partes de la planta de nogal (tegumento de nuecesilla y brote) que consumió el gusano barrenador de la nuez, se procedió a determinar el valor promedio de nitrógeno en cada una de las estructuras de la planta de nogal, variedad “Western” que fue analizada. Se realizó un análisis de media muestral y varianza muestral, y se hizo comparación de medias entre las repeticiones de cada muestra por el método de Tukey–Kramer, $p < 0.05$, empleando el programa NCSS, versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material Biológico

El material biológico utilizado en este trabajo como fueron las estructuras del insecto: exuvias y pupas de larvas, exoesqueletos de adultos y heces de larvas, fueron obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Corella-Madueño *et al.*, 2012).

Extractos de los brotes y del tegumento de almendra de nogal pecanero

Se obtuvieron dos extractos hidroalcohólicos secos, uno de brotes y otro de tegumentos de la planta de nogal. El rendimiento obtenido en la preparación de extractos se observa en el cuadro 3. Este rendimiento fue calculado en base al peso fresco del material extraído. Se obtuvo un rendimiento de 5.64 % en los brotes, casi cuatro veces el rendimiento de 1.50 % de los tegumentos de almendra.

Cuadro 3. Rendimiento obtenido en los extractos de Brote y Tegumento de nuecesilla de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*), variedad "Western"

Estructura	Rendimiento de Extracción (%)
Brotes	5.64
Tegumentos	1.50

Compuestos Fenólicos Presentes en Extractos de Nogal Pecanero

Identificación

Mediante un análisis bioinformático se identificaron los CF presentes en los extractos de brotes y tegumentos de nuecesillas, los cuales se muestran en los cuadros 4 y 5, donde se puede observar que en los brotes identificamos 14 compuestos y en los tegumentos 10. Este número de compuestos supera los reportados por De la Rosa, *et al.* (2010), quienes reportaron la identificación de 7 CF en hojas de nogal de las variedades Wichita y Western. Esta diferencia en el número, probablemente se deba a la estructura de la planta utilizada. De la Rosa *et al.* (2010) utilizaron hojas maduras y nosotros utilizamos brotes pequeños. También el proceso de hidrólisis pudo haber influido a favor nuestro pudiendo obtenerse más CF. En los dos extractos (brotes y tegumentos) encontramos que el grupo de los taninos cuentan con gran número de compuestos identificados, siendo el ácido elágico el compuesto representativo de este grupo. La presencia de este compuesto está asociada a que la planta de nogal tiene un alto contenido de elagitaninos (Abe *et al.*, 2010) y mediante la hidrólisis para la extracción de los compuestos fenólicos, se obtuvo el dímero ácido elágico y el monómero ácido gálico. Para la identificación de los compuestos fenólicos se obtuvieron los espectros de absorbancia ultravioleta de cada compuesto fenólico puro (estándares), inyectados en el HPLC en las mismas condiciones que se inyectaron los extractos, con el fin de comparar los espectros UV. De este análisis se confirmó, que los espectros ultravioleta de los compuestos identificados en los extractos de brotes y tegumentos de nuecesillas, correspondían con los espectros ultravioleta de los estándares, que coincidieron con un porcentaje de similitud superior a las 900 unidades de comparación. En la Figura 6, se muestra la respuesta del equipo en la comparación del espectro ultravioleta del ácido elágico, identificado en el extracto de brote y tegumento de nuecesilla “Western”, con el del espectro del

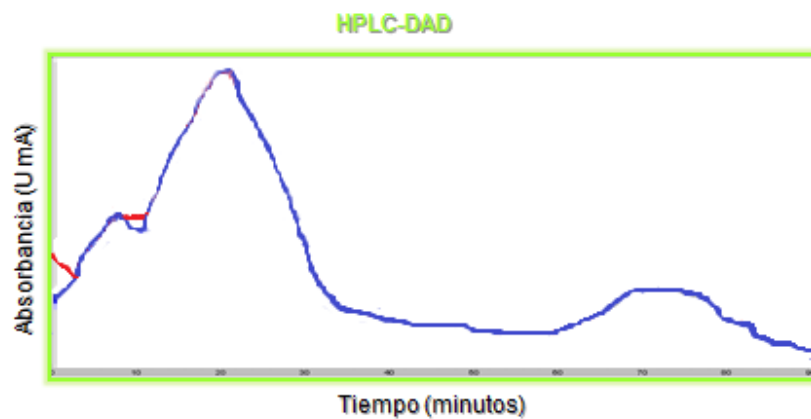
estándar del compuesto puro. En tegumento de nuecesilla, utilizando el primer tratamiento de extracción se observó el ácido elágico identificado con un porcentaje de similitud de 989.669 unidades de comparación.

Cuadro 4. Compuestos Fenólicos Identificados en extracto de brotes de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*), variedad “Western”, clasificados por Familia Química

Compuestos Fenólicos en Brotes	Clasificación
4 hidroxibenzoato de sodio	ácido fenólico
ácido gálico	ácido fenólico
ácido protocatéico	ácido fenólico
ácido p-coumárico	ácido cinámico
ácido cinámico	ácido cinámico
ácido elágico	tanino
galato de epigalocatequina	flavonoide
luteolina	flavonoide
quercetina 3 B glucósilada	flavonoide
quercetida 3 D galactósida	flavonoide
quercetina dihidratada	flavonoide
resveratrol	flavonoide
rutina hidratada	flavonoide
kaempferol	flavonoide

Cuadro 5. Compuestos fenólicos Identificados en extractos de tegumento de almendra de nuecesilla de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) variedad “Western” clasificados por familia química

Compuestos Fenólicos en Tegumento de nuecesilla	Clasificación
4 hidroxibenzoato de sodio	ácido fenólico
ácido gálico	ácido fenólico
ácido siríngico	ácido fenólico
ácido 3, 5 diaminobenzoico	ácido fenólico
ácido cinámico	ácido cinámico
ácido elágico	tanino
galato de epigalocatequina	flavonoide
miricetina	flavonoide
catequina	flavonoide
Catequina hidratada	flavonoide



- | Espectro UV de ácido elágico identificado en muestra de tegumento de nuecesilla de nogal pecanero.
- | Espectro de estándar puro de Ácido Elágico.
Factor de coincidencia entre el espectro UV de la muestra con referencia al estándar puro de ácido elágico: 989.699

Figura 6. Espectro UV del ácido elágico identificado en tegumento de almendra de Nogal Pecanero (*Carya illinoensis*) comparado con el espectro UV del estándar puro de ácido elágico.

Compuestos Fenólicos Presentes en Estructuras y Heces del Insecto y su posible Función Biológica

Los compuestos fenólicos identificados en las exuvias, pupas de larvas, exoesqueletos de palomilla y heces de insectos, se muestran en el cuadro 6, en el cual se puede apreciar un reducido número de compuestos identificados en estructuras del insecto en comparación con los identificados en la planta. Existen estudios como el realizado por Costa *et al.* (2006), quienes identificaron en otros insectos sustancias medicinales entre las que se encuentran compuestos fenólicos. Otros estudios, como los de Anaya-Lang (2003), y Bernays *et al.* (1983), quienes identificaron en saltamontes el ácido protocateico y ácido gálico, respectivamente, y reportaron que la posible función biológica de estos compuestos era proporcionarles a los insectos un mejor desarrollo, considerándolos solo como nutricionales de la dieta. Wiesen *et al.* (1994) identificaron compuestos flavonoides en la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) y concluyeron que las palomillas usaban los flavonoides para crear patrones en sus alas. Hasta el momento de escribir este trabajo, no encontramos estudios que relacionen al GBN con los compuestos fenólicos.

Exuvias de las larvas

En exuvias que las larvas del GBN fue dejando durante su desarrollo, identificamos la quinona del ácido gálico (Cuadro 6). La presencia de este compuesto en las exuvias de larvas puede ser deberse a que las quinonas interactúan con proteínas e intervienen en la estabilización de cutícula en el proceso de esclerotización (Andersen, 1971).

Pupas En las pupas se identificaron la quinona de ácido gálico, cumarina y Catecol (Cuadro 6). Las quinonas tienen gran relevancia en el proceso de esclerotización pues intervienen en la estabilización cuticular y ésta puede ser

la función de la quinona de ácido gálico (Andersen 1971). La presencia de la cumarina puede estar relacionada a la defensa ante otros insectos, depredadores del GBN, ya que la cumarina está reportada como un compuesto fagodisuasorio o deterrante para insectos (Barboza *et al.* 2010). Por su parte, la presencia del catecol, el cual está reportado como producto intermediario durante el proceso de esclerotización, específicamente por oxidación de fenoles simples (Andersen, 1971) y también está reportado que forma aductos con proteínas o aminoácidos que participan en los procesos de esclerotización de las cutículas de los insectos (Okot-Kotber *et al.*, 1996).

Exoesqueletos de Palomillas de GBN

En los exoesqueletos de los adultos, se identificaron quinona de ácido gálico, floridzina y cumarina (Cuadro 6). De la presencia del ácido gálico ya se discutió su función en el apartado anterior. La presencia de floridzina en los exoesqueletos de este insecto, puede estar relacionada a la regulación de los azúcares en el organismo de insectos, particularmente en la adición o eliminación de azúcares unidos a los fenoles, de la ya conocida función de compuesto deterrante de insectos depredadores (Caccia *et al.*, 2007), que impide que otros insectos los consuman. La presencia de compuestos flavonoides como la floridzina, secuestrados en las alas de los insectos, se ha reportado por Wiesen *et al.*, 1994, y se ha relacionado a la formación de patrones que ayuden al reconocimiento de individuos de su misma especie. La presencia de cumarina en los exoesqueletos del insecto, puede estar relacionada a la acción fagodisuasiva reportada en otros insectos (Barboza *et al.*, 2010). Demostrado en las mariposas monarca que ovipositan en la planta tóxica llamada “algodoncillo” (*Asclepiadaceae sp*) y cuando sus larvas eclosionan, consumen la planta tóxica. Las orugas toleran el veneno del algodoncillo y lo almacenan en sus tejidos como defensa contra sus depredadores (Duffey, 1996). Después de la metamorfosis, la mariposa monarca conserva la toxina almacenada para disuadir a sus posibles

depredadores (Granados-Sánchez et al, 2008). Otra función importante atribuida a las cumarinas, es la de proteger de la radiación UV a los insectos (Berenbaum, 1983). Esta función tiene relevancia en los adultos del GBN, ya que en la forma de adulto es el estadio del insecto expuesto a la radiación solar. Las larvas y pupas, pasan la mayor parte del tiempo dentro de los tallos o de nueces inmaduras (Harris, 1983) y entonces el insecto no requiere de la protección UV, sino de su función deterrante para que otros insectos no los ataquen y los devoren. Sin embargo, en el alimento (planta de nogal), no se identificó cumarina, la cual posiblemente pudo formarse por una transformación a partir del ácido cinámico, el cual fue identificado en el alimento (Figura 7) (Ávalos-García y Pérez-Urría, 2009).

Cuadro 6. Compuestos Fenólicos Identificados en exuvias, pupas de larvas, exoesqueletos de palomillas y heces de larvas de Gusano Barrenador de la Nuez (*Acrobasis nuxvorella*)

Exuvias	Pupas	Exoesqueleto de palomilla	Heces
qag**	qag**	qag**	galato de epigalocatequina
	catecol	floridzina	ácido protocatéico
	cumarina	cumarina	ácido Elágico
			catequina
			ácido siríngico
			4-hidroxibenzoato de sodio
			<i>p</i> -coumárico
			catequina hidratada

**quinona de ácido gálico

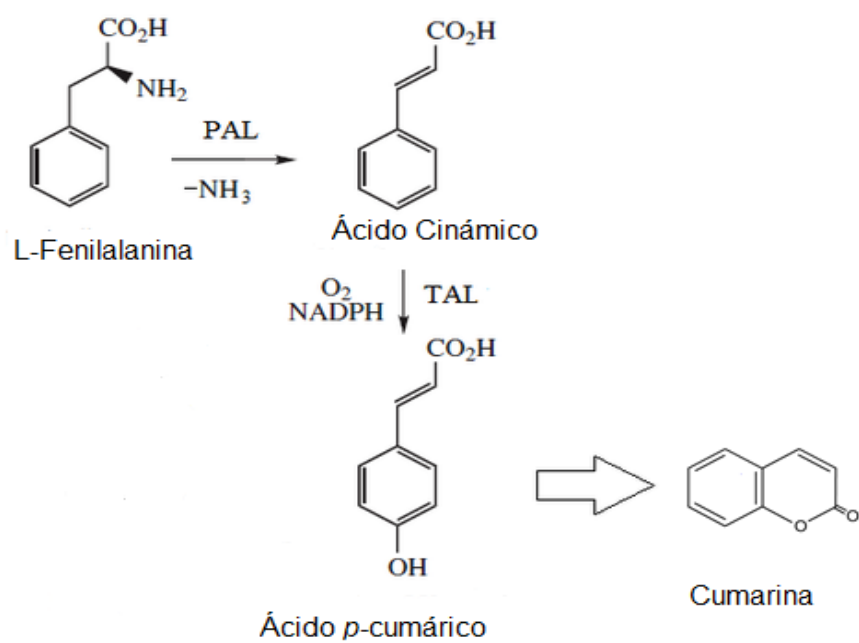


Figura 7. Síntesis de cumarina (Ávalos-García y Pérez-Urría, 2009)

Heces

Los 8 compuestos identificados en las heces de las larvas (Cuadro 6), fueron consumidos por las larvas ya que todos estos compuestos fueron identificados en los extractos de brotes o tegumentos de almendra que le sirvió de alimento. El galato de epigallocatequina se identificó en el alimento y en las heces. Este compuesto está reportado que interactúa con proteínas y glucanos para conferir rigidez (Nitta et al., 2004). En este trabajo, no se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos identificados, por lo que no se pudo determinar si el insecto utilizó de alguna manera parte de los compuesto que consumió ya sea transformándolo a otro compuesto o en procesos propios del desarrollo. Algunos compuestos identificados en el alimento, no fueron identificados en la heces, a continuación se discutirá las posibles explicaciones de la ausencia de cada uno de los compuestos en las heces del insecto.

Compuestos Fenólicos Identificados en la Planta y no Identificados en las estructuras del Insecto

Transformación de flavonoides a catequina

En las heces no pudimos identificar los flavonoides quercetinas, kaempferol, rutina, resveratrol y luteolina, que encontramos en las estructuras de la planta que el insecto consume. Es conocido que los flavonoides por glicosilación se transforman en otro compuesto (Ossipov *et al.* 2003). Pudiendo ser este nuestro caso, ya que las quercetinas por glicosilación forman catequinas (Figura 8), y en las heces del GBN, encontramos la catequina, la cual se forma de las pudiendo ser esta la explicación de la presencia de catequina y ausencia de quercetina. El proceso de glicosilación de flavonoides en insecto fue demostrado por Ossipov *et al.* (2003), en el

insecto plaga del abedul. Este insecto realiza la glicosilación de flavonoides mediante la actividad enzimática de glicosil transferasas, que forman parte de los procesos bioquímicos de hoja de abedul y, después de la ingestión, estas enzimas también pueden actuar a favor de las larvas, para producir algunas de las transformaciones detectadas en compuestos fenólicos que el insecto consume y aunque el insecto plaga del abedul no sintetiza las enzimas glicosil transferasas, utiliza las enzimas de la planta. En cuanto al compuesto quercetina dihidratada encontrada en los brotes que le sirvieron de alimento al GBN, pero no identificado en el insecto, podemos deducir que este compuesto pudo haber sido transformado a catequina (Figura 8) por el insecto y una posible vía sería la utilización de las enzimas de la planta. Otra posible explicación para el metabolismo de los compuestos fenólicos es la posible utilización por parte del insecto de los microorganismos simbióticos que habita el tracto digestivo y que la madre transmite a la descendencia. Este proceso fue reportado para larvas de mosca de la Sierra (Douglas and Beard 1996). La microbiota que habita el tracto digestivo también se puede derivar del ambiente circundante, incluyendo la planta huésped (Dillon and Dillon 2004). Las transformaciones detectadas pueden simplemente reflejar la historia evolutiva de la especie, que por coevolución entre una planta y su(s) herbívoro(s) puede, en teoría, producir herbívoros con adaptaciones específicas en la utilización de los alimentos (Janzen 1980, Thompson 1989; Thompson, 1992 y Burdon, 1992).

Ácidos fenólicos y fenoles simples

Los ácidos fenólicos y fenoles simples como el 4-hidroxibenzoato de sodio, Ác. gálico, Ác. protocatéico, no fueron identificados en las estructuras del GBN, y fueron consumidos en el alimento (brotes de la planta). Una posible explicación se basa en estudios realizados en larvas de *Anacridium melanorhodon* por Bernays *et al.* (1983). Estos investigadores observaron que las larvas del insecto incrementaron su crecimiento y vigor al consumir

ácidos fenólicos del tipo del 3,4-dihidroxifenoles, como son el ácido gálico y ácido protocatéico, ya que el insecto puede transformar estos compuestos para luego

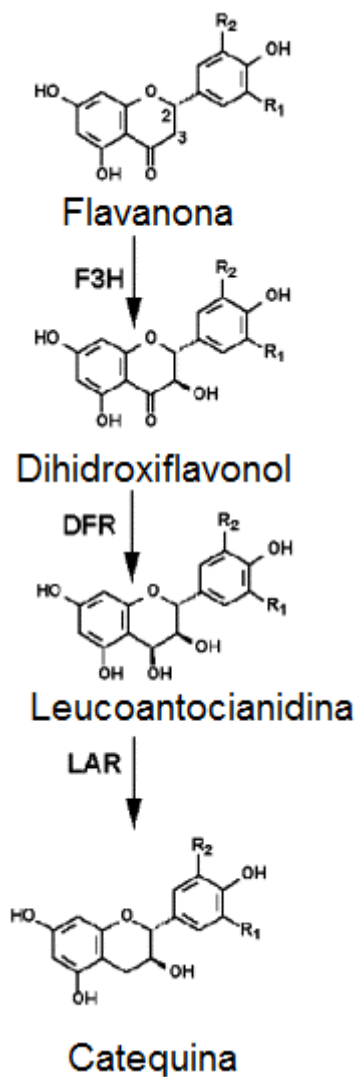


Figura 8. Conversión de flavonoides a catequina

incorporarlos a su cutícula. Esto fue demostrado cuando se adicionó a la dieta de las larvas ácido gálico marcado con ^{14}C y se detectó el carbono marcado que consumió el insecto: formando parte de una molécula distinta al ácido gálico en la cutícula y, otra parte, se identificó en las heces del insecto (Bernays and Woodhead, 1982). Estos autores concluyeron que el ^{14}C estaba integrado a una molécula distinta al ácido gálico y que esa molécula estaba incorporada en la cutícula del insecto. Además, debido a que la cutícula de los insectos contiene entre 5-20% de compuestos fenólicos de su peso seco (Andersen, 1971), se puede considerar que los insectos tienen un gran requerimiento de proteína para obtener los aminoácidos (fenilalanina) e iniciar su proceso de esclerotización (Bernays *et al.*, 1983). Este proceso depende de la fenilalanina para producir tirosina y de esta última se obtienen fenoles simples, del tipo del 3,4-dihidroxifenoles, que se transformaran en quinonas (Koepe and Gilbert, 1974), que servirán de estabilizadores del proceso de esclerotización del insecto (Andersen, 2010). Cuando la cantidad de proteína requerida por el insecto es limitante en la dieta, los ácidos fenólicos y fenoles simples de la dieta, se convierten en compuestos de gran valor para el insecto (Bernays *et al.*, 1983), porque así optimiza el uso de tirosina, aprovechando los compuestos fenólicos directamente de la planta, por lo que hipotetizamos que la larva del GBN, está utilizando estos ácidos fenólicos para transfórmalos en quinonas que utiliza en su proceso de esclerotización.

La transformación de ácidos fenólicos a quinonas, requiere de condiciones de oxidación fuertes. Estas condiciones han sido encontradas en el digestivo de insectos (Berenbaum, 1980), ya que en éste sistema digestivo pueden existir condiciones de pH que permitan la transformación de unas sustancias en otras (Johnson and Felton, 1996; Terra, 1990). Aunque existen grandes diferencias interespecíficas en el potencial redox entre las larvas de lepidópteros herbívoros, demostrado en *Manduca sexta* (Sphingidae) y *Polia látex* (Noctuidae), en las cuales se producen condiciones reductoras en los intestinos medios, mientras que en *Lymantria dispar* (Lymantriidae), *Danaus*

plexippus (Danaiidae) y *Papilio glaucus* (Papilionidae), se presentan condiciones oxidantes en los intestinos medios (Appel and Martin,1990). También en larvas de *E. autumnata*, se demostró la isomerización del ácido clorogénico, debido a las condiciones alcalinas en el intestino de las larvas (Constabel y Baberhenn, 2008). La regulación de las condiciones redox intestinal es una adaptación importante de insectos herbívoros a las defensas químicas de las plantas (Appel y Martin,1990).

Proteína Total en Tejido del Nogal Pecanero

La determinación de proteína total en las estructuras que sirvieron de alimento al GBN, mostraron que este insecto consume un alimento con bajo contenido de proteína (Figura 9), pudimos constatar que los brotes fueron los que presentaron el mayor contenido de proteína, con un valor de 19.92 %, el tegumento de 14.3% y los tallos de 14.08 %. Todos estos valores son considerados bajos de acuerdo a lo reportado por Bernays *et al.*, (1983). Esto explicaría el hecho de que las larvas del GBN prefieren los brotes a otras partes de tejidos (Corella-Madueño *et al.*, 2010).

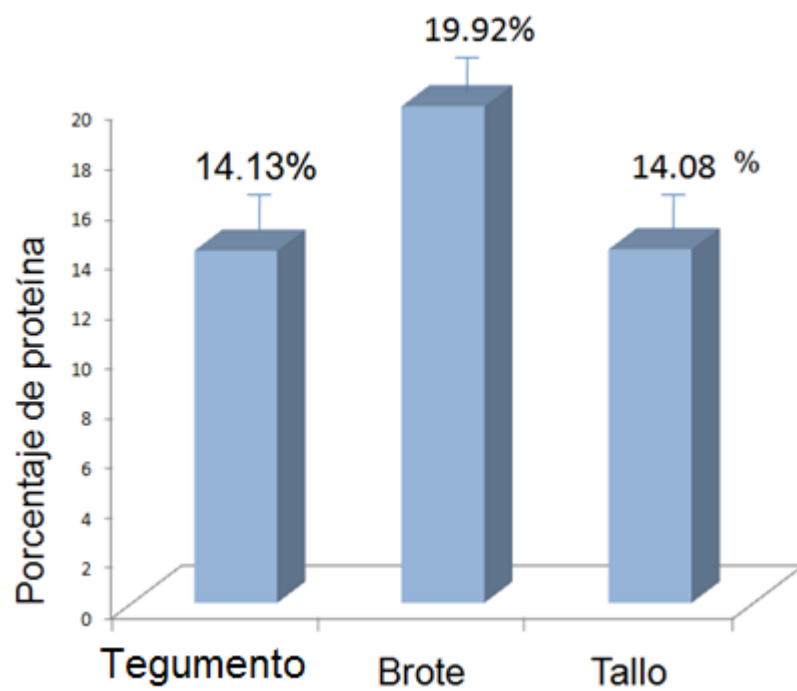


Figura 9. Porcentaje de proteína en estructuras de nogal pecanero

El bajo contenido de proteína de las estructuras del nogal refuerzan nuestra hipótesis de que el GBN podría estar empleando los compuestos fenólicos presentes en su hospedero (nogal pecanero) para transformarlos, posiblemente en quinonas, para su proceso de esclerotización (Figura 10), y optimizar la poca proteína del alimento para otros procesos metabólicos vitales, haciendo énfasis que el GBN es un insecto monófago y por lo tanto está tomando lo que ofrece la naturaleza para formar su cutícula (Andersen,1971)

Esta situación explicaría el hecho de las larvas del GBN posiblemente sean capaces de metabolizar una cantidad de estos ácidos fenólicos y fenoles simples y puedan transformándolos a otras moléculas y otro tanto sea desechado en las heces. Sigue aún la interrogante de cómo este insecto está utilizando los compuestos fenólicos. Los insectos, en general, no poseen las enzimas necesarias para poder metabolizar los compuestos fenólicos. Considerando que se trata de un insecto monófago, se puede deducir que al consumir la planta de nogal la detoxifica, sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado si esto es lo que ocurre y se requiere más trabajo de investigación, para determinar la función de los compuestos fenólicos que consume del nogal pecanero.

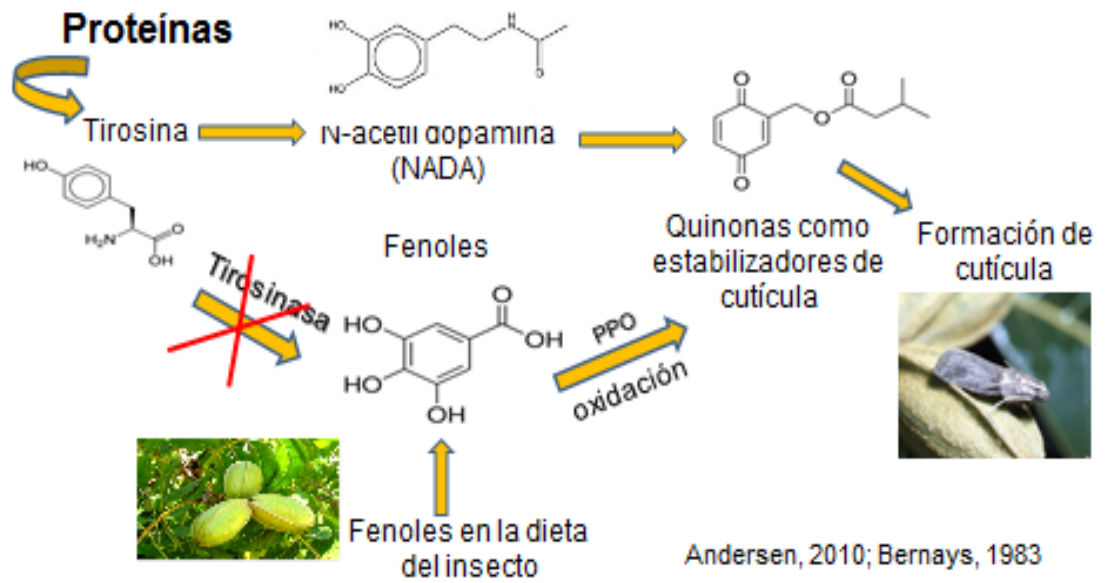


Figura 10. Incorporación de compuestos fenólicos de la dieta del insecto en su proceso de esclerotización.

Resumen de Resultados

Se demostró que el GBN incorpora en sus estructuras de desarrollo CF del nogal pecanero que consumió en la dieta. Algunos CF presentes en el nogal pecanero (ácidos fenólicos) no se identificaron en las diferentes estructuras del lepidóptero. Por otro lado las estructuras del nogal (brotes y tegumentos) que consume el insecto resultaron ser de bajo contenido en proteínas. Estos hechos fortalecen la hipótesis de que el insecto está utilizando los ácidos fenólicos para transformarlos en sustancias útiles (posiblemente quinonas para estabilizar su proceso de esclerotización). También fueron identificados en tejido de la planta, flavonoides, en su mayoría quercetinas, las cuales no se encontraron en las estructuras ni en las heces del insecto. Esto puede deberse a que las quercetinas y otros flavonoides se convierten en catequinas.

CONCLUSIÓN

El GBN incorpora en las exuvias, pupas y exoesqueletos de palomilla las quinonas derivadas de compuestos fenólicos que consumió de la planta del nogal pecanero.

RECOMENDACIONES

Sería conveniente hacer un análisis enzimático en el alimento del insecto y en sus estructuras de desarrollo. Esto podría ayudar a determinar si el insecto posee las enzimas o si las adquiere del alimento y sería de mucha utilidad para entender la compartimentalización, si esta existiera. También podrían hacerse estudios del pH del tracto digestivo del insecto para identificar las condiciones de acidez o alcalinidad que pudieran favorecer algunas transformaciones de los compuestos. Además, la cuantificación de los compuestos fenólicos, permitiría determinar el balance de materia y deducir el uso de los compuestos que consumió o si hubo transformación en el caso de los compuestos flavonoides a catequina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah H. M.; M. M Salama.; E. Hussein and S. A. El-Maraghy. 2011. Antidiabetic activity of phenolic compounds from pecan barks in streptozotocin-induced in diabetic rats. *Phytochemistry Letters*. Volume 4, Issue 3, September 2011, Pages 337-341.
- Abe L. T.; F. M. Lajolo and M. I. Genovese. 2010. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*. ISSN 0101-2061.
- Aguilar Pérez H. 2007. Principales plagas de nogal en el norte de Coahuila, SAGARPA-INIPAF, F. T. 14, ISBN 968-800-697-1. México.
- Aguilar Pérez H. 1986. Comportamiento fenológico de diecisiete cultivares de nogal pecanero en la región norte de Coahuila, CIAN, Informe de Investigación en frutales, Volumen 1:387-400. México.
- Aguirre L. A.; M. Tucuch and M. K. Harris. 1995. Oviposition and nut entry behavior of the pecan nut casebearer *Acrobasis nuxvorella*. *Sout. Entomologist* (20):447-451.
- Anaya-Lang A. L., 2003. *Ecología química*. Editorial Plaza y Valdés 1ª Edición. Editora: Ana Luisa Plaza y Valdés. México, D.F. 5: 142-158. México.
- Andersen S. O. 2010. Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect biochemistry and molecular biology*. 40: 166-178.

- Andersen S. O. 1971. Phenolic compounds isolated from insect hard cuticle and their relationship to the sclerotization process *Insect Biochemistry*. 1: 157-170.
- Appel H.M. and M.M., Martin, 1990. Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *Journal of Chemical Ecology*. 16: 3277–3290.
- Ávalos-García A. y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2(3), 119-145.
- Barbosa J.; Hilje L., Durón J., Cartín V. y Calvo M. 2010. Fagodisuasión de un extracto de ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae) y sus particiones sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Revista de Biología Tropical* versión ISSN 0034-7744, *Revista de Biología Tropical*. Vol.58.No.1.
- Berenbaum M. 1983. Coumarins and caterpillars: a case for coevolution. *Evolution*, Vol 37 No 1, 163-179.
- Berenbaum, M. 1980. Adaptive significance of midgut pH in larval. *Lepidoptera. American Naturalist* 115, 138–146.
- Bernays E. A.; D. J. Chamberlain and S. Woodhead, 1983, Phenols as nutrients for a phytophagous insect *Anacridium melanorhodon*. *Insect Physiol*, 6: 535-539.
- Bernays E. A. and S. Woodhead, 1982, Identification of flavonoids aglycons *Long. Science*. 4542: 201-203.
- Caccia S.; M. Casartelli; A. Grimaldi; E. Losa and F. Penacchio. 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical

GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals, American Journal. 292, 6:R2284-91.

Cano P. y M.C. Medina. 2002. Tecnología de producción de nogal pecanero. Libro técnico Núm. 3, Campo experimental La Laguna, ISBN 968-800-542-8, INIPAF-SAGARPA, México.

Cejudo M. J. 2010. Nuevas tecnologías basadas en la aplicación del oxígeno y uso de sustitutos del anhídrido sulfuroso I.S.B.N. Ediciones de la UCLM 78-84-8427-790-3, España.

Constabel C.P. and R. Barbehenn. 2008. Induced Plant Resistance to Herbivory, Springer Science Business Volumen 8, 12: 35.

Corella-Madueño A.G; A. Fú-Castillo; M. Harris; M. A. Martínez-Téllez and I. Vargas-Arispuro. 2012. Life cycle of laboratory-reared *Acrobasis nuxvorella*, Neuzing (Lepidóptera: Pyralidae): A pecan nut pest, American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 4: 334-389.

Corella-Madueño A. G.; M. Harris; A. Fu-Castillo; M. A. Martínez-Téllez. E. M. Valenzuela-Soto and J. C. Gálvez. 2011. Volatiles emitted by *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch as a prelude for semiochemical investigations to focus on *Acrobasis nuxvorella* Nuenzig (Lepidoptera: Pyralidae). Pest Management Science. 67(12):1522-7.

Costa E. M.; J. Ramos-Elorduy y J. M. Pino. 2006. Los insectos medicinales de Brasil: primeros resultados, Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, Núm. 38: 395-414.

- Chen A. C. and R. T. Mayer. 1985: Insecticides: effects on the cuticle. En: Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. Insect control.12:57-77.
- Davies, R.G. 1991. Introducción a la entomología. Mundi-Prensa. 5ta. Edición. España. 4: 415-449.
- Dillon R. J. and V. M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects, onpathogenic interactions, Annual revision, 49: 71-92.
- De la Rosa L. A.; E. A. Parrilla and F. Shahidi. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). Journal of Agricultural Food Chemistry. 59: 152–162.
- Díaz M. E. 2006. Comportamiento poblacional de *Phyllocnistis citrella*, Stainton (Lepidóptera: Gracillaridae) en vivero de cítricos de la isla de la juventud. Revista Protección Vegetal. Vol. 21 No. 1: 27-30.
- Dillon R. J. and V. M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects, nonpathogenic Interactions. Annual Review of Entomology. 49: 71-92.
- Douglas A.E. and C.B. Beard. 1996. In Biology of the Insect Midgut. Chapman and Hall. London 1st Edition. 5: 419–431.
- Duffey S. S. and M. J. Stout. 1998. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. Archives of insect biochemistry and physiology 32(1):3 - 37.

- Espada J.L. 2010. Informaciones técnicas. Centro de Transferencia Agroalimentaria FEADER, Núm. 224, I.S.S.N.: 1137/1730. Los Sitios, talleres gráficos, España.
- Fú-Castillo A.; A. Millanes, M. H; Núñez y M. Harris. 2004. Dinámica Poblacional del gusano barrenador de la nuez *Acrobasis nuxvorella*, Neunzig (Lepidoptera: pyralidae) en Sonora. Revista Entomológica Mexicana (3) 559-663. México.
- Fú-Castillo A. A. 2005. El gusano barrenador de la nuez. Seminario del Nogal. Memoria No. 19. INIFAP,p.52-59. Hermosillo, Sonora, México.
- García-Hernández J. L.; I. Orana-Castillo; G. González Cervantes; R. Váldez-Cepeda; B. Murillo-Amador; E. Troyo-Diéguez, M. Fortis-Hernández y M. A. Segura-Castruita. 2009. Interacciones nutrimentales y normas de diagnóstico de nutrimento compuesto en nogal pecanero (*Carya illinoensis*), Revista Chapingo, Serie Horticultura, Volumen 15, Número 2.
- Gillot C. 1980: Entomology. Plenum Press. New York, 729 pp.
- Gimeno C. E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud, Vol. 23, No. 6, Offarm, Elsevier, España.
- Granados-Sánchez D.; P. Ruiz-Puga y H. Barrera-Escorcia. 2008. Ecología Herbolaria, Revista Chapingo, Vol. 4, No. 1.

- Hackman R.H 1984. Cuticle: Biochemistry. En: Biology of the integument, Ed. Springer-Verlag. Cap. 8, 583-610. Berlin, Germany.
- Hadjigeorgalis E., J. Lillywhite and Herrera. 2005. International Trade in Pecans, Guide Z-503, College of Agriculture and Home Economics, New Mexico, U.S.A.
- Hadley N. F. 1984. Cuticle: Ecological Significance. En: Biology of the integument, Bereither-Hahn. J.; Matoltsy, A. G.; Richards, K. S. Ed. Springer-Verlag. Berlin. 1: 685-693.
- Harris M. 1983. Integrated Pest management of pecans, Annual review Entomology, 28: 291-318.
- Harris M. y J.A. Jackman. 1991. Manejo de artrópodos en nuez pecana. Agriculture research service ARS-96, 6-15 Universidad de Minnessota, U.S.A.
- Hillerton J. E. 1984. Cuticle: mechanical properties, Biology of the tegument Bereiter-Hahn J.; A. G. Matolsty; K. S. Richards. Springer-Verlag. pp 626-637. Berlin, Germany.
- Ishak M. S.; A. A. Ahmed; M. F. Abd-Alla and N. A. M. Saleh, 1980, Flavonol glycosides of *Carya Pecan*, Phytochemistry, Vol. 19, 2512-2513.
- Janz N. 2011. "Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies" Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 42: 71-89.
- Janzen D.H. 1980. When is it coevolution? Journal: Evolution 34: 611-61.

- Johnson, K.S. and G.W.Felton. 1996. Physiological and dietary influences on midgut redox conditions in generalist lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology* 42 (3), 191–198.
- Knutson, A. E. and B. Ree. 2004. Managing insect and mite pests of commercial pecans in Texas. Texas AgriLife Extension Service. Online publication E-215.
- Knüttel K. and K.Fiedler .2001. Host plant derived variation in ultraviolet wing patterns influences mate selection by male butterflies. *J Exp Biol.* 204(Pt 14):2447-59.
- Koeppel J.K. and L.I Gilbert. 1974. Metabolism and transport of a possible pupal tanning agent in *Manduca sexta*, *J. Insect Physiology* 20, 981-992.
- Lahtinen M.; L. Kapari; V. Ossipov; J.-P. Salminen; E. Haukioja and K. Pihlaja. 2005. Biochemical transformation of birch leaf phenolics in larvae of six species of sawflies. *Chemoecology* 15, 153-159.
- Lavee S. 1973. Dormancy and bud break in warm climates; considerations of Growth regulator involvement. *Acta horticulturae*, 34, 225-234.
- Leco C. 2013. Nitrogen/Protein in Organic Samples, FP-528, U.S.A
- Long-Ze and J. M. Harnly. 2007. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 (4), pp. 1084–1096.
- Marquard R. 1990. Pecan biology. In: Second pecan orchard management shortcourse. CES-New Mexico State University. U.S.A.

- McEachern G.R. 1985. Pecan fertilization in Texas pecan orchard Management handbook, Texas, Texas A&M University. Galveston, Texas, USA.
- Meshkova V. 2003. Point evaluation of forest plots preferences for foliage browsing insects. *Forestry & Forest Melioration*, 104: 182–190. Ukrainian.
- Mulder P.G.; B.D. McGraw; W. Reid and R. A. Grantham. 1997. Monitoring adult weevil populations in pecan and fruit trees in Oklahoma. Oklahoma Cooperative Extension Service fact sheet No. 7190.
- Nava C.U. 2013. Manejo integrado de plagas en el nogal pecanero, INIPAF. Editorial Torres Reyes. México, pp. 115-130.
- Nitta Y.; Y. Fang; M. Takemasa and K. Nishinari. 2004. Gelation of xyloglucan by addition of epigallocatechin gallate as studied by rheology and differential scanning calorimetry. *Biomacromolecules*, 5-1206-1213.
- Ossipov E. A.; J.-P. Salminen; S. Ossipova; E. Haukioja and K. Pihlaja. 2003. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway, *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 3–16.
- Okot-Kotber B.M.; T.D. Morgia; T. L. Hopkins and K. J. Kramer. 1996. Catecholamine-Containing Proteins from the pharate pupal cuticle of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 24(8):787-802.

- Paiva N. H. 2000. An introduction to the biosynthesis of chemical used in Plant Microbe communication. *Journal Plant Growth regulation*. 19:131-143.
- Pinheiro A. C.; A. M. Aragao; R. Fett, and J. M. Block. 2009. Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts obtained by sequential extraction. *Grasas y Aceites*, Vol 60, No 5 460-469.
- Reynolds, S. E. 1987. The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pestic. Sci*, 20:131-146.
- Ring D. R. and M. K Harris. 1984. Nut entry by 1st summer generation pecan nut casebearer. *The Southwestern Entomologists* 9(1): 13-21.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. La Nuez Pecanera Mexicana “La reina de las frutas secas”. Año 3, Número 60, Boletín Pecanero, SAGARPA, México.
- Schittko U. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. II. Accumulation of plant mRNAs in response to insect-derived cues. *Plant Physiology* 125, 701-710.
- Simirgiotis M., C. Theoduloz, P. Caligary and G. Schmeda-Hirschman. 2008. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. *Food Chemistry*. 113(2): 377–385.

Sparks D. 1988. Growth and nutritional status of pecan response to phosphorus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 113(6): 850-859.

Stevenson D.E.; A.E. Knutson; W. Ree; J.A. Jackman; A. Dean; J.H. Matis; J. McVay; M. Nesbitt; R. Mizell and J. Dutcher. 2003. Pecan nut casebearer pheromone monitoring and degree day model validation across the pecan belt. *South. Entomol. Suppl.* 27:57-74.

Tarango R.S.H. 2005. Control Biológico de Áfidos del Nogal Pecanero. Folleto Técnico. INIFAP-Delicias, Chihuahua, México.
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2573/Control%20biologico%20de%20afidos%20del%20nogal%20pecanero.pdf?sequence=1>. Accesado en agosto de 2013.

Tarango, S.H.R; H. Aguilar P. y F.J. Quiñónez P. 2003. Biología, muestreo y control de los barrenadores del ruezno y de la nuez. INIFAP. Folleto técnico No. 12-26.
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2532/Biologia%2c%20muestreo%20y%20control%20de%20los%20barrenadores%20del%20ruezno%20y%20de%20la%20nuez.pdf?sequence=1>. Accesado en agosto de 2013.

Terra, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35, 181–200.

Thompson J.N., 1989 Concepts of coevolution, *Trends in Ecology and Evolution*, Volume 4, Issue 6: 179-183.

Thompson, J. N., and J. J. Burdon. 1992. Gene-for-gene coevolution between plants and parasites, *Nature*, 360:121–125.

Wiesen B.; E. Krug; K. Fiedler, V. Wray and P. Proksch. 1994. Sequestration of host plant derived flavonoids by Lycaenid butterfly *Polyommatus icarus*, *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 20, No. 10. pp. 2523-2538.

Wolstenholme B. N. 1990. Resource allocation and vegetative reproductive competition: opportunities for manipulation in evergreen fruit trees. *Acta Horticulturae*. 275:451-459.