





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

Emisión de volátiles de diferentes variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) inducidas por herbivoría y su efecto en el insecto *Tamarixia triozae* (Burks), principal parasitoide del pulgón saltador (*Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Sulc.)).

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

**Ecología**

PRESENTA:

**Biól. Alicia Bautista Lozada**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA,  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA,  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
DRA. TILA MARÍA PÉREZ ORTIZ,  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MÉXICO, D.F. 2014



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de (Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas), del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de octubre del 2013, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna BAUTISTA LOZADA ALICIA con número de cuenta 507010054, con la tesis titulada: "Emisión de volátiles de diferentes variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) inducidas por herbivoría y su efecto en el insecto *Tamarixia triozia* (Burks), principal parasitoide del pulgón saltador (*Bactericerca* (Paratriozia) *cockerelli* (Sulc.))", bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Espinosa García.

Presidente: Dr. Alejandro Casas Fernández  
Vocal: Dr. John Paul Délano Frier  
Secretario: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa  
Suplente: Dra. Ek del Val de Gortari  
Suplente: Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de mayo del 2014.

*M. del Coro Arizmendi*

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



c.c.p. Expediente del interesado

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad y el privilegio de cursar el doctorado en esta institución y al Centro de Investigaciones en Ecosistemas-UNAM (CIEco) Campus Morelia, por brindarme todas las facilidades para realizar este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado.

Agradezco especialmente a mi tutor, el Dr. Francisco Javier Espinosa García, así como a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Ken Oyama Nakagawa y a la Dra. Tila María Pérez Ortíz, por su asesoría y apoyo durante este proceso.

### **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Agradezco especialmente a mi asesor, el Dr. Francisco, por su apoyo durante este proceso de aprendizaje; por su paciencia, su guía y por darme la oportunidad de equivocarme cuantas veces fue necesario.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio por sus valiosos comentarios a mi proyecto. A la Biól. Yolanda García, nuestra querida técnica del laboratorio, por su apoyo incondicional tanto profesional como humano.

A mis amigos, que nunca dejaron de creer en mí: Alejandra, Mariana, Fabia, Thalía, Florence, Arturo, Jocelyn, Michelle, Alex, Luisa, Erika, Héctor, Carlos.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, por motivarme a llegar cada vez más lejos, por contagiarme el gusto por la lectura y por transmitir conocimiento. A mi familia por sus motivaciones constantes.

A J. Flores y a C. Duvert por vivir el proceso junto a mí.

## INDICE GENERAL

**LISTA DE FIGURAS Y CUADROS 1**

**RESUMEN 5**

**ABSTRACT 7**

**INTRODUCCIÓN GENERAL 9**

**HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA TESIS 10**

**LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE INTRODUCCIÓN 11**

**CAPITULO UNO: ANTECEDENTES 13**

- a. “EFECTOS DE LA DOMESTICACIÓN DE PLANTAS EN LA DIVERSIDAD FITOQUÍMICA”. BAUTISTA-LOZADA, A. PARRA-RONDINEL, F., BRAVO-MONZÓN, A. E., Y ESPINOSA-GARCÍA, F. J. **14**
- b. “IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES VEGETALES”. BAUTISTA-LOZADA, A., Y ESPINOSA-GARCÍA, F. J. **29**

**CAPÍTULO DOS:**

“ODOUR VARIATION AMONG TOMATO INDIVIDUALS IN RESPONSE TO HERBIVORY DEPENDS ON INSECT SPECIES”. BAUTISTA-LOZADA, ALICIA, AND ESPINOSA-GARCÍA, FRANCISCO JAVIER. **.48**

**CAPÍTULO TRES:**

“TOMATO DOMESTICATION STATUS DETERMINES OLFACTORY PHENOTYPE INTRASPECIFIC HETEROGENEITY AND TRADE-OFFS BETWEEN THE CONSTITUTIVE AND INDUCED VOCs AFTER DAMAGED BY NYMPHS OF *BACTERICERA COCKERELLI* (SULC.) (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)”. BAUTISTA-LOZADA, A., ESPINOSA-GARCÍA, F.J., AND SÁNCHEZ-PEÑA, P. **61**

**CAPÍTULO CUATRO:**

“RESPUESTA DE *TAMARIXIA TRIOZAE* BURKS (HYMENOPTERA, EULOPHIDAE) A VOLÁTILES DE PLANTAS DE JITOMATE ATACADAS POR *BACTERICERA COCKERELLI* (SULC.) (HEMIPTERA, PSYLLIDAE)”. BAUTISTA-LOZADA, ALICIA Y ESPINOSA-GARCÍA, FRANCISCO JAVIER. **100**

**CAPÍTULO CINCO: DISCUSIÓN GENERAL 114**

**LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE DISCUSIÓN 120**



## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

### FIGURAS

---

#### CAPÍTULO UNO

**Figura 1.** Clasificación de los volátiles de acuerdo a su ruta metabólica. **31**

#### CAPÍTULO DOS

**Figure 1.** Total concentration of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato individuals (mean of peak areas of all compounds in the blend) before and after damage by Tomato psyllid nymphs (TP), Cabbage looper caterpillars (CL), Fall Armyworm caterpillars (FAW), and Mechanical damage (MD). Each line represents a plant within each treatment. **50**

**Figure 2.** Absolute concentration (mean  $\pm$  SD of peak area) of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato plants before (black bars) and after (white bars) damage treatments. **52**

**Figure 3.** Volatile organic compounds absolute concentration fold-change from the constitutive to the induced state emitted by Castlemart tomato plants under different damage treatments. **53**

**Figure 4.** Volatile organic compound blend profile (relative concentration) emitted by three selected tomato individuals before (black bars) and after (white bars) different damage treatments. **55**

**Figure 5.** Linear discriminant plots of the fold-change from the constitutive to the induced emission of the absolute (A) and relative (B) volatile organic compounds concentration emitted by individual tomato plants damaged by different agents. **56**

**Figure 6.** Linear discriminant analysis of the absolute (A) and relative (B) concentration of non-damaged (black points) and damaged (white points) Castlemart tomato individuals. **57**

#### CAPÍTULO TRES

**Figure 1.** Total amount of VOCs emitted by individual tomato plants before (C) and after (I) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. **86**

**Figure 2.** Correlation between the constitutive and induced VOC emission of cultivated and wild tomato plants. **87**

**Figure 3.** Mean ( $\pm$  SD of eight plants) absolute concentration of VOCs emitted by cultivated and wild tomato accessions before (black bars) and after (white bars) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. **89**

**Figure 4.** Fold-change of the absolute concentration of VOCs emitted by cultivated and wild tomato individuals. **91**

**Figure 5.** Individual relative concentration of VOCs emitted by three cultivated and three wild tomato individuals before (black bars) and after (white bars) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. **93**

**Figure 6.** Linear discriminant analysis of the absolute (A) and relative (B) concentration of VOC of individuals before (black points) and after (white points) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. **95**

**Supplementary Figure 1.** Mean ( $\pm$  SD of eight plants) absolute concentration of VOCs emitted by cultivated and wild tomato accessions before (black bars) and after (white bars) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. *spr2*, mutant suppressor of prosystemin-mediated responses<sup>2</sup>; *35S::prosys*, transgenic *35S::prosystemin*. **97**

**Supplementary Figure 2.** Fold-change of the absolute concentration of VOCs emitted by cultivated and wild tomato individuals. Fold-change represents the transition from a constitutive to an induced state and was calculated by the formula:  $T_2 - T_1 / T_1$  where  $T_1$  represents the VOC emission before damage and  $T_2$  represents the VOC emission after damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. **98**

## CAPÍTULO CUATRO

**Figura 1.** Concentración relativa promedio ( $\pm$  error estándar de tres repeticiones) de compuestos volátiles emitidos por plantas de jitomate variedad Río Fuego bajo tres tratamientos. **108**

**Figura 2.** Porcentaje de hembras de *T. triozae* que eligieron entre dos fuentes de olor de acuerdo a tres tratamientos. Tratamientos: plantas no atacadas, plantas atacadas (50 ninfas 5 d) y plantas expuestas (plantas colocadas a 15 cm de las plantas atacadas durante el tratamiento). **109**

## CUADROS

---

## CAPÍTULO UNO

**Cuadro 1.** Propuesta de estadios de domesticación según los niveles de intensidad de cambio que sufren las poblaciones de plantas objeto de manipulación humana y

domesticación. Modificado ligeramente de Clement, 1999. Entre uno y otro estadio de domesticación pueden existir estadios intermedios. **16**

Cuadro 1. Estudios de emisión de volátiles donde se ha encontrado atracción de enemigos naturales de artrópodos. **38**

## CAPÍTULO DOS

**Table 1.** MANOVA and Linear Discriminant Analysis (LDA) for fold-change in concentration from constitutive to induced volatile organic compounds (VOCs) emission (A) and size and shape VOC concentration analysis (B) for Castlemart tomato plants under different damage treatments. **54**

**Table 2.** Mean absolute concentrations (arbitrary peak area/30min  $\pm$  SD) of volatile organic compounds emitted by non-damaged and damaged Castlemart tomato plants. **54**

**Table 3.** Relative concentration (mean  $\pm$  SD percentage) of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato plants before and after different damage treatments. **55**

**Table 4.** Similitude (Euclidian distance mean  $\pm$  SD) among individuals subjected to the same damage treatment according to fold-change (A) and size and shape analysis (B) of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato plants. **56**

## CAPÍTULO TRES

**Table 1.** Mean ( $\pm$  SD of eight plants) VOC emission before and after *B. cockerelli* nymphs' feeding. **78**

**Table 2.** Diversity indexes of VOCs emitted by cultivated and wild tomato accessions **79**

**Table 3.** Effect of plant domestication status (PDS) and tomato accession (Tomato) over the concentration of volatiles organic compounds (VOCs) emitted by cultivated and wild tomatoes. **80**

**Table 4.** Uniformity in the VOC emission among individuals in terms of their absolute and relative concentration of volatiles emitted by cultivated and wild tomato plants. **81**

**Supplementary Table 1.** Mean ( $\pm$  SD) relative concentration of volatile organic compounds emitted by cultivated and wild tomato accessions before and after *Bactericera cockerelli* nymphs feeding. **82**

**Supplementary Table 2.** Effect of plant domestication status (PDS) and tomato accession (Tomato) over the fold-change in the relative concentration of volatiles organic compounds (VOCs) emitted by cultivated and wild tomatoes. **83**

**Supplementary Table 3.** Coefficients of linear discriminants of fold-changes in concentration of VOCs emitted by cultivated and wild tomato accessions. **84**

**Supplementary Table 4.** Coefficients of linear discriminants of size and shape concentration analysis of VOCs emitted by cultivated and wild tomato accessions **85**

#### **CAPÍTULO CUATRO**

**Cuadro 1.** Tratamientos y obtención de extractos de plantas de jitomate para cuantificación y pruebas de olfatometría. **104**

**Cuadro 2.** Concentración absoluta promedio ( $\pm$  error estándar de tres repeticiones por tratamiento) de volátiles emitidos por plantas de jitomate Río Fuego de acuerdo a tres tratamientos. **107**

Los cambios producidos por la domesticación vegetal han modificado la concentración y mezcla de compuestos secundarios como los volátiles orgánicos inducidos por herbivoría, los cuales pueden atraer insectos del tercer nivel trófico. Este cambio es considerado como una respuesta plástica adaptativa ya que la emisión inducida por herbivoría podría disminuir el impacto negativo de los herbívoros. No obstante, factores como la identidad del herbívoro que ataca a la planta así como su estado de domesticación pueden influir en la variación en la emisión de volátiles entre individuos dañados. La alta variación en la emisión de volátiles entre individuos de una misma población puede modificar la información emitida y percibida por insectos del tercer nivel trófico. Esta tesis se enfocó en analizar el efecto de la herbivoría y del estado de domesticación de la planta en la emisión de volátiles inducidos por herbivoría bajo la hipótesis de que *el estado de domesticación de las plantas determina la plasticidad de la emisión inducida por herbivoría*. La información acerca del efecto de la domesticación en la variación fitoquímica y la importancia de la emisión de volátiles en el ambiente, se presenta como antecedentes para este trabajo de investigación (Capítulo uno). Utilizando como modelo de estudio variedades cultivadas y silvestres de jitomate, analicé la variación en la emisión de volátiles de plántulas de sujetas a daño por diferentes herbívoros (Capítulo dos) y el efecto del estado de domesticación sobre la plasticidad de la emisión de volátiles inducidos (Capítulo tres) mediante dos variables: la magnitud del cambio en concentración y la variación entre individuos. La magnitud de cambio en concentración es una proporción calculada a partir de la colecta de volátiles antes y después de un daño; este enfoque toma en cuenta la variación constitutiva de cada grupo de individuos estudiados de tal forma que la concentración control de los volátiles fue aquella de los mismos individuos antes del tratamiento. La uniformidad o la variación en olor entre individuos fue calculada a partir de un análisis de discriminantes obtenido de matrices de concentración absoluta y relativa de volátiles (análisis de tamaño y forma). Por último, se exploró la posibilidad del uso de los volátiles inducidos por herbivoría por el parasitoide *Tamarixia triozae* mediante la técnica de olfatometría de dos vías (Capítulo cuatro).

En el Capítulo uno, se analizó la emisión de volátiles inducida por tres especies de herbívoros: *B. cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) y un tratamiento de daño mecánico (corte transversal de la hoja). Este primer objetivo permitió la construcción de la infraestructura del conocimiento de la respuesta de las plantas de jitomate a la herbivoría así como la validación técnica de los métodos de inducción, captura y análisis de volátiles. A partir de esta serie de experimentos, se encontró que cada herbívoro modifica de forma específica tanto la magnitud del cambio en concentración de volátiles y como consecuencia, la uniformidad de la emisión entre individuos. Por ejemplo, la variación entre individuos inducida por las larvas de *T. ni* es menor comparada con aquella inducida por ninfas de *B. cockerelli* (Bautista-Lozada and Espinosa-García, 2013).

En el Capítulo dos, la variación constitutiva de volátiles está asociada al estado de domesticación del jitomate debido a la riqueza y diversidad de volátiles. La emisión inducida está negativamente correlacionada con la constitutiva; dicha correlación negativa sugiere un compromiso asociado a la plasticidad, sin embargo, este compromiso no está asociado al estado de domesticación de la planta. La uniformidad de la emisión fue mayor entre individuos cultivados manteniéndose después de la alimentación por el psílido, mientras que la variación aumentó entre individuos silvestres disminuyendo el efecto del estado de domesticación del jitomate encontrado en la emisión constitutiva. En el Capítulo tres, al evaluar el efecto de los volátiles inducidos por ninfas de *B. cockerelli*, las hembras del parasitoide *T. triozae* no prefirieron los volátiles de plantas de jitomate atacadas frente a volátiles de plantas no atacadas. A partir de estos resultados, especulamos que posiblemente la alta variación en la emisión de volátiles entre individuos inducida por *B. cockerelli*, limite el uso de fuentes indirectas de información química por hembras de *T. triozae* y que por el contrario, las hembras utilicen fuentes de información tomadas directamente de las ninfas.

Con este trabajo se muestra que como resultado de la evolución de la emisión de volátiles bajo selección artificial ha aumentado la diversidad y variación de compuestos volátiles de jitomate. Sin embargo, la herbivoría es el factor que induce mayor variación en la emisión de volátiles entre individuos. La variación de la emisión de volátiles herbívoro-específica sugiere que una respuesta positiva por parte de los insectos del tercer nivel trófico a los volátiles inducidos por herbivoría debe abarcar el espectro de variación inducido por su presa. En otras palabras, el espectro de variación de la emisión de volátiles inducidos debería coincidir con el espectro de detección de señales químicas de los insectos del tercer nivel trófico para que la resistencia inducida de la planta sea considerada como defensa, es decir, que sea adaptativa.

## ABSTRACT

---

Plant domestication has changed the concentration and composition of secondary metabolites like herbivore-induced volatile organic compounds. Herbivore-induced volatiles can attract insects of the third trophic level, for instance predators and parasitoids, decreasing the negative impact of herbivores; therefore volatiles and other secondary metabolites are considered as an adaptive plastic response to damage. However, plant domestication status can modify variation in the volatile emission among individuals, thus modifying the chemical information emitted, possibly influencing the response of insects of the third trophic level. In this work we analyzed the effect of tomato domestication status and herbivory by nymphs of the psyllid *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae) on plant volatile emission. We used cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* var. Castlemart, Solanaceae) and wild tomato (*S. lycopersicum* var. *cerasifome*). We assessed two variables: the fold-change in concentration of individual volatiles and the variation in the volatile emission among individuals (uniformity in odor). Fold-change in concentration is a ratio calculated from the volatile emission of the same individual before and after damage. This approach incorporates the constitutive, as well as inducible, variation of each individual. Uniformity in odor was calculated from the values for absolute and relative volatile concentration (size and shape analysis) before and after damage. Finally, we explored the response to *B. cockerelli*-induced volatiles of females of its principal parasitoid, *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) using two-way olfactometry. The main three objectives of this thesis were (1) to study herbivore-induced emission of volatile organic compounds in tomato by determining the fold-change in volatile concentration and uniformity in odor in response to herbivores with different feeding modes, (2) to study the effect of tomato domestication status on psyllid-induced volatile emission, and (3) to assess behavioral responses of females of *T. triozae* to volatiles of *B. cockerelli*-infested tomato plants. Each objective represents a chapter in this thesis.

In chapter one, we found that volatile emission induced by three herbivores with different feeding modes (*B. cockerelli*, a piercing/sucking insect, and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), both chewing insects) and a mechanical damage treatment produced specific levels of variation among individuals. Each herbivore differentially modified the volatile profile as well as the uniformity in odor (*e. g.* higher variation among individuals induced by *B. cockerelli* nymphs compared to variation among individuals induced by *T. ni* caterpillars). This first objective gave the basis to validate the methodology of plant volatile induction by different herbivores, capture and analysis of volatiles.

In the second chapter, we found that plant domestication status determined the richness and diversity of tomato constitutive volatile emission. We found a negative correlation between the constitutive and induced volatile emission indicating a trade-off associated to plasticity but not related to tomato domestication status. Uniformity in odor was higher among cultivated individuals and remained within the same levels of variation

after feeding by *B. cockerelli* nymphs while variation among individuals increased in wild accessions.

In chapter three, we found that female *T. triozae* wasps did not prefer the volatile emission of tomato plants infested by 50 *B. cockerelli* nymphs over non-infested plants. It is possible that variation in the volatile emission among individuals, as described in chapters two and three, influenced the use of volatiles by females of *T. triozae*. They may prefer to use chemical signals directly from their hosts.

In conclusion, the evolution of the tomato plants under artificial selection has increased its volatile richness and diversity. However, herbivory has a major effect on variation in volatile emission. Herbivore-specific variation among individuals found in Castlemart tomato plants suggest that insects from the third trophic level should also have differential ranges of chemical detection in order to use herbivore-induced plant volatiles as reliable signals to find their hosts. In other words, the range of herbivore-induced variation among individuals should match the range of chemical signal detection of carnivore or parasitoid insects. We speculate that only in this case, herbivore-induced volatiles can be considered as an adaptive plastic response.



## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

La domesticación, a través de la selección artificial de algunas especies vegetales, ha modificado algunos caracteres genéticos y fenotípicos entre plantas silvestres y cultivadas. El síndrome de domesticación, el cual contempla las diferencias genéticas y morfofisiológicas entre plantas cultivadas y sus parientes silvestres, puede ser usado para medir los efectos de la evolución bajo ambos tipos de selección en la concentración de metabolitos secundarios. La emisión de compuestos volátiles inducidos por herbivoría es un rasgo fenotípico que ha evolucionado indirectamente bajo ambos tipos de selección (Gouinguéné *et al.*, 2001; Fritzsche-Hoballah *et al.*, 2002; Degen *et al.*, 2004; Chen y Welter, 2005). Los volátiles son intermediarios importantes en las interacciones planta-planta (plantas vecinas y entre tejidos lejanos (Heil y Silva, 2007; Geshenzon, 2007; Frost *et al.*, 2008)), y planta-insecto (Turlings *et al.*, 1995, 2004). Se considera que la emisión de volátiles inducidos por herbivoría es un rasgo adaptativo ya que los cambios en la emisión de volátiles se activan sólo en caso de daño por herbivoría y porque este cambio atrae a insectos depredadores a las plantas atacadas. En este último caso, los volátiles inducidos por herbivoría pueden regular la interacción entre plantas e insectos depredadores, los cuales pueden disminuir el efecto negativo de los herbívoros sobre las plantas (resistencia vegetal indirecta; Arimura, 2005).

Las premisas para que se establezca una interacción mutualista entre las plantas y los insectos depredadores a través de la emisión de volátiles es que (1) las plantas aumenten y/o modifiquen su emisión de compuestos volátiles orgánicos después de la herbivoría y (2) que la emisión de volátiles inducida por herbivoría facilite la localización de su presa (Steiger *et al.*, 2011). En el primer punto, la emisión inducida de volátiles debe diferenciarse de la constitutiva mediante cambios en la composición de la emisión dando información específica sobre insecto que la ataca, es decir, una respuesta herbívoro-específica. En el segundo punto, los insectos carnívoros utilizan la emisión de volátiles inducidos por herbivoría como una fuente de información indirecta la cual deben percibir y asociarla a su presa (Kessler y Heil, 2012). Sin embargo, la respuesta herbívoro-específica cambia la emisión de volátiles en dos aspectos que podrían afectar la atracción de insectos carnívoros a la planta atacada: la herbivoría cambia la composición de la mezcla (la concentración absoluta y relativa de cada compuesto en la mezcla) y la variación en la emisión de volátiles entre individuos, la cual afecta la uniformidad del olor.

La composición y la variación de la emisión de volátiles determinan la información percibida por organismos del tercer nivel trófico. La composición de la emisión de volátiles puede estudiarse a partir de su concentración absoluta y relativa. La concentración absoluta indica la abundancia de cada compuesto en la mezcla de forma independiente mientras que la concentración relativa refleja el olor de la mezcla de volátiles. La variación calculada a partir de la concentración de la mezcla permite evaluar la similitud o la uniformidad de la emisión de volátiles entre individuos (Bautista-Lozada y Espinosa-García, 2013).

Las interacciones con insectos depredadores mediadas por volátiles (resistencia indirecta) se llevan a cabo de forma individual por lo que una alta variación modifica las probabilidades de que cada individuo en un grupo interactúe con la misma intensidad con otro organismo (Dall *et al.*, 2012). En otras palabras, una alta uniformidad en la emisión de volátiles indica que todos los individuos emiten una mezcla similar lo cual sugiere que ese grupo de individuos emite información confiable para los insectos depredadores. Por el contrario, una baja uniformidad en la emisión de volátiles indica que los individuos tienen mezclas diferentes, a pesar de haber sido atacados por el mismo insecto o agente.

Medir el efecto de la domesticación y de la herbivoría en la uniformidad de la emisión permite comparar la variación de la emisión de volátiles de jitomate bajo dos factores evolutivos y ecológicos contrastantes. En estudios previos, esta comparación no había sido realizada y únicamente se consideraba a la variación entre los individuos como la fuente de error y desviación estándar de los grupos de plantas sometidos a diferentes tratamientos (Herrera, 2009). En este proyecto de investigación, se utilizó el jitomate como modelo de estudio dado que cuenta con variedades tanto cultivadas (*Solanum lycopersicum* L.) como silvestres en México (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*). Las variedades cultivadas utilizadas fueron Río Fuego, Río grande y Castlemart.

### **Hipótesis y objetivos de investigación**

Esta tesis se enfocó en analizar el efecto del estatus de domesticación en la emisión de volátiles inducidos por herbivoría en plántulas de jitomate bajo la hipótesis de que *el estado de domesticación de las plantas determina la plasticidad de la emisión inducida por herbivoría*.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto del daño causado por diferentes herbívoros en la variación de la emisión de volátiles inducida entre individuos de una variedad de jitomate.
2. Estudiar el efecto del estado de domesticación de emisión de volátiles constitutiva e inducida por ninfas de *Bactericera cockerelli* (Sulc.) en la variación en la emisión entre individuos de jitomate cultivado y silvestre.
3. Determinar si hembras de la avispa parasitoide *Tamarixia triozae* (Hymenoptera; Eulophidae) es atraída por los volátiles de plantas atacadas por ninfas de *B. cockerelli*.

### **Estructura de la tesis**

La tesis está dividida cinco capítulos. El capítulo I (antecedentes) constituye el marco conceptual dentro del cual se desarrolla esta investigación; los demás capítulos desarrollan los objetivos planteados para contestar la hipótesis general. En el capítulo de antecedentes se presentan dos documentos publicados en el libro de Ecología Química titulados “Efectos de la domesticación de plantas en la diversidad fitoquímica” e “Importancia ecológica de la emisión de compuestos volátiles vegetales”. En el capítulo dos y tres, se presentan y discuten el efecto de la herbivoría y de la domesticación como dos factores que aumentan o

limitan la emisión de volátiles en plántulas de jitomate, respectivamente. Por último, en el capítulo cuatro se evalúa la respuesta del parasitoide de las ninfas del psílido de jitomate, *Tamarixia triosa*, a volátiles de plantas de jitomate atacadas por su hospedero. El capítulo cinco corresponde a la discusión general de la tesis.

#### LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE INTRODUCCIÓN

Arimura GI, Kost C, Boland W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1734:91-111.

Bautista-Lozada A, Espinosa-García FJ. 2013. Odor uniformity among tomato individuals in response to herbivory depends on insect species. *PLOS One*. DOI:10.1371/journal.pone.0077199

Chen YH, Welter SC. 2005. Crop domestication disrupts a native tritrophic interaction associated with the sunflower, *Helianthus annuus* (Asterales: Asteraceae). *Ecological Entomology* 30: 673-683.

Dall SRX, Bell AM, Bolnick DI, Ratniecks LW. 2012. An evolutionary ecology of individual differences. *Ecology Letters* 15:1189-1198.

Degen T, Dillmann C, Marion-Poll F, Turlings TCJ. 2004. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiology* 135: 1928-1938.

Fritzsche-Hoballah MEF, Tamò C, Turlings TCJ. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* 28: 951-968.

Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology* 146: 818-824.

Gershenzon J. 2007. Plant volatiles carry both public and private messages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5257-5258.

Gouinguéné S, Degen T, Turlings TCJ. 2001. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* 11: 9-16.

Heil M, Silva Bueno JC. 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Science* 104: 5467-5472.

Herrera C. 2009. *Multiplicity in unity: Plant subindividual variation and interactions with animals*. The University of Chicago Press. United States of America.

Kessler A, Heil M. 2011. The multiple faces of indirect defenses and their agents of natural selection. *Functional Ecology* 25: 348-357.

Steiger S, Schmitt T, Shaefer HM. 2011. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 970-979.

Turlings TCJ, Loughrin JH, McCall PJ, Röse USR, Lewis WJ, Tumlinson JH. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 4169-4174.

Turlings TCJ, Wäckers F. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. En: Cardé, T. R. & Millar, G. J (Eds.) *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge.

## ***Capítulo uno***

---

### ANTECEDENTES

# 10

## Efectos de la Domesticación de Plantas en la Diversidad Fitoquímica

ALICIA BAUTISTA LOZADA, FABIOLA PARRA RONDINEL  
Y FRANCISCO JAVIER ESPINOSA-GARCÍA

*Centro de investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Morelia, Mich. C.P. 58050.  
Correo electrónico: espinosa@oikos.unam.mx*

**Resumen.** La domesticación de las plantas ha modificado la concentración y la mezcla de metabolitos secundarios mediante la selección artificial directa o indirecta de caracteres de interés agronómico. El *Síndrome de domesticación* ha sido utilizado como herramienta para estudiar los cambios evolutivos producidos por dos fuerzas selectivas similares: la selección natural y la artificial. La selección artificial ha ocasionado cambios en la frecuencia de caracteres tanto genéticos como fenotípicos de las poblaciones, las cuales causan divergencias con respecto a sus ancestros silvestres. Como resultado de la selección artificial, y de su manejo agronómico, se ha modificado el balance entre el costo/beneficio en la asignación de recursos: susceptibilidad al ataque por herbívoros vs productividad y palatabilidad. Diversos estudios muestran que el estatus de domesticación de las plantas está asociado con su grado de resistencia química a los insectos herbívoros. El nivel de divergencia entre plantas cultivadas y sus parientes silvestres depende del manejo agronómico, tradicional e industrial, el cual resuelve distintos tipos de necesidades y por lo tanto, los criterios de selección artificial también difieren. En el manejo agronómico tradicional, la domesticación de las especies depende del contexto cultural del ambiente local. Por el contrario, en el manejo agronómico industrial, la domesticación está enfocada a resolver problemas específicos de las relaciones entre la planta y su ambiente biótico o abiótico. Los estudios sobre la variación de los rasgos de resistencia a herbívoros o patógenos deben enfocarse en entender cómo y qué componentes del proceso de domesticación, incluido el ambiente antrópico en el que se desarrollan las especies, influyen en la diversidad de metabolitos secundarios así como en sus consecuencias ecológicas.

### Introducción

La domesticación vegetal está basada en procesos de selección artificial impuestos por humanos y el ambiente que éstos manejan. Dos de las muchas características selec-

cionadas o afectadas por la domesticación son el contenido y composición de metabolitos secundarios (MS) que protegen a las plantas contra herbívoros y patógenos. Los MS y sus mezclas han sido objeto de la selección artificial directa ya sea porque intoxican a las personas, son deseados como estimulantes o porque contribuyen a la resistencia del cultivo contra las plagas y patógenos. Pero la selección artificial ejercida sobre características productivas de los cultivos, por ejemplo, tamaño de la mazorca de maíz, también afecta a los MS.

El proceso de domesticación también implica selección natural bajo ambientes antrópicos y flujo génico entre las plantas bajo selección artificial y sus parientes silvestres. Todos estos procesos afectan a los perfiles de MS de las plantas y frecuentemente tienen consecuencias importantes para el manejo de las plagas insectiles y patógenos. Además de la importancia de entender estos cambios en ambientes agrícolas, el síndrome de domesticación ofrece contrastes *quasi* experimentales para poner a prueba hipótesis sobre los cambios ecológicos y evolutivos esperados como resultado de los procesos de selección natural y artificial (Dirzo *et al.*, 2001). De acuerdo con Purugganan & Fuller (2011), la domesticación es conceptualmente similar a los procesos evolutivos de diversificación que experimentan las especies silvestres. Por lo anterior, los estudios comparativos entre especies de plantas cultivadas y sus parientes silvestres son de gran utilidad para entender mejor el origen y mantenimiento de la diversidad química, así como sus consecuencias ecológicas bajo dos marcos evolutivos contrastantes.

Para entender los efectos de la domesticación sobre la variabilidad de los MS en las plantas cultivadas, se revisarán: el concepto de domesticación vegetal; la manera en que este proceso modificó a las plantas nutritivas y tóxicas al mismo tiempo; los efectos de la domesticación en la resistencia vegetal; y los ambientes bajo los cuales ha ocurrido y ocurre la domesticación: la agricultura tradicional y la industrial.

### **Domesticación vegetal**

La domesticación es el resultado de un proceso de selección de caracteres de un recurso específico, realizado por el hombre a través de la selección artificial para permitir su adaptación a condiciones de cultivo o manejo humano (Darwin, 1859; Gepts, 2004). En este proceso el ser humano aumenta directamente la frecuencia de aquellos fenotipos deseables, promueve su crecimiento y cuidado, incluso llega a remover fenotipos no deseables (Casas *et al.*, 2007). Este proceso actúa en plantas bajo domesticación incipiente, semi-domesticadas y en plantas completamente domesticadas (Casas *et al.*, 2007), causando cambios en las frecuencias de caracteres, tanto fenotípicos como genotípicos, de las poblaciones manejadas generando divergencias con respecto a sus ancestros silvestres (Cuadro 1). Este proceso evolutivo continuo ocasiona divergencias evidentes en caracteres fenotípicos de tipo morfológico, fisiológico, y fenológico entre poblaciones vegetales silvestres y cultivadas (Darwin, 1883; Zohary, 1984), lo que implica una pérdida gradual de adaptación al ambiente natural,

**CUADRO 1.** Propuesta de estadios de domesticación según los niveles de intensidad de cambio que sufren las poblaciones de plantas objeto de manipulación humana y domesticación. Modificado ligeramente de Clement, 1999. Entre uno y otro estadio de domesticación pueden existir estadios intermedios.

Estadio de domesticación	Cambios poblacionales
Silvestres	Población natural cuyos fenotipos y genotipos no han sido modificados por manipulación humana.
Evolución en sistemas bajo manejo humano intensivo	Especies que crecen en ambientes perturbados por el hombre con posibles cambios a nivel genético pero que no son producto de la selección artificial. (Ej. malezas). En casos extremos algunas especies sólo crecen en estos ambientes.
Domesticación incipiente	Intervención humana al menos por promoción (propagación) o tolerancia en el sistema, pero con el fenotipo promedio del carácter seleccionado aun dentro del rango de variación encontrado en condiciones silvestres. La varianza de este promedio posiblemente es menor en poblaciones manejadas bajo este estadio y comienza a producirse reducción de diversidad genética.
Semi-domesticación	Se evidencian diferencias significativas con respecto a las poblaciones silvestres debido a la manipulación humana. El promedio y la varianza del fenotipo seleccionado se diferencian y aumentan, respectivamente, con respecto a las poblaciones silvestres. La varianza aumenta por que aparecen fenotipos por el manejo humano que no se encuentran en poblaciones silvestres, y que gradualmente desaparecerán por selección natural en éstas. También hay reducción de diversidad genética por efecto de cuello de botella. Aun así la planta posee adaptabilidad ecológica para reproducirse y sobrevivir sin depender de los cuidados humanos.
Domesticación	La planta depende completamente de los ambientes (campos de cultivo) y cuidados humanos para sobrevivir y reproducirse. La diversidad genética generalmente se reduce significativamente y se pierde la capacidad ecológica de adaptación.

por la disminución en su capacidad reproductiva y en la dispersión natural de la especie (Gepts, 2004), hasta los casos extremos de total dependencia de la especie al hombre para sobrevivir y reproducirse (Harlan, 1975).

Entre las características modificadas de una especie por la selección artificial están la pérdida natural de dispersión de semillas, el gigantismo de partes generalmente cosechadas por el hombre, la pérdida en la dormancia en semillas, y pérdida de mecanismos químicos (MS) y mecánicos de protección contra herbívoros (Dirzo *et al.*, 2001; Pickersgill, 2007). Este conjunto de diferencias entre plantas cultivadas y sus parientes silvestres se denomina *Síndrome de domesticación* (Hawkes, 1983; Harlan, 1992; Bai & Lindhout, 2007).



Los cambios en la concentración y en la mezclas de los MS (resultado de alteraciones en la bioquímica vegetal), tienen consecuencias en las interacciones bióticas de las plantas cultivadas con su entorno. Se ha argumentado que este efecto es el resultado indirecto del incremento en la productividad, como el aumento en el tamaño de hojas, flores, y semillas (Benrey *et al.*, 1998), a expensas de una reducción en la distribución de la energía en otras funciones, tales como síntesis de MS (Lindig-Cisneros *et al.*, 1997, 2002; Gols *et al.*, 2008). En consecuencia, las plantas domesticadas frecuentemente se tornan más vulnerables a los herbívoros, patógenos y competidores que sus contrapartes silvestres. Sin embargo, esta susceptibilidad también ocurre por un proceso dirigido de reeliminación de toxinas en los cultivos, por selección de variedades con poca o nula cantidad de MS (Gepts, 2004), para obtener variedades cultivadas con partes aptas para consumo humano, como es el caso de la yuca (*Manihot esculenta*) (Wilson & Dufuor, 2002) o del frijol lima (*Phaseolus lunatus*) (Vanderborght, 1979).

### **Plantas comestibles: la domesticación como solución para lidiar con plantas tóxicas**

Partiendo de la diversidad de MS en la naturaleza, el ser humano ha seleccionado aquellos fenotipos que fueran sensorialmente atractivos por su olor, color, textura, etc., aunque posiblemente el criterio de selección más relevante fue el sabor, indicador confiable de la toxicidad de una planta.

Los MS que comúnmente están presentes en la dieta del ser humano son alcaloides, saponinas, glucósidos cianogénicos y cardiacos, terpenoides, aminoácidos no proteicos y fitohemaglutininas protéicas (Johns, 1990). A través del tiempo, el ser humano ha resuelto el problema de la toxicidad de estos compuestos en los alimentos, mediante técnicas de cocinado, rallado, molido, secado, pulverización, añejado, tratamiento con cal, lavado con agua o geofagia, que es el consumo de arcillas o carbón (Johns, 1990), así como favoreciendo la densidad de genotipos no tóxicos o con menos toxicidad. Las técnicas de preparado y cocinado permiten que las plantas tóxicas sean consumidas y que al mismo tiempo conserven sus defensas contra sus enemigos naturales cuando el cultivo está en el campo.

El objetivo de la selección artificial, en algunos casos ha sido la reducción en la concentración de MS tóxicos, por ejemplo, los glicoalcaloides en la papa (*Solanum tuberosum*) y el jitomate (*Solanum lycopersicum*), glucósidos cianogénicos en el frijol lima, en la yuca y los taninos en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Johns, 1990). Aunque también hay ejemplos de plantas seleccionadas para aumentar sus concentraciones de MS, por ejemplo, la capsaicina en el chile (*Capsicum* spp) y la nicotina en el tabaco (*Nicotiana tabacum*) o el tetrahidrocannabinol en la marihuana (*Cannabis sativa*), plantas que no están relacionadas con la alimentación, pero que también han sido domesticadas.

En contraparte, los insectos herbívoros y los patógenos solucionaron este problema mediante la detoxificación, proceso por el cual se disminuye el efecto nocivo de los MS mediante procesos enzimáticos de absorción, distribución, biotransformación y excreción (Johns, 1990); o bien mediante el secuestro de MS en los tejidos (Nishida, 2002) y/o mediante cambios comportamentales que evitan o anulan la exposición de los herbívoros a concentraciones tóxicas de MS. La contra-respuesta de los herbívoros y patógenos contra los MS ha sido contrarestanda por los humanos mediante la manipulación del sistema agrícola que entre otras cosas incluye el incremento en la variabilidad de fenotipos químicos del cultivo que conviven con los enemigos de las plantas, la rotación de cultivos, y el cultivo simultáneo de varias especies (incluso silvestres) que aumentan la heterogeneidad química del agroecosistema y que puede favorecer a insectos benéficos.

### **Origen, mantenimiento y diversificación de fenotipos de resistencia química en plantas cultivadas**

El fenotipo químico de las plantas se refiere tanto al contenido y diversidad de MS, como a la capacidad de resistencia química frente a sus consumidores. La domesticación modifica directa o indirectamente al o los fenotipos resistencia, con lo cual se obtienen costos y beneficios: susceptibilidad al ataque por insectos herbívoros *vs* productividad y palatabilidad. McKey *et al.* (2010a) proponen que este balance depende del tipo de planta que los agricultores prefieran, y de cómo las características intrínsecas de la planta interactúan con las prácticas culturales de un grupo humano. Así, la variación y frecuencia de un fenotipo resistente a los herbívoros, está en función de las prácticas de los agricultores y de su contexto social. Un ejemplo es el de la mandioca o yuca donde los principales objetivos de selección son la producción de raíces comestibles y el cultivo de la planta con fines rituales, como se ha documentado para algunos grupos indígenas de África y América del Sur (McKey *et al.* 2010a, b). Esto refleja la diversidad de criterios de selección artificial que determinan el proceso de domesticación de una planta y que es la base para la diversificación en sistemas agrícolas (Casas & Parra, 2007).

La decisión del ser humano de explotar el tipo de reproducción de una especie vegetal, sexual o vegetativa, puede favorecer la fijación de genotipos deseados en una población, decisión que depende de la facilidad de propagación de cada especie o por limitaciones ambientales, por ejemplo, en ambientes donde la mortalidad de semillas o la frecuencia de incendios es alta (Bazzaz *et al.*, 1987). Sin embargo, la presencia de una población con un nuevo genotipo no sólo altera el fenotipo químico de la parte deseada sino también las interacciones de ésta con su entorno biótico. De acuerdo con Johns (1990), para entender la domesticación vegetal como proceso evolutivo deben tomarse en cuenta tres factores: la planta, el ser humano y el entorno.

## Consecuencias de la propagación sexual y clonal en la diversidad química

Una vez que el fenotipo con las características deseadas se ha escogido, la propagación sexual y clonal responde a características de la planta, del entorno o las necesidades del agricultor. Favorecer la reproducción sexual sobre la reproducción vegetativa conlleva un conflicto en la asignación de recursos dentro de la planta: productividad vs. reproducción sexual. Ejemplos de este conflicto pueden resultar en la esterilidad de flores masculinas o femeninas, partenocarpia (p. ej. el plátano, *Musa* spp), etc. (McKey *et al.*, 2010a). No obstante, la reproducción sexual aporta la variación genética que mantiene la diversidad en la concentración de MS. Hay evidencia de que la autopolinización y en consecuencia la endogamia, reduce la resistencia contra herbívoros (Carr & Eubanks, 2002; Hull-Sanders & Eubanks, 2005). Los efectos de la depresión endogámica (DE) se han estudiado ampliamente por su valor predictivo para entender cómo funcionan los sistemas reproductivos vegetales (Dudash *et al.*, 1997). Se ha descubierto que la DE provee las bases genéticas (Ferrari *et al.*, 2006) que afectan la expresión de los MS (por ejemplo, la emisión de compuestos volátiles orgánicos (Ferrari *et al.*, 2006)) así como el desempeño de insectos herbívoros (Hull-Sanders & Eubanks, 2005).

La ventaja de la propagación clonal es que se soluciona el problema de la DE, pero, al reducir la variabilidad, se incrementa el riesgo de ataques de biotipos de plagas y/o patógenos adaptados al clon plantado extensivamente. Una de las causas de la gran hambruna irlandesa fue el uso de papas de reproducción clonal como alimento fundamental o casi único de los campesinos pobres de Irlanda a mediados del siglo XIX (Donnelly, 2003). La variedad predominante en Irlanda constaba de dos genotipos y fue atacada masivamente por *Phytophthora infestans*, un oomiceto que destruyó la mitad de las plantaciones de papas sembradas en ese país (Gliessman, 2002). En sistemas tradicionales donde se reproducen los cultivos clonalmente, se seleccionan varios genotipos por lo que la diversidad genética no se reduce drásticamente e inclusive puede haber selección de nuevos clones obtenidos de cruza con parientes cultivados o silvestres.

En la propagación clonal la variación fenotípica también proviene de las mutaciones somáticas y de la epigénesis. Las mutaciones somáticas son producto de la selección diplóntica, la cual consiste en la competencia entre líneas celulares dentro de un mismo organismo; la epigénesis consiste en las alteraciones que afectan la expresión y herencia del ADN (p. ej. mediante la metilación) pero no su secuencia (Johannes *et al.*, 2009; McKey *et al.*, 2010a). En algunos casos, esta estrategia de propagación asegura la preservación de una mezcla determinada de MS (los viñedos, por ejemplo). En cultivos que se reproducen clonalmente, como henequén y aguacate, se ha detectado variación genética de origen asexual, que muy probablemente se originó a partir de mutaciones somáticas (Espinosa-García *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2003). El cultivar Hass de *Persea americana* proviene de un árbol híbrido patentado en 1937; de ese individuo híbrido provienen todos los árboles de aguacate

Hass que se cultivan en el mundo (Ayala, 1998). A pesar de su propagación clonal en México, se encontró variación genética detectada a través de los fenotipos terpenoidales foliares (García-Rodríguez, Y., & Espinosa-García, F. J., datos no publicados). Se encontraron al menos 60 grupos de fenotipos terpenoidales en una muestra de 200 árboles de aguacates colectados en 17 huertas, aunque el 60% de los árboles se agruparon en tres grupos de fenotipos químicos (Espinosa-García *et al.*, 2001). Los árboles con los fenotipos químicos más comunes fueron más resistentes al barrenador de la rama (*Copturus aguacatae*) que los árboles con fenotipos químicos raros, por lo que se sospecha que los árboles con mayor incidencia de barrenador son menos propagados que los árboles con menor incidencia de esta plaga (Espinosa-García *et al.*, 2001).

Algunas de las teorías sobre defensa vegetal sólo han sido estudiadas en sistemas silvestres, sin embargo, podrían ponerse a prueba a algunas de sus predicciones también en sistemas cultivados. Por ejemplo, el trabajo realizado por Hull-Sanders & Eubanks (2005) con la especie *Ipomoea hederacea* var. *integriuscula* pone a prueba dos teorías de la defensa vegetal que predice los efectos de la DE por autopolinización, sobre insectos herbívoros: la teoría del vigor y la teoría del estrés. La primera predice que los insectos especialistas son afectados por la calidad de la planta y no por sus defensas; la segunda que los insectos generalistas serán afectados por las defensas de la planta. Este tipo de aproximaciones también podrían abordarse en plantas con reproducción sexual y clonal utilizadas en la agricultura tradicional e industrial para examinar los efectos de cada tipo de propagación sobre determinada característica de resistencia (física o química) de acuerdo con la especie de la planta y el insecto herbívoro o patógeno correspondiente a dicha especie.

### **Costos asociados a la defensa**

Uno de los supuestos sobre el efecto de la domesticación en el destino de los recursos adquiridos por la planta, es que se compromete la defensa para favorecer el crecimiento y la reproducción (Bazzaz *et al.*, 1987). Destinar recursos al crecimiento y reproducción y no a la defensa, depende del ambiente biótico y abiótico en el cual crecen las plantas, así como de los diferentes tipos de defensa de la planta (Koricheva, 2002). De acuerdo con el estudio realizado por Bergelson & Purgington (1996), estos compromisos asociados a la defensa son más frecuentes en especies cultivadas que en especies silvestres, lo cual atribuye al proceso de domesticación. De esta manera, el síndrome de domesticación puede entenderse como el resultado de la distribución de recursos a diferentes funciones producido por diferentes fuerzas de selección.

### **Plasticidad**

El punto de partida de la domesticación es la variabilidad y la plasticidad fenotípica de diversos rasgos, morfológicos o químicos, de las especies vegetales. La variabilidad a diferencia de la plasticidad, el resultado de la interacción entre el genotipo y su en-

torno, sólo depende del genotipo (Alpert & Simms, 2002). La plasticidad fenotípica consiste en el espectro de fenotipos que puede producir un genotipo en respuesta a un estímulo, sea biótico como la herbivoría; o abiótico como daño mecánico o cambios en condiciones ambientales de luz y temperatura (Alpert & Simms, 2002; Heil, 2010). La plasticidad puede derivar en variación, si se genera nuevos fenotipos, divergencia entre poblaciones y especies, e incluso llegar a generar nuevas especies mediante radiación adaptativa (Pfenning *et al.*, 2010).

Los cambios en la concentración de MS producidos o inducidos por herbívoros o patógenos se consideran un ejemplo de plasticidad (Heil, 2010), por lo que se dice que las interacciones entre la planta y sus entorno biótico son intermediadas por rasgos fenotípicamente plásticos (Fordyce, 2006). Como resultado de la selección direccional de la domesticación, la plasticidad de varios rasgos de las especies vegetales pudo haber disminuido esta capacidad de cambio. De esta forma, la plasticidad es un concepto que puede aplicarse al estudio de la resistencia vegetal, ya sea directa o indirecta, para entender el papel de la plasticidad fenotípica en las respuestas inducidas: si facilita o retrasa la adaptación de los insectos herbívoros o de sus depredadores a cualquiera de los mecanismos de resistencia de la planta (Fordyce, 2006)

### **Efectos indirectos de la domesticación en la resistencia química vegetal**

Los cambios en la concentración de MS causados por la domesticación conllevan consecuencias ecológicas en todos los niveles tróficos (Benrey *et al.*, 1998; Delphia *et al.*, 2009), sobre todo porque muchos de estos MS son intermediarios entre la planta y su ambiente biótico (véase el capítulo 13). Diversos estudios han mostrado que el estatus de domesticación de las plantas se relaciona con la eficacia de sus mecanismos de resistencia química desde diferencias a nivel de diversidad fitoquímica hasta alteraciones en la calidad de la planta como hospedero. Por ejemplo, la intensidad de manejo y domesticación del frijol lima determinó la diversidad de fitoalexinas en las semillas y la infección por un patógeno (Lindig-Cisneros *et al.*, 1997). En este caso la mayor diversidad de fitoalexinas contenidas en semillas de la especie silvestre estuvo relacionada con la inhibición de *Aspergillus* sp., hongo patógeno del frijol. Por el contrario, el patrón de diversidad de aflatoxinas y su efecto en el desarrollo de la infección fue el contrario en la especie cultivada (Lindig-Cisneros *et al.*, 1997). Sin embargo, existen otros trabajo en plantas domesticadas que muestran que la concentración de los MS determina la resistencia a los herbívoros, por ejemplo, el de Torres-Gurrola *et al.* (2011), quienes midieron la diversidad fitoquímica de volátiles foliares de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) dañadas por el insecto agallero *Triozae anceps*. Los autores encontraron que la incidencia del agallero estuvo relacionada con el perfil químico de las hojas y no con su diversidad.

La resistencia de las plantas cultivadas o silvestres también puede determinarse de acuerdo al recambio de MS en un tejido. El estudio realizado por Ballhorn *et al.* (2008a,b) demuestra que hay un compromiso entre la concentración de compuestos

cianogénicos y la emisión de volátiles en hojas primarias y secundarias del frijol lima silvestre y cultivado. La concentración de compuestos cianogénicos fue menor en las hojas primarias que en las secundarias, y la emisión de volátiles fue mayor en las primarias y menor en las secundarias. En este caso los autores describen este recambio de MS como un compromiso entre defensa directa e indirecta la cual, sin embargo, fue independiente de su estatus de domesticación (Ballhorn *et al.*, 2008a). Esta variación en compuestos cianogénicos foliares estuvo correlacionada con la preferencia del escarabajo *Epilachna varivestis* el cual consumió plantas con menor contenido de compuestos cianogénicos (Ballhorn *et al.*, 2008b).

El fenotipo olfativo de una planta, el cual consiste en la emisión de compuestos volátiles orgánicos (CVO), depende del estatus de domesticación de las plantas. Algunos ejemplos donde se ha reportado este tipo de variación son: arroz (Lou *et al.*, 2006), maíz (Gouinguéné *et al.*, 2001; Degen *et al.*, 2004), jitomate, pera (Scutareanu *et al.*, 2003), calabaza (Kappers *et al.*, 2010), girasol (Chen & Welter, 2005), mostaza (Gols *et al.*, 2009), entre otras plantas. Los carnívoros del tercer nivel trófico responden a esta variación, como los depredadores y parasitoides que son atraídos diferencialmente por estos fenotipos olfativos (Benrey *et al.*, 1998; Lou *et al.*, 2006; Gols *et al.*, 2008, 2009).

Algunos estudios no sólo se han enfocado a estudiar la variabilidad fitoquímica como resultado de la domesticación sino a los efectos en el crecimiento y desarrollo de los herbívoros y sus parasitoides. Por ejemplo, el estatus de domesticación en girasol, *Helianthus annuus* (Chen & Welter, 2005), y en *Brassica oleracea* (Benrey *et al.*, 1998; Gols *et al.*, 2009) influyó en el desarrollo de los herbívoros y parasitoides dependiendo de su grado de especialización. Los autores reportan un mejor desempeño tanto de los herbívoros como de los parasitoides en plantas cultivadas excepto en girasol donde la tasa de parasitismo fue menor, posiblemente porque las plantas cultivadas son hospederos de mejor calidad.

El uso de plantas genéticamente modificadas se ha sugerido como una herramienta en el control biológico de plagas mediante la identificación de genes de resistencia física o química en sus parientes silvestres que luego pueden ser introducidos en los cultivos mediante ingeniería genética (manipulación directa de la expresión genética o inserción de genes de otras especies) (Poppy & Sutherland, 2004). Por otro lado, la manipulación fenotípica de algunos caracteres resistencia de plantas cultivadas también podrían ser utilizados en programas de control biológico por conservación (Khan *et al.*, 2008). Por ejemplo, promover la emisión de volátiles o la producción de nectarios extraflorales para atraer enemigos naturales a las plantas.

La agricultura industrial también puede alterar la diversidad de volátiles orgánicos de las plantas mediante la modificación genética y por lo tanto, sus efectos en los insectos. Las modificaciones genéticas en estas plantas teóricamente tienen por objetivo una sola especie de herbívoro, sin embargo, también pueden tener efectos en otras especies. Por ejemplo, el fenotipo olfativo de maíz Bt y maíz no modificado tuvieron el mismo perfil de CVO de forma constitutiva e inducida (Dean & De

Moraes, 2006). Sin embargo, la cantidad de CVO emitidos estuvo relacionada con el patrón de alimentación de las larvas: una menor área dañada en plantas modificadas liberó menores cantidades de CVO. Una de las predicciones sugeridas por los autores es que plantaciones de plantas modificadas Bt y no modificadas sujetas a la misma cantidad de daño por insectos herbívoros (lo cual sucedería si los insectos desarrollan resistencia), atraería a la misma cantidad de enemigos naturales.

### **Interacción planta-ser humano: la concentración de MS en la planta depende de su manejo agronómico**

La intensidad de manejo sobre un recurso es determinado por el conjunto de actividades humanas que se practican sobre el mismo, y se puede definir con respecto al número de personas que están manejando dicho recurso, la complejidad del tipo de manejo, así como el número de prácticas diferentes realizadas sobre dicho recurso (González-Insuasti & Caballero, 2007). Esto produce variaciones en los fenotipos de los individuos de la población manejada, con respecto a los que se podían encontrar originalmente antes del manejo humano. Estas variaciones no sólo ocurren en los rasgos morfológicos de las plantas, también se presentan en la concentración de los MS de las plantas. Por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Blanckaert *et al.* (2012) con las variedades roja y blanca del epazote (*Chenopodium ambrosioides*), muestra que existe un gradiente de concentración de los MS que definen su aroma, sabor y propiedades antihelmínticas (monoterpenos, sequiterpenos, flavonoides y ascaridiol), de acuerdo con la forma de manejo. Se encontró que en los campos agrícolas donde se cultiva el epazote blanco de forma intensiva, el ascaridiol, compuesto con propiedades antihelmínticas que también es tóxico para humanos, está ausente o casi ausente en esta variedad.

### **Agricultura tradicional e industrial**

La selección de uno o pocos genotipos no tóxicos también puede implicar una alta sensibilidad a los herbívoros o patógenos, por lo que el proceso de domesticación se acompaña del desarrollo de tecnologías de cultivo y de manejo de plagas, las que son muy diferentes en agricultura tradicional y en la industrial. En la tradicional la domesticación se ajusta a un contexto tecnológico integral dentro de una cultura en un ambiente local, mientras que la industrial se ajusta a la resolución de problemas particulares impuestos por la interacción de características particulares de la planta con agentes bióticos o abióticos particulares. En la agricultura tradicional la estrategia principal es minimizar los riesgos sembrando una diversidad de especies y de variedades que contribuyan a mantener estable la producción a largo plazo, contribuyendo a la seguridad alimentaria de los productores, haciendo uso de un mínimo de tecnología e insumos (Altieri *et al.*, 1987). Asimismo, los campesinos se esfuerzan por distinguir

y mantener diversidad (Boster, 1985), lo que causa gran diversidad de criterios para la selección artificial (Casas & Parra, 2007). Esto produce gran diversidad morfológica, química y fisiológica en los cultivos.

Por otro lado, en la agricultura industrial se producen variedades resistentes a ciertas plagas o enfermedades, o a condiciones ambientales extremas como la sequía; incluso variedades que crecen de manera uniforme. Esto se logra mediante el fitomejoramiento clásico (cruzas y retrocruzas entre variedades cultivadas o entre variedades silvestres y cultivadas) o bien mediante ingeniería genética (manipulación directa de la expresión genética o inserción de genes de otras especies). Así, la obtención de una variedad mejorada se realiza aislando al agente biótico o abiótico probando su efecto sobre las variantes de la planta, se usa un agente a la vez. Todo esto se hace para maximizar la producción para obtener el máximo beneficio económico.

En los sistemas de agricultura tradicional, debido a que la domesticación y manipulación de plantas ocurren en diferentes intensidades, ocurre un continuo de diferencias morfológicas, fisiológicas y genéticas entre silvestres y domesticadas (Otero-Arnaiz *et al.*, 2005), pudiéndose encontrar especies bajo domesticación incipiente, semi-domesticadas, totalmente domesticada o en estadios intermedios a cada uno de estos (Cuadro 1).

En el proceso de selección artificial en la agricultura tradicional, confluyen diferentes factores: criterios personales de selección de los productores, que a su vez son cambiantes en el tiempo; la variabilidad ambiental que no es completamente controlada por los agricultores (incluyendo interacción con parientes silvestres, plagas, enfermedades, fenómenos meteorológicos), así como disponibilidad de insumos y tecnologías. Por ello, la domesticación en la agricultura tradicional de una planta tarda mucho más tiempo y genera mayor variabilidad fenotípica que bajo agricultura industrial. En esta última la selección direccional y la disponibilidad segura de insumos y tecnologías para el control de factores bióticos y abióticos que afectan la propagación y protección de una variedad específica, fomentan el aumento rápido de la frecuencia de esta variedad, ya sea única o pocas variedades.

Por lo tanto, cada una de estas formas de agricultura tiene consecuencias en la variación de la diversidad fitoquímica en sus diferentes modalidades. De esta forma al seleccionar un fenotipo por su resistencia, o mejor aún su inmunidad, a un patógeno o una plaga; si es por medios transgénicos, la uniformidad de la variedad es completa, si es por fitomejoramiento, la uniformidad en la resistencia puede ser muy alta, pero su diversidad fitoquímica a nivel de individuo, puede ser mediana o muy baja. Por el contrario, en la agricultura tradicional, no sólo se seleccionan las características defensivas de los MS, sino que también se selecciona la diversidad fitoquímica a varias escalas (alfa, beta y gama): diversidad dentro de los individuos, diversidad dentro de las poblaciones o variedades, entre variedades cultivadas de la misma especie y varias especies en el cultivo, incluyendo a las plantas arvenses que coexisten en el mismo agroecosistema.



## Conclusiones y perspectivas

Los estudios sobre la variación en rasgos de resistencia a herbívoros o patógenos deben enfocarse en explicar cómo y qué componentes del proceso de domesticación tienen mayor impacto en la diversidad de MS, así como las consecuencias ecológicas de esta variación. Uno de los puntos clave en ecología química ha sido incluir la resistencia de la planta como factor clave para entender cómo funcionan y evolucionan las interacciones entre diferentes niveles tróficos. Sin embargo, ahora es necesario incluir en este esquema el tipo de manejo agronómico para conocer y manejar el entorno en el que se desarrollan las interacciones entre la planta, sus herbívoros y sus enemigos naturales. En el enfoque análogo algunas preguntas que deben responderse ahora son: ¿Existen estrategias de manejo que puedan favorecer un fenotipo productivo y resistente a plagas? ¿Cómo favorecer la diversidad genética de los cultivos y garantizar una alta producción al mismo tiempo? ¿Reestablecer las interacciones entre plantas cultivadas y la comunidad de artrópodos en agroecosistemas ayudaría en el manejo de plagas?

## Referencias

- ALPERT, P., & SIMMS, E. L. 2002. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evol. Ecol.* 16: 285-297.
- ALTIERI, M. A., & MERRICK, L.C. 1987. *In situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. *Econ. Bot.* 41: 86-96.
- AYALA, A. A. 1998. Historia del árbol Hass madre. Boletín Informativo El Aguacatero Año 1, No. 3 ([en http://www.avocado.org/about/2000-26.php](http://www.avocado.org/about/2000-26.php)).
- BAI, Y., & LINDHOUT, P. 2007. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Ann. Bot.* 100: 1085-1094.
- BALLHORN, D. J., KAUTZ, S., LION, U., & HEIL, M. 2008a. Trade-offs between direct and indirect defences in Lima bean (*Phaseolus lunatus*). *J. Ecol.* 96: 917-980.
- BALLHORN D. J., SCHWY S., JENSEN M., & HEIL, M. 2008b. Quantitative variability of direct chemical defense in primary and secondary leaves of Lima bean (*Phaseolus lunatus*) and consequences for a natural herbivore. *J. Chem. Ecol.* 34: 1298-1301.
- BLANCKAERT, I., PAREDES-FLORES, M., ESPINOSA-GARCÍA F. J., PIÑERO, D., & LIRA, R. 2012. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi arid region of Mexico. *Genet. Resour. Crop Ev.* 59: 557-573.
- BAZZAZ, F. A., CHIARELLO, N. R., COLEY, P. D., & PITELKA, L. F. 1987. Allocation resources to reproduction and defense. *BioSci.* 37: 58-67
- BENREY, B., CALLEJAS, A., RIOS, L., OYAMA, K., & DENNO, R. F. 1998. The effects of domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. *Biol. Control* 11: 130-140.
- BERGELSON, J., & PURRINGTON, C. B. 1996. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *Am. Nat.* 148: 536-558.
- BOSTER, J. 1985. Selection for perceptual distinctiveness: evidence from Aguaruna cultivars of *Manihot esculenta*. *Econ. Bot.* 39: 310-325.

- CASAS, A., & PARRA, F. 2007. Agrobiodiversidad, parientes silvestres y cultura. *LEISA Revista de Agroecología* 23: 5-8.
- CASAS, A., OTERO-ARNAIZ, A., PÉREZ-NEGRÓN, E., & VALIENTE-BANUET, A. 2007. *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Ann. Bot.* 100: 1101-1115.
- CARR, D. E., & EUBANKS, M. D. 2002. Inbreeding alters resistance to insect herbivory and host plant quality in *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *Evolution* 56: 22-30.
- CHEN, Y. H., & WELTER, S. C. 2005. Crop domestication disrupts a native tritrophic interaction associated with the sunflower, *Helianthus annuus* (Asterales: Asteraceae). *Ecol. Entomol.* 30: 673-683.
- DARWIN, C. 1859. *The Origins of Species by Means in Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John, London.
- DARWIN, C. 1883. *The Variation of Animals and Plants under Domestication*. Appleton & Co.. New York.
- DELPHIA, C. M., DE MORAES, C. M., STEPHENSON, A. G., & MESCHER, M. C. 2009. Inbreeding in horse-nettle influences herbivore resistance. *Ecol. Entomol.* 34: 513-519.
- DEGEN, T., DILLMANN, C., MARION-POLL, F., & TURLINGS, T. C. J. 2004. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiol.* 135: 1928-1938.
- DEAN, J. M., & DE MORAES, C. M. 2006. Effects of genetic modification on herbivore-induced volatiles from maize. *J. Chem. Ecol.* 32: 713-724.
- DIRZO, R., LINDIG, R., & ROSENTHAL, J. P. 2001. Plantas cultivadas y sus parientes silvestres: sistemas modelo para estudios de ecología química, pp. 607-631, en Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & Cruz-Ortega, R. (eds.), *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. UNAM & Plaza y Valdes. Mexico, D.F.
- DUDASH, M. R., CARR, D. E., & FENSTER, C. B. 1997. Five generations of enforced selfing and outcrossing in *Mimulus guttatus*: Inbreeding depression variation at the population and family level. *Evolution* 51: 54-65.
- DONNELLY, J. S. 2003. *Great Irish Potato Famine*. Sutton Publishing, New York.
- ESPINOSA-GARCÍA, F. J., GARCÍA RODRÍGUEZ, Y., CHÁVEZ ZAVALA F., CHÁVEZ ZAVALA, A., & DELGADO, G. 2001. Implicaciones de la variación en los fenotipos químicos de las poblaciones de plantas en su susceptibilidad a plagas y patógenos: el caso de *Persea americana* var. Hass, pp. 46-57, en Memorias del 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Uruapan, Michoacán.
- FERRARI, M. J., STEPHENSON, A. G., MESCHER, M. C., & DE MORAES, C. M. 2006. Inbreeding effects on blossom volatiles in *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot.* 93: 1768-1774.
- FORDYCE, J. A. 2006. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* 209: 2377-2383.
- GEPTS, P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Rev.* 24: 1-44.
- GLIESSMAN, S. R. 2002. *Agroecología. Procesos Ecológicos en Agricultura Sostenible*. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- GOLS, R., WAGENAAR, R., BUKOVINSZKY, T., VAN DAM, N. M., DICKE, M., BULLOCK, J. M., & HARVEY, J. A. 2008. Genetic variation in defense chemistry in wild cabbages affects herbivores and their endoparasitoids. *Ecology* 89: 1616-1626.
- GOLS, R., VAN DAM, N. M., RAAIJMAKERS, C. S. K., DICKE, M., & HARVEY, J. A. 2009. Are population differences in plant quality reflected in the preference and performance of two endoparasitoid wasps? *Oikos* 118: 733-743.
- GONZÁLEZ, G., ALEMAN, S., & INFANTE, D. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Sci.* 165: 595-601.

- GONZÁLEZ-INSUASTI, M. S., & CABALLERO, J. 2007. Managing plant resources: How intensive can it be? *Hum. Ecol.* 35: 303-314.
- GOINGUNÉ, S., DEGEN, T., & TURLINGS, T. C. J. 2001. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* 11: 9-16.
- HAWKES, J. G. 1983. *The Diversity of Crop Plants*. Harvard University Press, London.
- HARLAN, J. R. 1975. *Crops and Man. Foundation for Modern Cropscience Series*. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.
- HARLAN, J. R. 1992. Origins and processes of domestication, pp. 159-175, en Chapman, G. P. (ed.), *Grass Evolution and Domestication*. Cambridge University Press, New York.
- HEIL, M. 2010. Plastic defence expression in plants. *Evol. Ecol.* 24: 555-569.
- HULL-SANDERS, H. M., & EUBANKS, M. D. 2005. Plant defense theory provides insight into interactions involving inbred plants and insect herbivores. *Ecology* 86: 897-904.
- INFANTE, D., GONZÁLEZ, G., PERAZA-ECHEVERRÍA, L., & KEB-LLANES, M. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Sci.* 164: 223-230.
- JOHNS, T. 1990. *The Origins of Human Diet and Medicine*. The University of Arizona Press, Tucson.
- JOHANNES, F., PORCHER, E., TEIXEIRA, F. K., SALIBA-COLOMBANI, V., SIMON, M., AGIER, N., BULSKI, A., ALBUISSON, J., HEREDIA, F., AUDIGIER, P., BOUCHEZ, D., DILLMANN, C., GUERCHE, P., HOSPITAL, F., & COLOT, V. 2009. Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation in complex traits. *Plos. Genetic.* 5: 1-11.
- KHAN, Z. R., JAMES, D. G., MIDEGA, C. A. O., & PICKETT, J. A. 2008. Chemical ecology and conservation biological control. *Biol. Control* 45: 210-224.
- KORICHEVA, J. 2002. Meta-analysis of sources of variation in fitness costs of plant antiherbivore defenses. *Ecology* 83: 176-190.
- LINDIG-CISNEROS, R., BENREY, B., & ESPINOSA-GARCÍA, F. J. 1997. Phytoalexins, resistance traits, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *J. Chem. Ecol.* 23: 1997-2011.
- LINDIG-CISNEROS, R., DIRZO, R., & ESPINOSA-GARCÍA, F. J. 2002. Effects of domestication and agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in *Phaseolus* beans. *Ecol. Res.* 17: 315-321.
- LOU, Y., HUA, X., TURLINGS, T. C. J., CHENG, J., CHEN, X., & YE, G. 2006. Differences in induced volatiles emissions among rice varieties result in differential attraction and parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* in the field. *J. Chem. Ecol.* 32: 2375-2387.
- KAPPERS, I. F., VERSTAPPEN, F. W. A., LUCKERHOFF, L. L. P., BOUWMEESTER, H. J., & DOCKE, M. 2010. Genetic variation in jasmonic acid- and spider-mite induced plant volatile emission of cucumber accessions and attraction of the predator *Phytoseilus persimilis*. *J. Chem. Ecol.* 36: 500-512.
- MCKEY, D., ELIAS, M., PUJOL, B., & DUPUTIÉ, A. 2010a. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytology*. 186: 318-332.
- MCKEY, D., CAVAGNARO, T. R., CLIFF, J., & GLEADOW, R. 2010b. Chemical ecology in coupled human and natural systems: people, manioc, multitrophic interactions and global change. *Chemoecology* 20: 109-133.
- NISHIDA, R. 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 57-92.
- OTERO-ARNAIZ, A., CASAS A., HAMRICK, J., & CRUSE-SANDERS, J. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichi*pe (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Mol. Ecol.* 14: 1603-1611.
- PICKERSGILL, B. 2007. Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Ann. Bot.* 100: 925-940.

- PFENNIG, D. W., WUND, M. A., SNELL-RODD, E. C., CRUICKSHANK, T., SCHLICHTING, C. D., & MOCKEK, A. P. 2010. Phenotypic plasticity's impact on diversification and speciation. *Cell* 25: 459-467.
- POPPY, G. M., & SUTHERLAND, J. P. 2004. Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. *Physiol. Entomol.* 29: 257-268.
- PURUGGANAN, M. D., & FULLER, D. Q. 2011. Archaeological data reveal slow rates of evolution during plant domestication. *Evolution.* 65: 171-183.
- SCUTAREANU, P., BRUIN, J., POSTHUMUS, A. M., & DRUKKER, B. 2003. Constitutive and herbivore-induced volatiles in pear, alder and hawthorn trees. *Chemoecology.* 13: 63-74.
- TORRES-GURROLA, G., DELGADO-LAMAS, G., & ESPINOSA-GARCÍA, F. J. 2011. The foliar chemical profile of criollo avocado, *Persea americana* var. *drymifolia* (Lauracea), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *Trioza anceps* (Trioziidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 39: 102-111.
- VANDERBORGTH, T. 1979. Le dosage de l'acide cyanohydrique chez *Phaseolus lunatus* L. *Ann. Gambloux.* 85: 18-24.
- WILSON, W.M., & DUFOUR, D. L. 2002. Why "bitter" cassava? Productivity of "bitter" and "sweet" cassava in a Tukanoan Indian settlement in the Northwest Amazon. *Econ. Bot.* 56: 49-57.
- ZOHARY, D. 1984. Modes of evolution in plants under domestication, pp. 579-586 en Grant, W. F. (ed.), *Plant Biosystematics*. Academic Press Canada, Montreal.

# 11

## Importancia Ecológica de la Emisión de Compuestos Volátiles Vegetales

ALICIA BAUTISTA-LOZADA, ÁNGEL E. BRAVO-MONZÓN  
Y FRANCISCO J. ESPINOSA-GARCÍA

*Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Morelia, Mich. C.P. 58190.  
Correo electrónico: [espinosa@oikos.unam.mx](mailto:espinosa@oikos.unam.mx)*

**Resumen.** Las plantas liberan compuestos volátiles orgánicos a la atmósfera a través de sus tejidos aéreos y subterráneos. A pesar que la emisión de volátiles es considerada como una válvula de escape metabólico, su efecto en el ecosistema no sólo modula las interacciones entre miembros de distintos niveles tróficos sino que también juega un papel importante en la química de la atmósfera. Los herbívoros inducen una respuesta bioquímica en el lugar de daño (respuesta inducida local), los metabolitos secundarios inducidos en este lugar pueden migrar a otros tejidos de la planta y activar la resistencia química en toda la planta (respuesta inducida sistémica). Los volátiles inducidos por herbivoría son acarreadores de información, la cual tiene diversos efectos en insectos herbívoros, sus enemigos naturales y otras plantas. Los enemigos naturales de los herbívoros pueden utilizar las emisiones biogénicas de las plantas para encontrar a su presa, sin embargo, su valor adaptativo aún no es claro dado que los volátiles pueden jugar diversas funciones en la planta. Los volátiles también modifican su entorno abiótico contribuyendo a la formación de aerosoles, y por lo tanto, modifican la temperatura que las rodea a nivel individual, regional e incluso mundial.

### Introducción

Uno de los fenómenos más interesantes que ocurren en las plantas es la liberación del carbono asimilado en la fotosíntesis en forma de compuestos volátiles orgánicos. Se estima que la emisión de volátiles, que es un proceso que sucede en casi todas las plantas, ocupa entre el 10 y 36% del carbono asimilado dependiendo de la especie de planta (Peñuelas & Llusià, 2004; Maffei *et al.*, 2011).

El estudio de la emisión de los volátiles permite entender las interacciones entre las plantas emisoras y los organismos receptores, y cómo éstos después de recibir la

señal pueden modificar su comportamiento, fisiología y sus interacciones con otros organismos. Además, las emisiones de compuestos volátiles por las plantas, denominadas también emisiones biogénicas, no sólo juegan un papel importante en la química de la biosfera sino también de la atmósfera. Por ejemplo, se estima que las plantas emiten a la atmósfera entre 400 y 800 Tg de Carbono al año (revisado por Maffei *et al.*, 2011).

Esta revisión tiene por objetivo describir las características de los compuestos volátiles vegetales y su efecto en procesos biológicos. La primera parte consistirá en describir sus características fisicoquímicas y algunos aspectos sobre su emisión. La segunda parte desarrollará los diferentes procesos ecológicos en los que cuales modula las interacciones con organismos de otros niveles tróficos. La tercera parte desarrollará el tema de la importancia de los volátiles en la química atmosférica y su efecto en el clima.

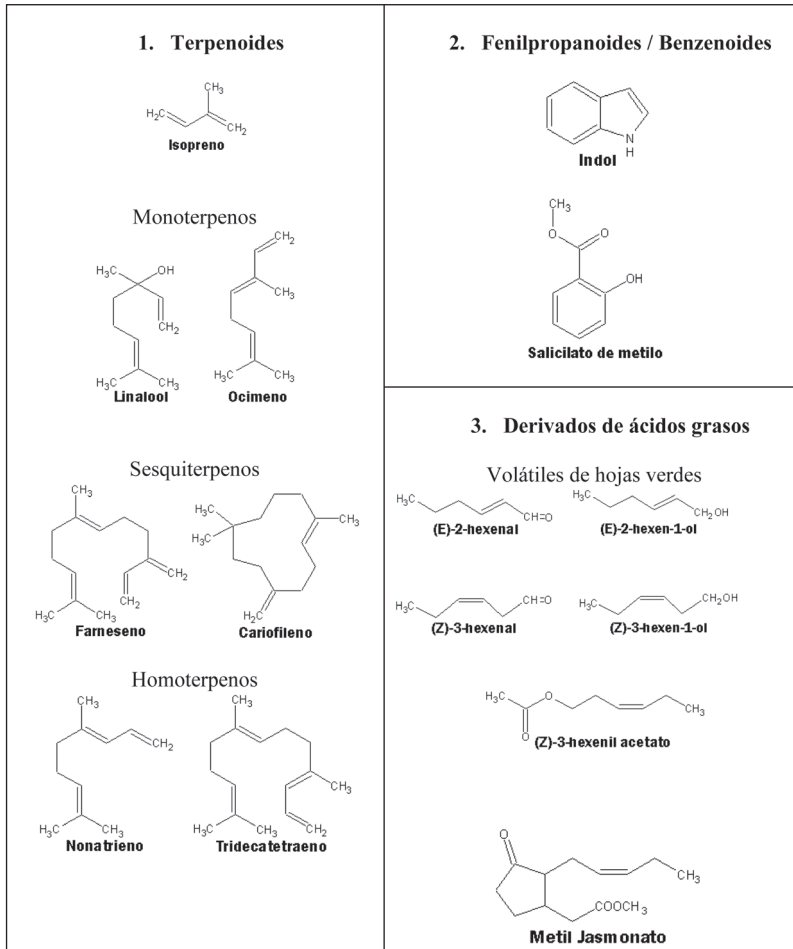
### **Emisión natural de volátiles vegetales**

Las plantas normalmente liberan agua y pequeñas cantidades de sustancias químicas volátiles cuando sus estomas están abiertos, las cuales se difunden a la atmósfera (Macías-Sámamo, 2001). Hasta ahora, se han descrito más de 1700 compuestos volátiles a partir de especies pertenecientes a más de 90 familias (Maffei, *et al.*, 2011).

Los compuestos volátiles son producidos y emitidos por hojas, frutos, flores y raíces. Pero principalmente se liberan a través de la superficie de la hoja y sitios de almacenamiento en las hojas (Paré & Tumlinson, 1999). Las plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*), por ejemplo, poseen glándulas en las cuales los volátiles son almacenados (Turlings *et al.*, 1998a), mientras que en las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) son almacenados en los tricomas (Agelopoulos *et al.*, 2000). Por lo general, los tricomas y glándulas externas suelen estar presentes en plantas herbáceas o arbustivas. En las especies arbóreas son más comunes las glándulas internas (Lerdau, 1991). Las coníferas, por ejemplo, poseen ductos de resina, mientras que en *Citrus* y *Poncirus* hay plástidos encargados de la acumulación de monoterpenos (Tingey *et al.*, 1991). La mezcla de volátiles emitida por una planta sana se denomina emisión constitutiva, mientras que la mezcla emitida después de que la planta sufre estrés biótico o abiótico se denomina inducida.

### **Clasificación de los volátiles**

La mayoría de los volátiles orgánicos son productos o subproductos de rutas metabólicas primarias. En general, tienen propiedades lipofílicas y bajo peso molecular, pero varían en su volatilidad y coeficiente de difusión. Esta última propiedad indica la facilidad con la que un soluto en particular se mueve en un disolvente determinado, por lo tanto, el paso de cada compuesto desde el interior de la hoja hacia la atmósfera depende de este valor (Peñuelas & Llusià, 2004).



**Figura 1.** Clasificación de los volátiles de acuerdo con su ruta metabólica.

Las plantas emiten mezclas de compuestos volátiles que pueden clasificarse en tres grandes grupos: 1) terpenos (también conocidos como isoprenoides), 2) fenilpropanoides/benzenoides, y 3) derivados de ácidos grasos (Figura 1), aunque también hay grupos menores como los indoles y los isotiocianatos.

Los terpenos representan el grupo más diverso, los cuales se clasifican de acuerdo con el número de carbonos en su cadena: hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), homoterpenos ( $C_{11}$  y  $C_{16}$ ) y diterpenos ( $C_{20}$ ). Los fenilpropanoides y los benzenoides se derivan del aminoácido L-fenilalanina; el metil salicilato (MeSA) y el estragol son ejemplos de este tipo de volátiles. Otros aminoácidos como

la alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina son precursores de compuestos volátiles que contienen nitrógeno y azufre en su estructura. A partir de los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos como el ácido linoléico y linolénico se producen compuestos volátiles mediante la acción de las lipooxigenasas (LOX). Algunos compuestos derivados de la actividad de LOX son los volátiles de hojas verdes, que incluyen aldehídos, ésteres, acetatos y alcoholes como el *trans*-2-hexenal, *cis*-3-hexenol y el jasmonato de metilo (MeJA por sus siglas en inglés) (Paré & Tumlinson, 1999; Dudareva *et al.*, 2004).

### **Importancia de la emisión constitutiva de volátiles**

Una explicación propuesta para la emisión de volátiles es que se trata de una respuesta a temperaturas altas. Mlot (1995) sugirió que los hidrocarburos liposolubles se disuelven en la membrana tilacoidal y evitan que los cloroplastos se degraden cuando la temperatura de la planta excede su óptimo biológico. Según su hipótesis, estos compuestos se evaporan conforme la temperatura aumenta, por lo que la volatilización enfría los cloroplastos. Sin embargo, debido a que el enfriamiento por evaporación de los terpenos es relativamente pequeño comparado con un disolvente como el agua, esta explicación no es aceptada universalmente.

Otra explicación sugiere que la emisión de volátiles representa una “válvula de escape metabólica”, es decir, que la síntesis de volátiles remueve el exceso de energía y carbono que no puede ser asimilado por la planta, como normalmente ocurre bajo condiciones de estrés (por ejemplo, altas temperaturas, sequía, carencia de nutrientes, contaminación ambiental) (Peñuelas & Llusià, 2004).

Por último, hay una explicación adaptativa que postula que la síntesis y emisión de volátiles es funcionalmente ventajosa para las plantas. La emisión constitutiva de volátiles tiene funciones ecológicas muy diversas que incluyen la atracción de polinizadores y dispersores de semillas, así como funciones de defensa (Pichersky & Gershenzon, 2002). Los volátiles presentes en la resina de coníferas actúan como atrayentes para un gran número de insectos descortezadores (Macías-Sámano, 2001), y como disolventes para compuestos de defensa de alto peso molecular, que de otra manera serían incapaces de fluir al sitio de ataque (Langenheim, 2003). Por otra parte, los volátiles de la resina impiden la alimentación y oviposición de herbívoros generalistas y actúan como toxinas para hongos patógenos.

### **Emisión de volátiles inducidos por herbivoría**

Un aspecto interesante es que las plantas dañadas por insectos herbívoros modifican su emisión normal o constitutiva de volátiles. Como regla general, el volumen de la emisión aumenta y la proporción de los volátiles en la mezcla cambia significativamente con respecto a las plantas no dañadas o dañadas mecánicamente. Además, se ha observado que los volátiles liberados varían de acuerdo con la especie de la



planta, al tipo de alimentación del herbívoro que produce el ataque (Turlings *et al.*, 1998b), e incluso de la etapa de desarrollo del insecto (Takabayashi *et al.*, 1995; Paré & Tumlinson, 1999).

La liberación de los volátiles inducidos no ocurre de manera simultánea e inmediata después del daño. Los primeros en aparecer son los volátiles de hoja verde, mientras que otros como los terpenos y el indol se liberan varias horas después del daño (Turlings & Benrey, 2001).

El considerable retraso en la emisión de volátiles después del daño por herbivoría apoya la hipótesis de que se requieren una serie de reacciones bioquímicas, incluyendo la expresión de genes, ensamblaje de proteínas y/o inducción enzimática, para la síntesis y emisión de estos compuestos (Paré & Tumlinson, 1999). Turlings *et al.* (1998a) consideran que los terpenos son emitidos a tiempos diferentes, debido a que estos compuestos son productos de más de una vía metabólica o se producen en distintas etapas de la misma vía.

El poseer un mecanismo de defensa inducida proporciona mayores beneficios que una defensa constitutiva debido a que la primera no requiere de una constante inversión de recursos, lo cual es importante si las defensas son costosas (Karban *et al.*, 1997). Además, los compuestos inducidos pueden ser tóxicos para la misma planta a largo plazo y por tanto, no es posible su expresión de manera constitutiva (Karban & Kué, 1999). La defensa inducida es más ventajosa que la constitutiva solamente en los casos en que el riesgo de ataque por herbívoros es bajo, o en casos donde el ataque de un herbívoro es prolongado y no es letal desde el principio. En otros casos la defensa constitutiva resulta más ventajosa (Zangerl & Bazzaz, 1992; Espinosa-García, 2001). Sin embargo, el que los volátiles inducidos funcionen como atrayentes o repelentes no necesariamente implica que su emisión sea adaptativa para la planta emisora, ya que pueden afectar simultáneamente a varias especies de herbívoros, carnívoros de artrópodos, competidores o patógenos (Dicke & Baldwin, 2010).

La inducción de emisión de volátiles en plantas puede ocurrir en dos escalas:

- 1) Respuesta local. Esta se refiere a la emisión de compuestos volátiles inducidos en el sitio donde se alimenta el herbívoro. El tiempo que transcurre para que dicha respuesta sea perceptible varía con la especie, puede ser de cinco o seis horas como en el caso del maíz (Turlings & Tumlinson, 1992) o de 24 horas como en el caso del algodón (Loughrin *et al.*, 1994). Esta respuesta se mantiene constante si el daño es continuo, llegando a durar varios días (Rose *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando el daño cesa, la emisión de volátiles disminuye significativamente al cabo de unas ocho horas en plantas de algodón (Loughrin *et al.*, 1994) y 24 horas en maíz (Turlings & Tumlinson, 1992).
- 2) Respuesta sistémica. Además de la liberación de volátiles en el sitio donde se alimenta el herbívoro, el análisis de emisión de volátiles en hojas intactas de plantas dañadas por herbivoría ha establecido que existe una respuesta sistémica en la planta. Por ejemplo, en maíz y algodón, las hojas alejadas del sitio

donde se alimentó el herbívoro mostraron un incremento en la liberación de volátiles. En las hojas de algodón no dañadas, la mezcla de volátiles difiere de los volátiles colectados de la planta completa, ya que no se detectan los productos de la vía de la lipoxigenasa que son liberados por tejidos recién cortados o dañados (Paré & Tumlinson, 1999). En maíz, los compuestos inducidos son liberados en toda la planta dañada (Turlings *et al.*, 1995). La naturaleza sistémica de la respuesta de la planta no es exclusiva de estas dos especies; las plantas de frijol y mandioca atacadas por herbívoros también emiten volátiles a través de sus hojas no dañadas (Turlings *et al.*, 1995).

Hasta el momento se desconoce la manera en que se activa la emisión sistémica de volátiles. Sin embargo, en plantas de tomate se sabe que está involucrado un polipéptido denominado sistemina (responsable también de la inducción de inhibidores de proteasas), el cual actúa como mensajero químico interno y transporta la señal desde el sitio dañado al resto de la planta (Corrado *et al.*, 2007). También se conocen mensajeros externos como el etileno, MeSa y MeJa; este último no sólo induce a otros tejidos de la misma planta por vía aérea, sino que puede inducir a plantas de otras especies colindantes.

#### *Agentes inductores*

La respuesta diferencial de la planta al daño mecánico y por herbivoría se debe a la acción de sustancias activadoras o inductoras. Puede inducirse a la planta con daño mecánico (por ejemplo, desprendimiento de tejidos, cortes e incisiones), sin embargo, es necesario aplicar secreciones orales de los insectos (obtenidas como regurgitados) para igualar la emisión de las plantas dañadas por insectos herbívoros (Turlings *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1995). Para que se produzca esta respuesta, los regurgitados deben estar en contacto directo con el tejido dañado (Turlings *et al.*, 1990). Cuatro productos han sido identificados como promotores o inductores de la liberación de volátiles a partir de las secreciones orales de insectos herbívoros masticadores (véase Capítulo 13). De manera general, el ataque por un herbívoro abre la ruta metabólica de los octadecanoides, de la cual algunos de sus productos son los jasmonatos (ácido jasmónico y metil jasmonato) y compuestos volátiles (terpenos y volátiles de hoja verde). Los jasmonatos se han utilizado como inductores para estudiar la emisión inducida de volátiles. Uno de los eventos finales en esta ruta es la expresión de proteínas inhibitoras de proteasas, las fenoloxidasas, glicoalcaloides esteroidales y los compuestos volátiles mismos (Corrado *et al.*, 2007).

### **Factores que afectan la emisión de volátiles**

#### *Factores abióticos*

Los principales factores abióticos que regulan la emisión de compuestos volátiles son: la luz, la temperatura, la disponibilidad de agua, el ozono y el CO<sub>2</sub> (Maffei *et al.*

al., 2011). A nivel fisiológico la luz y la temperatura determinan la tasa de síntesis de cada compuesto regulando la disponibilidad de sustratos y la actividad enzimática. A nivel fisicoquímico, afectan la emisión de los compuestos ya sintetizados regulando su volatilidad y difusión hacia la atmósfera (Niinemets *et al.*, 2004).

Especies como el maíz, algodón y frijol, al ser expuestas a una reducción de luz (por baja intensidad lumínica o acortamiento del ciclo diurno) experimentan una reducción en la liberación de volátiles inducidos por herbivoría (Paré & Tumlinson, 1999). El estrés hídrico afecta la emisión de volátiles en frijol lima, las plantas dañadas por herbivoría con menos agua disponible emiten mayores niveles de volátiles que las plantas sin estrés hídrico (Takabayashi *et al.*, 1994). En cambio en maíz, la emisión de volátiles disminuye al aumentar la humedad del suelo (Gouinguéné & Turlings, 2002). La adición de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados minerales y orgánicos reduce los volátiles constitutivos en el apio (Van Wassenhove *et al.*, 1990), y la concentración de volátiles en algodón (Chen *et al.*, 2008).

#### *Factores bióticos*

Las plantas difieren cualitativa y cuantitativamente en la composición de volátiles que liberan. Las diferencias cualitativas se observan principalmente entre especies distintas y, en menor proporción, entre variedades de la misma especie de planta (Turlings *et al.*, 1995). Por ejemplo, en el aguacate (*Persea americana*) la variedad Hass no emite volátiles de manera perceptible, aunque posee los compuestos en sus hojas, mientras que en la variedad Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) sí hay emisión de volátiles (Bravo-Monzón & Espinosa-García, 2008).

Entre genotipos de una misma especie también hay variación en la emisión de volátiles, que pueden ser diferencias cualitativas y cuantitativas (Dicke, 1999; Bravo-Monzón & Espinosa-García, 2008). Si bien el tipo y cantidad de volátiles emitidos están sujetos a control genético, pueden ocurrir cambios durante el desarrollo de la planta como efecto de la plasticidad fenotípica (Agelopoulos *et al.*, 2000).

El tipo de estrés que recibe la planta también está asociado con la emisión de mezclas particulares de volátiles. Por ejemplo, el daño mecánico en maíz libera una mezcla diferente a la producida por herbívoros masticadores (Turlings *et al.*, 1990). En general, se sabe que los herbívoros masticadores sólo inducen la vía del metil-jasmonato o ácido jasmónico, mientras que los insectos chupadores como los áfidos y los patógenos inducen la vía del salicilato de metilo o ácido salicílico (Smith & Boyko, 2007). La inducción de estas vías metabólicas implica la emisión de volátiles además de metabolitos secundarios y proteínas inhibitoras de herbívoros y/o patógenos. Al menos en plantas anuales, hay una correlación negativa entre las vías del jasmonato y la del salicilato, por lo que la vía que se induce primero suprime a la otra (Stout *et al.*, 2006). Así, si un insecto chupador o un patógeno induce la vía MeSa, en el ataque subsiguiente de un insecto masticador no aparecerán los volátiles típicos de inducidos por jasmonato de metilo.

### Interacciones biológicas intermediadas por los volátiles

Los herbívoros y sus enemigos naturales han evolucionado y funcionado dentro de un contexto multitrófico, por lo tanto, su comportamiento y su fisiología son influenciados por miembros del nivel inmediato inferior (Vet & Dicke, 1992; Ninkovic & Pettersson, 2003). Los volátiles emitidos por las plantas son percibidos y explotados por organismos de diferentes niveles tróficos como señales de fuentes de alimento, sitios de reproducción, presas u hospederos (Dudareva *et al.*, 2004; Arimura *et al.*, 2005; Pernal *et al.*, 2005; Tooker *et al.*, 2005; Tentelier & Fauvergue, 2007). Los siguientes ejemplos muestran cómo se modulan las interacciones entre la emisión de volátiles de plantas con los herbívoros y sus enemigos naturales.

#### *Atrayentes de herbívoros*

La emisión de volátiles constitutivos pueden servir a los herbívoros en la localización de su fuente de alimento (véase Capítulo 12). Por ejemplo, muchas especies de áfidos usan los volátiles de las plantas en los que se han criado por varias generaciones para identificar a la especie de alimento (Fuentes-Contreras *et al.*, 2001). Además, los volátiles inducidos por los herbívoros pueden funcionar como señales que atraen más herbívoros sobre la misma planta atacada.

Los volátiles en la resina de las coníferas cuentan con atrayentes para un gran número de insectos descortezadores. Entre los compuestos reportados hay monoterpenos como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y mirceno; al igual que sesquiterpenos como  $\alpha$ -cubebeno. *Scolytus ventralis* (Coleoptera: Scolytidae) es una especie altamente adaptada a responder a los volátiles emitidos por su hospedero. En bioensayos de laboratorio se ha descubierto que es capaz de diferenciar entre su hospedero *Abies grandis* y una especie químicamente muy similar *Abies lasiocarpa*. Una vez que un insecto ha comenzado el ataque sobre un árbol, el resto de los insectos se orientan hacia ese hospedero atraído por una mezcla de los volátiles del árbol y feromonas de agregación (Macías-Sámamo, 2001).

Este efecto de agregación también se ha observado en el lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. Las orugas de este insecto encuentran su alimento utilizando los volátiles emitidos por plantas de maíz que han sido dañadas por conespecíficos. En particular el linalol, inducido por el daño de herbívoros, parece ser el responsable de esta atracción (Carroll *et al.*, 2006). De manera similar, las plantas de *Vigna unguiculata* cuya emisión de volátiles ha sido inducida por herbivoría o por tratamiento con inceptinas, resultan más atractivas para las orugas de *S. frugiperda* que las plantas sanas o dañadas mecánicamente (Carroll *et al.*, 2008). Una posible explicación de este patrón es que las plantas inducidas representan sitios donde la probabilidad de encontrar una pareja reproductiva es más grande o que la planta representa una buena fuente de alimento.

#### *Repelentes de herbívoros*

Las plantas de maíz cuya emisión de volátiles ha sido inducida con regurgitado de orugas son menos atractivas para el áfido *Rhopalosiphum maidis* que las plantas sanas.

Los volátiles inducidos por el tratamiento podrían indicarles a los áfidos que la planta: 1) ha comenzado la producción de compuestos tóxicos; 2) que potenciales competidores están presentes en la planta y 3) que la planta es atractiva para parasitoides y depredadores. Es posible que el (E)- $\beta$ -farneseno, presente en las emisiones del maíz, sea el responsable de esta respuesta ya que también es una feromona de alarma común para los áfidos (Bernasconi *et al.*, 1998).

La (Z)-jasmona es un volátil de las plantas, inducido por daño mecánico o por herbivoría, que tiene propiedades repelentes para los áfidos de *Nasonovia ribis-nigri*. En ensayos de campo, los cultivos de trigo que son tratados con este compuesto son menos atractivos para los áfidos. En contraste, la (Z)-jasmona es atractiva para los insectos antagonistas de los áfidos como *Coccinella septempunctata* (Coleoptera) y *Aphidius ervi* (Hymenoptera) (Birkett *et al.*, 2000). Para otros ejemplos sobre el papel repelente de los volátiles en la búsqueda de hospedera de insectos herbívoros véase el Capítulo 12.

#### *Atrayentes de enemigos naturales de los herbívoros*

Los insectos parasitoides dependen completamente de otros artrópodos como fuente de alimento para su progenie. Encontrar un hospedero es para ellos la clave para el éxito reproductivo. En la localización, una hembra puede usar varias modalidades sensoriales en combinación, aunque la más importante parece ser la quimiorrepción (olfato y gusto) (Turlings *et al.*, 1993). Los parasitoides en busca de herbívoros, que a menudo son pequeños e inconspicuos, tratan de encontrar primero la fuente de alimento de sus hospederos (localización del hábitat). Las diferentes especies de plantas tendrán diferente olor y en un ambiente dominado por hojas verdes, el olfato antes que la visión, les permite discriminar entre plantas dañadas y no dañadas (Turlings & Benrey, 2001).

En casos donde las plantas emiten una mezcla cualitativa diferente en respuesta a la herbivoría comparada con la de daño mecánico, los artrópodos carnívoros son capaces de detectar los volátiles de las plantas inducidos por herbivoría (Cuadro 1). Estos son atraídos hacia esas plantas con más intensidad que hacia plantas dañadas mecánicamente o hacia los herbívoros aislados de la planta (Turlings *et al.*, 1990; Turlings & Benrey, 2001). Es muy posible que la supresión de la emisión de volátiles constitutiva e inducida en maíz causada por la oviposición de las hembras del gusano cogollero (*S. frugiperda*) evite la atracción de parasitoides de huevos que usan como señales a los volátiles vegetales producidos cuando se depositan huevos sobre las hojas (Peñaflor *et al.*, 2011).

#### *Atrayentes de enemigos naturales bajo tierra*

La emisión de volátiles por la parte aérea de la planta se ha estudiado ampliamente, sin embargo, también las raíces responden a la herbivoría emitiendo volátiles atractivos para depredadores (Rasmann *et al.*, 2005; Bezemer & van Dam, 2005). Ejemplos de este tipo de interacciones son detalladas por Rodríguez-Saona (véase Capítulo 13).

CUADRO 1. Estudios de emisión de volátiles donde se ha encontrado atracción de enemigos naturales de artrópodos.

Especie de planta	Herbívoro	Cambio en la emisión	Enemigo natural	Referencia
Algodón <i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Heliothis virescens</i> (lepidóptero)	Incremento Compuestos nuevos	<i>Cardiochiles nigriceps</i> (himenóptero)	(De Moraes <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Helicoverpa zea</i> <i>Spodoptera exigua</i> (lepidópteros)	Incremento Proporción de compuestos	<i>Cotesia marginiventris</i> <i>Microplitis croceipes</i> (himenópteros)	(Rose <i>et al.</i> , 1998)
Chile <i>Capsicum annuum</i>	<i>Tetranychus urticae</i> (ácaro) <i>Myzus persicae</i> (hemiptero)	Compuestos nuevos Proporción de compuestos	<i>Macrolophus caliginosus</i> (hemíptero)	(Moayeri <i>et al.</i> , 2007)
Col <i>Brassica oleracea</i>	<i>Pieris rapae</i> <i>Pieris brassicae</i> (lepidóptero)	Incremento Compuestos nuevos	<i>Cotesia glomerata</i> <i>Cotesia rubecula</i> (himenóptero)	(Geervliet <i>et al.</i> , 1998)
Frijol <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (hemiptero)	Compuestos nuevos	<i>Encarsia formosa</i> (himenóptero)	(Birkett <i>et al.</i> , 2000)
Frijol lima <i>Phaseolus lunatus</i>	<i>Tetranychus urticae</i> (ácaro)	Incremento Compuestos nuevos	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (ácaro)	(Dicke <i>et al.</i> , 1999)
Haba <i>Vicia faba</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (áfido)	Incremento Compuestos nuevos	<i>Aphidius ervi</i> (himenóptero)	(Du <i>et al.</i> , 1998)
Maíz <i>Zea mais</i>	<i>Nezara viridula</i> (heteróptero) <i>Spodoptera exigua</i> (lepidóptero)	Incremento Proporción de compuestos Incremento Compuestos nuevos	<i>Trissolcus basalus</i> (himenóptero) <i>Cotesia marginiventris</i> (himenóptero)	(Colazza <i>et al.</i> , 2004a; Colazza <i>et al.</i> , 2004b) (Turlings & Tumlinson, 1992)
Manzano <i>Pirus malus</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> (lepidóptero) <i>Panonychus ulmi</i> (ácaro)	Incremento Proporción de compuestos Incremento Compuestos nuevos	<i>Microplitis rufiventris</i> (himenóptero) <i>Amblyseius andersoni</i> <i>Amblyseius californicus</i> (ácaros)	(Gouinguené <i>et al.</i> , 2003) (Llusia y Peñuelas, 2001)

CUADRO I. Continuación.

Especie de planta	Herbívoro	Cambio en la emisión	Enemigo natural	Referencia
Olmo <i>Ulmus minor</i>	<i>Xanthogaleruca luteola</i> (coleóptero)	Compuestos nuevos	<i>Oomyzus gallericacae</i> (himenóptero)	(Meiners <i>et al.</i> , 2000)
Pino <i>Pinus sylvestris</i>	<i>Diprion pini</i> (himenóptero)	Compuestos nuevos Proporción de compuestos	<i>Chrysonotomyia ruforum</i> (himenóptero)	(Hilker <i>et al.</i> , 2002)
Tabaco <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Heliothis virescens</i> (lepidóptero)	Incremento Compuestos nuevos	<i>Cardiophiles nigriceps</i> (himenóptero)	(De Moraes <i>et al.</i> , 1998)
Tabaco silvestre <i>Nicotiana attenuata</i>	<i>Manduca sexta</i> (lepidóptero)	Proporción de compuestos	<i>Geocoris</i> spp. (hemíptero)	(Allmann & Baldwin, 2010)

### Uso potencial de la emisión de volátiles vegetales en control biológico

La repelencia de herbívoros y principalmente, la atracción de enemigos naturales a plantas dañadas tienen aplicación directa en el campo del control biológico de plagas en plantas cultivadas. El estudio detallado de cuáles son los compuestos que condicionan la atracción de los depredadores de los insectos es uno de los principales ejes de estudio y aplicación. Por ejemplo, continuando con el modelo de estudio del nemátodo, la aplicación del compuesto (E)- $\beta$ -cariofileno en raíces que no lo producen atrae a los nemátodos disminuyendo el impacto negativo de las larvas (Rasmann *et al.*, 2005).

### Emisión de volátiles inducidos por herbivoría: interacciones planta-planta

Diversos estudios han mostrado que los volátiles inducidos también pueden afectar a plantas vecinas no dañadas, las cuales en respuesta también emiten volátiles (Kobayashi & Yamamura, 2007). La mayor parte de la evidencia de este proceso proviene de estudios donde las plantas no dañadas están expuestas a altas concentraciones de volátiles que son mayores a las emitidas constitutivamente (Paschold *et al.*, 2006). La señalización entre plantas con emisiones de volátiles distintas, que finalmente es el resultado de su estado fisiológico, ha sido estudiada ampliamente y a continuación se presentan los siguientes ejemplos.

#### *Inducción de plantas vecinas (priming)*

El papel de algunos compuestos volátiles como el jasmonato de metilo y el salicilato de metilo se han estudiado ampliamente como inductores volátiles en la señalización entre plantas que activa la respuesta de resistencia (Koch *et al.*, 1999). El efecto producido en la planta receptora se conoce como estado de alistamiento o *priming* (Heil & Silva, 2007; Geshenzon, 2007; Walters & Heil, 2007; Frost *et al.* 2008), lo cual le permite a la planta expuesta activar con mayor rapidez su resistencia una vez que el ataque ha ocurrido.

Farmer & Ryan (1990) encontraron que al aplicar jasmonato de metilo sobre la superficie de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), se induce la síntesis de inhibidores de proteasas en las plantas tratadas y en las plantas vecinas. Además, demostraron que la señal puede salir de hojas de una especie y tener efecto en las hojas de otra especie; al incubar plantas de jitomate junto a plantas de *Artemisia tridentata*, que poseen jasmonato de metilo en estructuras localizadas en las hojas, se induce la acumulación del inhibidor de proteasa en las hojas de jitomate.

De manera parecida, cuando las hojas de apio (*Apium graveolens*) son expuestas a vapores de jasmonato de metilo o alimentadas a través del pecíolo con soluciones acuosas de jasmonato, se incrementa la concentración de furanocumarinas; en particular, xantotoxina y bergapteno (Miksch & Boland, 1996).



El etileno tiene una función similar al jasmonato de metilo, el cual es emitido por plantas dañadas por herbívoros (Koch *et al.*, 1999). El etileno participa en la maduración de frutos, germinación de semillas, abscisión de órganos, senectud, promoción o inhibición de la floración. Los factores de estrés externo como las heridas, invasión de patógenos e inundaciones pueden inducir la biosíntesis de etileno; éste a su vez produce respuestas de resistencia como la abscisión de los órganos infectados o la inducción de proteínas específicas de defensa (Chang & Meyerowitz, 1995).

Un estudio realizado con plantas de tabaco silvestre (*Nicotiana attenuata*) mostró que la exposición a volátiles de plantas dañadas no activa la ruta bioquímica del ácido jasmónico. Más bien, la previa exposición a volátiles de una planta dañada permite que la planta no dañada reaccione más rápidamente al ataque de los herbívoros, como si se tratara de un sistema inmune vegetal (Paschold *et al.*, 2006).

#### *Atracción de plantas parásitas*

La planta parásita *Cuscuta pentagona* utiliza los volátiles para encontrar su hospedero. Las plántulas de esta especie exhiben un crecimiento dirigido hacia plantas de tomate próximas y hacia la mezcla de volátiles de esas plantas. Las plántulas de *Cuscuta* pueden distinguir entre los volátiles del tomate y otras plantas no hospederas, como el trigo. Cuando se evaluó la respuesta de *Cuscuta* a los compuestos volátiles individuales de tomate se encontró una respuesta positiva para el  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -mirceno y  $\alpha$ -pineno. Los resultados sugieren que estos compuestos son determinantes para la localización de su hospedero (Runyon *et al.*, 2006).

### **Volátiles vegetales y su importancia en la química atmosférica**

A escala global, la emisión de compuestos volátiles vegetales, o también llamadas emisiones biogénicas, constituye la mayor fuente de aportación de hidrocarburos sin metano (NMVOC, non-methane volatile organic compounds) en la atmósfera; y en menor escala, otros procesos bióticos como los relámpagos, la actividad volcánica y la quema de biomasa (Guenter *et al.*, 2000; Niinemets *et al.*, 2004). Anualmente, aproximadamente el 90% de la aportación de hidrocarburos proviene de estas emisiones vegetales y el resto proviene casi únicamente de los combustibles fósiles.

Como se ha descrito anteriormente, la emisión de los compuestos volátiles vegetales responde a factores tanto abióticos como bióticos los cuales influyen en su síntesis y su difusión a la atmósfera. La compleja interacción de ambos factores provoca la variación en la emisión de volátiles de manera espacial y temporal. Las emisiones biogénicas de NMVOC son dependientes de la temperatura y la luz, por lo que a escala global las emisiones son muchos más altas en verano en latitudes bajas (Guenter *et al.*, 2000). Otros estudios demuestran que además estas emisiones son específicas de ciertas especies y de su forma de vida (Lerdau & Slobodkin, 2002).

### *Emisiones biogénicas y clima*

La emisión de NMVOC es vital para el mantenimiento del potencial redox de la atmósfera y la calidad del aire: son los determinantes primordiales de la capacidad oxidativa de la troposfera (una medida del potencial de la atmósfera para remover contaminantes), de la dinámica del monóxido de carbono (CO) y del ozono troposférico, y por último, de la abundancia de aerosoles orgánicos atmosféricos.

Por lo anterior es imposible no ligar la emisión de estos compuestos con el clima, aún más, si la estimación de que las plantas emiten a la atmósfera entre 400 y 800 Tg de carbono al año (revisado en Maffei *et al.*, 2011). Recientemente se ha estudiado cuál sería el impacto de las emisiones biogénicas en el efecto invernadero y viceversa. Debido a que los NMVOC aumentarían conforme las temperaturas aumenten, las consecuencias del efecto invernadero sobre la emisión de compuestos volátiles serían tanto positivas como negativas (Peñuelas & Llusà, 2003; Peñuelas & Staudt, 2010).

Por un lado, los compuestos volátiles rápidamente reaccionan con el radical hidroxilo (OH), el ozono (O<sub>3</sub>) y con el nitrato (NO<sub>3</sub>), con lo cual se produce la formación de especies químicas secundarias (formaldehído, radicales de peróxido, compuestos carbonilo, etc.) que aumentan el O<sub>3</sub>. La reacción de los NMVOC con el OH lleva a un aumento en los niveles de metano (CH<sub>4</sub>), ya que la presencia de OH condiciona el tiempo de vida del CH<sub>4</sub>. La presencia de este compuesto por un tiempo prolongado en la atmósfera provocaría un aumento en la temperatura (Fuentes *et al.*, 2001).

Por otro lado, las emisiones biogénicas son precursoras de aerosoles, los cuales absorben calor y modifican la formación y las propiedades de las nubes (Kavouras *et al.*, 1998). La presencia de nubes enfriaría la superficie de la tierra durante el día además de bajar la temperatura de la planta directamente. Se han identificado en muestras de aerosoles, los compuestos pinonaldehído (2,2-dimetil-3-acetil-ciclobutil-etanal) y nopinona (6,6-dimetil-biciclo[3.1.1]heptan-2-ona) los cuales son productos de la reacción de foto-oxidación del  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno, respectivamente.

La reactividad o el tiempo de vida en el cual permanecen en la atmósfera, varía de acuerdo al tipo de compuesto. Por ejemplo, en el caso del isopreno su tiempo de vida es de 4.8 horas. Sin embargo, su tasa de emisión anual es de 175 a 503  $\times 10^{12}$  g C; los monoterpenos como el  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y limoneno, tienen un tiempo de vida de 2.4 a 4.8 horas y una tasa de emisión anual de 127 a 480  $\times 10^{12}$  g C. Otros compuestos que duran más de 24 horas en la atmósfera, como el metanol, el ácido fórmico o el etileno, son menos abundantes con una tasa de emisión de 1 a 20  $\times 10^{12}$  g C (Fuentes *et al.*, 2001).

### **Conclusiones**

Los compuestos volátiles vegetales representan el objeto de estudio de diferentes disciplinas a distintas escalas. Su estudio es crucial para entender diferentes procesos que suceden tanto en la biosfera como en la atmósfera; que afectan tanto a insectos como al hombre mismo.

El estudio del papel de los compuestos volátiles en las interacciones tritróficas (planta-herbívoro-depredador) plantea preguntas interesantes sobre los procesos ecológicos y evolutivos que han modulado la amplia gama de interacciones que se establecen con las plantas y organismos de niveles tróficos superiores como con su mismo nivel. Desde el punto de vista práctico, los estudios de atracción de depredadores por volátiles reportan que las emisiones de volátiles son detectadas y atractivas para los depredadores, sin embargo, no siempre se reporta si hay un mayor consumo o parasitismo en presencia de volátiles lo que implica investigar aún más los efectos ecológicos de los volátiles.

Por último, es claro que la cantidad de carbono que se hace disponible en la atmósfera como resultado de las emisiones de volátiles sin metano es lo suficientemente grande como para modificar su química. El efecto de estos cambios tendría impactos distintos según la escala a la que se mida: a nivel individual regulando la temperatura de las plantas, a nivel regional modificando el microclima o a nivel global modificando la temperatura. Definitivamente es necesario continuar los monitoreos para ligar los cambios en estas emisiones conforme aumenta la temperatura global y conforme se modifica la vegetación, para hacer mejor predicciones sobre el impacto de las emisiones biogénicas.

## Agradecimientos

Esta síntesis fue posible gracias a los resultados de los proyectos de investigación apoyados por UNAM PAPIID IN227607, y POCIECO otorgados a Francisco J. Espinosa-García. A. Bautista-Lozada y A. Bravo-Monzón agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de doctorado otorgada durante sus estudios en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Referencias

- AGELOPOULOS, N. G., CHAMBERLAIN, K. & PICKETT, J. A. 2000. Factors affecting volatile emissions of intact potato plants, *Solanum tuberosum*: variability of quantities and stability of ratios. *J. Chem. Ecol.* 26: 497-511.
- ALLMANN, S., & BALDWIN, I. T. 2010. Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of green leaf volatiles. *Science* 329: 1075-1078.
- ARIMURA, G., KOST, C., & BOLAND, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 91-111.
- BERNASCONI, M., TURLINGS, T., AMBROSETTI, L., BASSETTI, P., & DORN, S. 1998. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomol. Exp. Appl.* 87: 133-142.
- BEZEMER, T. M., & VAN DAM, N. M. 2005. Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 617-624.
- BIRKETT, M. A., CAMPBELL, C. A. M., CHAMBERLAIN, K., GUERRIRI, E., HICK, A. J., MARTIN, J. L., MATTHEWS, M., NAPIER, J. A., PETERSSON, J. A., POPPY, G. M., POW, E. M., PYE, B. J., SMART, L. E.,

- WADHAMS, G. H., WADHAMS, L. J., & WOODCOCK, C. M. 2000. New roles for *cis*-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 9329-9334.
- BRAVO-MONZÓN, A. E., & ESPINOSA-GARCÍA, F. J. 2008. Volatile emissions in *Persea americana* in response to the stem borer *Copturus aguacatae* attack. *Allelopathy J.* 21: 165-174.
- CARROLL, M. J., SCHMELZ, E. A., MEAGHER, R. L., & TEAL, P. E. A. 2006. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *J. Chem. Ecol.* 32: 1911-1924.
- CARROLL, M. J., SCHMELZ, E. A., & TEAL, P. E. A. 2008. The attraction of *Spodoptera frugiperda* neonates to cowpea seedlings is mediated by volatiles induced by conspecific herbivory and the elicitor inceptin. *J. Chem. Ecol.* 34: 291-300.
- CHANG, C., & MEYEROWITZ, E. 1995. The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: A eukaryotic two-component signaling system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 4129-4133.
- CHEN, Y., SCHMELZ, E., WÄCKERS, F., & RUBERSON, J. 2008. Cotton plant, *Gossypium hirsutum* L., defense in response to nitrogen fertilization. *J. Chem. Ecol.* 34: 1553-1564.
- COLAZZA, S., FUCARINO, A., PERI, E., SALERNO, G., CONTI, E., & BIN, F. 2004a. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *J. Exp. Biol.* 207: 47-53.
- COLAZZA, S., McELFRESH, J. S., & MILLAR, J. 2004b. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and oviposition on bean spp., that attract the egg parasitoid *Trissolcus basalis*. *J. Chem. Ecol.* 30: 945-964.
- CORRADO, G., SASSO, R., PASQUARIELLO, M., IODICE, L., CARRETTA, A., CASCONI, P., ARIATI, L., DIGILIO, M., GUERRIERI, E., & RAO, R. 2007. Systemin regulates both systemic and volatile signaling in tomato plants. *J. Chem. Ecol.* 33: 669-681.
- DE MORAES, C., LEWIS, W., PARÉ, P., ALBORN, H., & TUMLINSON, J. 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 393: 570-573.
- DICKE, M. 1999. Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol. Exp. Appl.* 91: 131-142.
- DICKE, M., & BALDWIN, I. T. 2010. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* 15: 167-175.
- DICKE, M., GOLS, R., LUDEKING, D., & POSTHUMUS, M. 1999. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in Lima bean plants. *J. Chem. Ecol.* 25: 1907-1922.
- DU, Y., POPPY, G., POWELL, W., PICKETT, J., WADHAMS, L., & WOODCOCK, C. 1998. Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract the parasitoid *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecol.* 24: 1355-1368.
- DUDAREVA, N., PICHERSKY, E., & GERSHENZON, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135: 1893-1902.
- ESPINOSA-GARCÍA, F. J. 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal, pp. 231-249, en Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & Cruz-Ortega, R. (eds.), *Interacciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. UNAM y Plaza y Valdez, México, D.F.
- FARMER, E., & RYAN, C. 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716.
- FROST C. J., MESCHER M. C., CARLSON J. E., & DE MORAES C. M. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiol.* 146: 818-824.
- FUENTES, J. D., HAYDEN, B. P., GARSTANG, M., LERDAU, M., FITZJARRALD, D., BALDOCCHI, D. D., MONSON, R., LAMB, B., & GERON, C. 2001. New directions: VOCs and biosphere-atmosphere feedbacks. *Atmos. Environ.* 35: 189-191.

- FUENTES-CONTRERAS, E., GIANOLI, E., QUIROZ, A., RAMÍREZ, C. C., & NIEMEYER, H. 2001. Ecología química de las relaciones entre áfidos y plantas, pp. 305-375, en Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & Cruz-Ortega, R. (eds.), *Interacciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. UNAM y Plaza y Valdez, México, D.F.
- GERSHENZON, J. 2007. Plant volatiles carry both public and private messages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5257-5258.
- GEERVLIT, J., VREUGDENHIL, A., DICKE, M., & VET, L. 1998. Learning to discriminate between infochemicals from different plant-host complexes by the parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula* (Hymenoptera: Braconidae). *Entomol. Exp. Appl.* 86: 241-252.
- GOINGUENÉ, S. P., & TURLINGS, T. C. J. 2002. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol.* 129: 1296-1307.
- GOINGUENÉ, S., ALBORN, H., & TURLINGS, T. C. J. 2003. Induction of volatile emissions in maize by different larval instars of *Spodoptera littoralis*. *J. Chem. Ecol.* 29: 145-162.
- GUENTER, A., GERON, C., PIERCE, T., LAMB, B., HARLEY, P., & FALL, R. 2000. Natural emissions of non-methane volatile organic compounds, carbon monoxide, and oxides from North America. *Atmos. Environ.* 34: 2205-2230.
- HEIL, M., & SILVA BUENO, J. C. 2007. Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5467-5472.
- HILKER, M., KOBBS, C., VARAMA, M., & SCHRANK, K. 2002. Insect egg deposition induces *Pinus sylvestris* to attract egg parasitoids. *J. Exp. Biol.* 205: 455-461.
- KARBAN, R., AGRAWAL, A. A., & MANGEL, M. 1997. The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology* 78: 1351-1355.
- KARBAN, R., & KUÉ, J. 1999. Induced resistance against pathogens and herbivores: an overview, pp. 1-16, en Agrawal, A. A., Tuzun, S., & Bent, E. (eds.), *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. APS Press, St. Paul.
- KAVOURAS, I. G., MIHALOPOULOS, N., & STHEPANOU, E. G. 1998. Formation of atmospheric particles from organic acids produced by forests. *Nature* 395: 683-686.
- KOBAYASHI, Y., & YAMAMURA, N. 2007. Evolution of signal emission by uninfested plants to help nearby infested relatives. *Evol. Ecol.* 21: 281-294.
- KOCH, T., KRUMM, T., JUNG, V., ENGELBERTH, J., & BOLAND, W. 1999. Differential induction of plant volatile biosynthesis in the Lima bean by early and late intermediates of the octadecanoic-signaling pathway. *Plant Physiol.* 121: 153-162.
- LANGENHEIM, J. H. 2003. *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*. Timber Press Inc., U.S.A.
- LERDAU, M. 1991. Plant function and biogenic terpene emission, pp. 121-134, en Sharkey, T., Holland, E., & Mooney, H. A. (eds.), *Trace Gas Emissions by Plants*. Academic Press, San Diego.
- LERDAU, M., & SLOBODKIN, L. 2002. Trace gas emissions and species-dependent ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 309-312.
- LLUSIA, J., & PEÑUELAS, J. 2001. Emission of volatile compounds by apple trees under spider mite attack and attraction of predatory mites. *Exp. Appl. Acarol.* 25: 65-77.
- LOUGHRIN, J., MANUKIAN, A., HEATH, R., TURLINGS, T., & TUMLINSON, J. 1994. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 11836-11840.
- MACÍAS-SÁMANO, J. 2001. Mediación semioquímica entre insectos descortezadores y coníferas, pp. 459-503 en Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & Cruz-Ortega, R. (eds.), *Interacciones Químicas entre*

*Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación.* UNAM y Plaza y Valdez, México, D.F.

- MAFFEI, M., GERTSCH, J., & APPENDINO, G. 2011. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Nat. Prod. Rep.* 28: 1359-1380.
- MEINERS, T., WESTERHAUS, C., & HILKER, M. 2000. Specificity of chemical cues used by a specialist egg parasitoid during host location. *Entomol. Exp. Appl.* 95: 151-159.
- MIKSCH, M., & BOLAND, W. 1996. Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plants (*Apium graveolens*). *Experientia* 52: 739-743.
- MLOT, C. 1995. A clearer view of why plants make haze. *Science* 268: 641-642.
- MOAYERI, H. R. S., ASHOURI, A., POLL, L., & ENKEGAARD, A. 2007. Olfactory response of a predatory mirid to herbivore induced plant volatiles: multiple herbivory vs. single herbivory. *J. Appl. Entomol.* 131: 326-332.
- NIINEMETS, L., LORETO, F., & REICHSTEIN, M. 2004. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science* 9: 180-186.
- NINKOVIC, V., & PETERSSON, J. 2003. Searching behaviour of the seven-spotted ladybird, *Coccinella septempunctata* effects of plant-plant odour interaction. *Oikos* 100: 65-70.
- PARÉ, P., & TUMLINSON, J. 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 121: 325-331.
- PICHERSKY, E., & GERSHENZON, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 237-243.
- PASCHOLD, A., HALITSCHKE, R., & BALDWIN, I. T. 2006. Using 'mute' plants to translate volatile signals. *The Plant Journal* 45: 275-291.
- PEÑAFLORES, M. F. G. V., ERB, M., ROBERT, C. A. M., MIRANDA, L. A., WERNEBURG, A. G., DOSSI, F. C. A., TURLINGS, T. C. J., & BENTO, J. M. S. 2011. Oviposition by a moth suppresses constitutive and herbivore induced plant volatiles in maize. *Planta* 234: 207-215.
- PEÑUELAS, J., & LLUSIÀ, J. 2003. BVOCs: Plant defense against climate warming? *Trends in Plant Science* 8: 105-109.
- PEÑUELAS, J., & LLUSIÀ, J. 2004. Plant VOC emissions: making use of the unavoidable. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 402-404.
- PEÑUELAS, J., & STAUDT, M. 2010. BVOCs and global change. *Trends in Plant Science* 15:133-144.
- PERNAL, S. F., BAIRD, D. S., BIRMINGHAM, A. L., HIGO, H. A., SLESSOR, K. N., & WINSTON, M. L. 2005. Semiochemicals influencing the host-finding behaviour of *Varroa destructor*. *Exp. Appl. Acarol.* 37: 1-26.
- RASMANN, S., KÖLLNER, T. G., DEGENHARDT, J., HILTPOLD, I., TOEPFFER, S., KUHLMANN, U., GERSHENZON, J., & TURLINGS, T. C. J. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434: 732-737.
- ROSE, U. S. R., MANUKIAN, A., HEATH, R. R., & TUMLINSON, J. H. 1996. Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves (a systemic response of living plants to caterpillar damage). *Plant Physiol.* 111: 487-495.
- ROSE, U. S. R., LEWIS, W. J., & TUMLINSON, J. H. 1998. Specificity of systemically released cotton volatiles as attractants for specialist and generalist parasitic wasps. *J. Chem. Ecol.* 24: 303-319.
- RUNYON, J. B., MESCHER, M. C., & DE MORAES, C. M. 2006. Volatile chemical cues guide host location and host selection by parasitic plants. *Science* 313: 1964-1967.
- SMITH, C. M., & BOYKO, E. V. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomol. Exp. Appl.* 122: 1-16.

- STOUT, M. J., THALER, J. S., & THOMMA, B. P. H. J. 2006. Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 663-689.
- TAKABAYASHI, J., DICKE, M., & POSTHUMUS, M. A. 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant mite interactions - variation caused by biotic and abiotic factors. *J. Chem. Ecol.* 20: 1329-1354.
- TAKABAYASHI, J., TAKAHASHI, S., DICKE, M., & POSTHUMUS, M. A. 1995. Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *J. Chem. Ecol.* 21: 273-287.
- TENTELIER, C., & FAUVERGUE, X. 2007. Herbivore-induced volatiles as cues for habitat assessment by a foraging parasitoid. *J. Anim. Ecol.* 76: 1-8.
- TINGEY, D., TURNER, D., & WEBER, J. 1991. Factors controlling the emissions of monoterpenes and other volatile organic compounds, pp. 93-119 en Sharkey, T., Holland, E., & Mooney, H. A. (eds.), *Trace Gas Emissions by Plants*. Academic Press, San Diego.
- TOOKER, J. F., CRUMRIN, A. L., & HANKS, L. M. 2005. Plant volatiles are behavioral cues for adult females of the gall wasp *Antistrophus rufus*. *Chemoecology* 15:85-88.
- TURLINGS, T., & TUMLINSON, J. 1992. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 8399-8402.
- TURLINGS, T. C. J., & BENREY, B. 2001. Efectos de los metabolitos secundarios vegetales en el comportamiento y desarrollo de avispas parasitoides, pp. 505-540, en Anaya, A. L., Espinosa-García, F. J., & Cruz-Ortega, R. (eds.), *Interacciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. UNAM y Plaza y Valdez, México, D.F.
- TURLINGS, T., TUMLINSON, J., & LEWIS, W. 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250: 1251-1253.
- TURLINGS, T. C. J., WÄCKERS, F. L., VET, L. E. M., LEWIS, W. J., & TUMLINSON, J. H. 1993. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids, pp. 51-78, en Papaj, D. R., & Lewis, A. C. (eds.), *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*. Chapman & Hall, New York.
- TURLINGS, T., LOUGHRIN, J., MCCALL, P., RÖSE, U., LEWIS, W., & TUMLINSON, J. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 4169-4174.
- TURLINGS, T. C. J., LENGWILER, U. B., BERNASCONI, M. L., & WECHSLER, D. 1998a. Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta* 207: 146-152.
- TURLINGS, T., BERNASCONI, M., BERTOSSA, R., FRANZ, B., GENEVIÈVE, C., & DORN, S. 1998b. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: Possible consequences for their natural enemies. *Biol. Control* 11: 122-129.
- VAN WASSENHOVE, F. A., DIRINCK, P. J., SCHAMP, N. M., & VULSTEKE, G. A. 1990. Effect of nitrogen fertilizers on celery volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 38: 220-226.
- VET, L. E. M., & DICKE, M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 141-172.
- WALTERS, D. & HEIL, M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol Mol Plant Pathol*, 71:3-17.
- ZANGERL, A. R., & BAZZAZ, F. A. 1992. Theory and pattern in plant defense allocation, pp. 363-391 en Simms, E. L. (ed.), *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics*. The University of Chicago Press, Chicago.

## *Capítulo dos*

---

“ODOUR VARIATION AMONG TOMATO INDIVIDUALS IN  
RESPONSE TO HERBIVORY DEPENDS ON INSECT SPECIES”



# Odor Uniformity among Tomato Individuals in Response to Herbivore Depends on Insect Species

Alicia Bautista-Lozada<sup>1,2</sup>, Francisco Javier Espinosa-García<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México,

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México

## Abstract

Plants produce specific volatile organic compound (VOC) blends in response to herbivory. Herbivore-induced blends may prime the plant for future attack or attract carnivorous insects; these responses have been considered adaptive for plants. If herbivores differentially modify the VOC emission among individuals within a group of plants they feed upon, then plant responses to herbivores will not only produce specific blends but also variation in odor among individuals, i.e. individuals smell the same, then having a uniform odor. We investigated the VOC emission variation or uniformity among tomato individuals (*Solanum lycopersicum* L. cv. Castlemart) in response to moderate wounding by (1) nymphs of the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (TP); (2) Lepidoptera chewing-feeding larvae of Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda* Smith) (FAW) and (3) of Cabbage Looper (*Trichoplusia ni* Hübner) (CL), and (4) mechanical damage (MD). We used a ratio-based analysis to compare the fold-change in concentration from constitutive to induced VOC emission. We also used size and shape analysis to compare the emission of damaged and non-damaged individuals. Aside of finding herbivore-specific blends in line with other studies, we found patterns not described previously. We detected constitutive and induced odor variation among individuals attacked by the same herbivore, with the induced odor uniformity depending on the herbivore identity. We also showed that the fold-change of VOCs from constitutive to induced state differed among individuals independently of the uniformity of the blends before herbivore attack. We discuss our findings in the context of the ecological roles of VOCs in plant-plant and plant-carnivore insects' interactions.

**Citation:** Bautista-Lozada A, Espinosa-García FJ (2013) Odor Uniformity among Tomato Individuals in Response to Herbivore Depends on Insect Species. PLoS ONE 8(10): e77199. doi:10.1371/journal.pone.0077199

**Editor:** Martin Heil, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico

**Received:** December 5, 2012; **Accepted:** September 5, 2013; **Published:** October 9, 2013

**Copyright:** © 2013 Bautista-Lozada et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by Universidad Nacional Autónoma de México by the grant UNAM-PAPIIT IN227607 given to FJE. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [espinosa@cicco.unam.mx](mailto:espinosa@cicco.unam.mx)

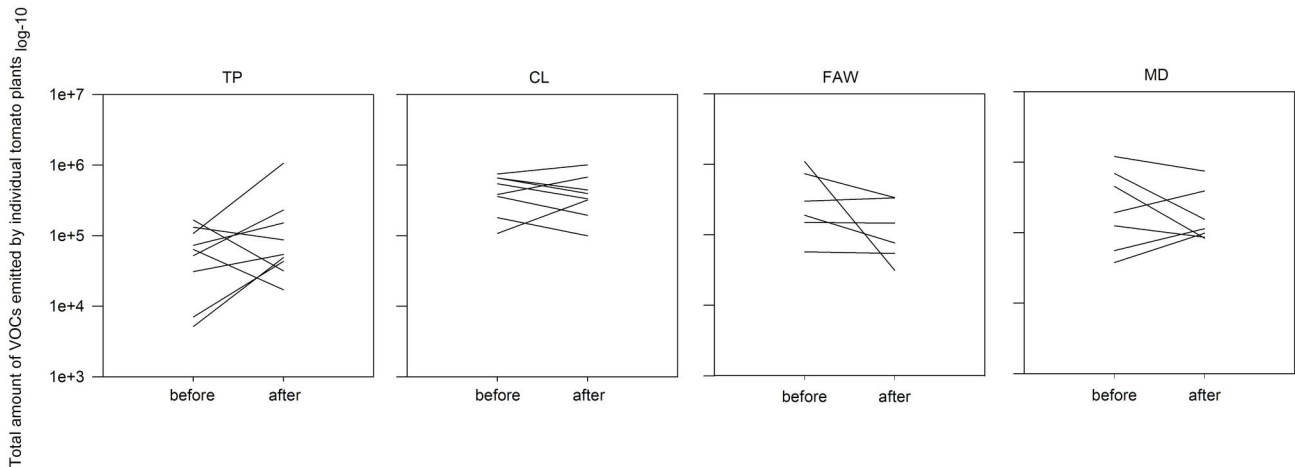
## Introduction

The presence of insects in a field can be affected by plant emission of volatile organic compounds (VOCs) that constitute plant odor [1]. The VOC blend changes in response to herbivore attack [2,3] thus, plant emissions are considered plastic [4]. The phenotypic variation in the VOC emission among individuals in response to insects may be important in plant interactions with the third trophic level [5,6] because insect herbivory may signal the presence of the herbivore to their insect predators [7]; thus herbivore induced VOC emissions have been considered adaptive for plants. In addition, herbivore-induced VOCs may activate a systemic resistance in the nearby leaves priming the plant for a possible future attack [8].

Previous comparative studies on the chemical changes induced by different herbivores have found herbivore-specific blends in crop species such as tomatoes [9–12]. These studies

compared the effect of damage on the total VOC amount, and in blend composition between damaged and non-damaged groups of plants. Composition is determined by the absolute and relative VOC concentration in the blend, indicating which VOCs dominate and contribute to plant odor, respectively [13,14]. However, mean comparisons between groups of damaged and non-damaged plants do not take into account that the constitutive and induced emissions can vary among individuals. In other words, the variation in the VOC emission among individuals is only observed as the variance around the mean.

The most common method to measure herbivore-specific responses in plants is the mean and variance comparison of a control group (non-damaged individuals) and groups of plants subjected to herbivory. This approach is perfectly correct to detect differences among treatments but fails to detect the phenotypic variation in VOC emission of individuals due to constitutive variation. Changes in the VOC emission may be



**Figure 1. Total concentration of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato individuals (mean of peak areas of all compounds in the blend) before and after damage by Tomato psyllid nymphs (TP), Cabbage looper caterpillars (CL), Fall Armyworm caterpillars (FAW), and Mechanical damage (MD). Each line represents a plant within each treatment.**

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.g001

undetected in the first stages of insect infestation when herbivores can feed intermittently. Continuous damage during insect feeding can maximize VOC emissions [15]. Thus, changes in the VOC emission in response to moderate damage are at risk of not being detected because insects may walk, feed on plant tissue and then leave [16]. However, little changes in the VOC emission could start behavioral responses in the biotic environment [8].

It bears consideration that despite the above-cited studies demonstrating herbivore-specific VOC blends, research has still yielded little information as to how different herbivores affect the phenotypic variation among tomato individuals within a group. Plants can differentially respond to herbivore identity in terms of the individual VOC concentration and at the whole VOC blend level. Thus, an alternative approach is called for in order to expand the understanding of the VOC variation induced by specific herbivores. Hence, a measure of the phenotypic variation among individuals damaged by the same agent is included in the analysis.

Detection of individual plant changes in the VOC emission to moderate herbivory is relevant to understand plastic responses to different intensities of damage. The measurement of changes in the VOC phenotypic plasticity based on ratios (i.e. induced VOC emission minus the constitutive emission/constitutive emission [17]) would reflect the fold-change in concentration induced by different herbivores and control for phenotypic variation. Based on the fold-change in concentration and on size and shape analysis of the absolute and relative concentration [13,14], the uniformity in odor among damaged individuals can be analyzed by calculating the phenotypic distances among individuals. The uniformity in odor reflects the similarity in the VOC emission among individuals subjected the same type of damage (artificial or biotic) which has to be analyzed not only by changes in single compounds but at the whole blend level. By producing homogeneous

changes and low values of phenotypic distances in the VOC concentration among individuals, the odor of damaged plants would be uniform because all plants would transmit the same odor signal. In contrast, heterogeneous changes and high phenotypic distances among individuals would produce different odors within the group.

In this study, we analyzed the absolute and relative concentration of VOCs emitted by individual tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Castlemart) before and after damage by either one of three insect herbivores *Bactericera cockerelli* (Hemiptera; Psyllidae), *Trichoplusia ni* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae), or by mechanical damage. Changes in the VOC emission among individuals were analyzed using two approaches: (1) the fold-change in concentration from constitutive to induced state based on the VOC collection of the same individual before and after damage, and (2) size and shape analysis, which allows the study of the variation of the absolute and relative concentration among treatments. We found herbivore-specific VOC emissions and herbivore-specific uniformities in odor among tomato individuals.

## Materials and Methods

### Plants

Castlemart tomato seeds were donated by Dr. John Délano-Frier from CINESTAV-IPN. Plants were grown in peat moss COSMOPEAT (Canadian sphagnum peat moss) under greenhouse conditions (28°C±4 and 60% relative humidity during spring and summer). Once germinated, plants were transplanted to 256 mL plastic pots with the same substrate and watered daily without fertilization. We used plants with three to four fully extended leaves (about 30 days old) for experiments.

## Insects

Nymphs from 4th and 5th instars of tomato psyllid nymphs (TP) were obtained from the UNAM chemical ecology laboratory and reared on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and chili (*Capsicum annum* L.) plants under laboratory conditions (16 h light/8 h dark photoperiod at 25±3°C). Cabbage looper (CL) and Fall Armyworm (FAW) caterpillars were obtained from INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias). CL caterpillars were reared on an artificial diet [18] for their complete life cycle. FAW caterpillars were reared with this diet until the third instar and then fed with castor bean leaves (*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae)). In our laboratory, caterpillars were only fed with castor bean leaves since hatching.

## Induction treatments

Four induction treatments were performed, with the three insect species mentioned above and with mechanical damage. The VOCs of plants were collected before and after treatments. For the TP damage treatment, six individuals from 4th and 5th instars were placed on one leaflet and were allowed to feed continuously for five days (n=9 plants). For the CL and FAW damage treatments (n=8 and 6 plants, respectively), one 3rd instar individual was placed on a leaflet and allowed to feed continuously for four hours. Mechanical damage (MD) treatment (n=8 plants) consisted of cutting the longitudinal half of one leaflet using scissors. For TP-damaged plants, VOCs were collected at day one and five because induced responses to phloem-sucking insects have been reported to start after this period [19]. Nymphs were feeding on the leaflet during VOC collection. For CL, FAW and MD treatments, VOCs were collected on day one and two after 24 hours of the damage onset. Caterpillars were removed from plants before collection. During herbivore feeding, plants were inside plastic pots covered with a fine mesh cloth under laboratory conditions, 25±3°C, 16 h light/8 h dark photoperiod with incandescent light (400-500 lumens).

## Volatile collection set up

A 2.5 L glass-collection apparatus similar to the one used by Sánchez-Hernández et al. [20] was used for VOC collection. The one used in this work was larger. This apparatus consists of two half-glass cylindrical cells, the base and the upper cell. In front of the upper glass cell of the apparatus, there is a tube with an aluminum cap and a rubber septum to allow the insertion of a solid phase microextraction (SPME) fiber (50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane, Supelco, Bellefonte, USA). In the upper glass cell there were two air conducts.

The plant was placed on the base part. To exclude the aerial part of the plant from the pot a split Teflon® disk was placed around the stem. Additionally, the space that was left around the stem was covered with Teflon tape. Then, the upper part was placed over the aerial part of the plant with the two air conducts open to vent possible VOC bursts due to manipulation. Plants were left under these conditions for an hour before VOC collection to let the natural airflow to stabilize

them. In addition, this one-hour period was also considered a period of VOC pre-concentration for SPME collection. At the end of this period, the air conducts of the upper glass chamber were closed with Teflon tape to create a static headspace. The base and upper parts of the collection apparatus were secured with a pair of 40 mm paper clips. The exposed SPME fibers were introduced in the insertion tube and exposed for 30 min. The same fiber was used to collect the VOC emission of the same plant before and after damage.

## Volatile identification

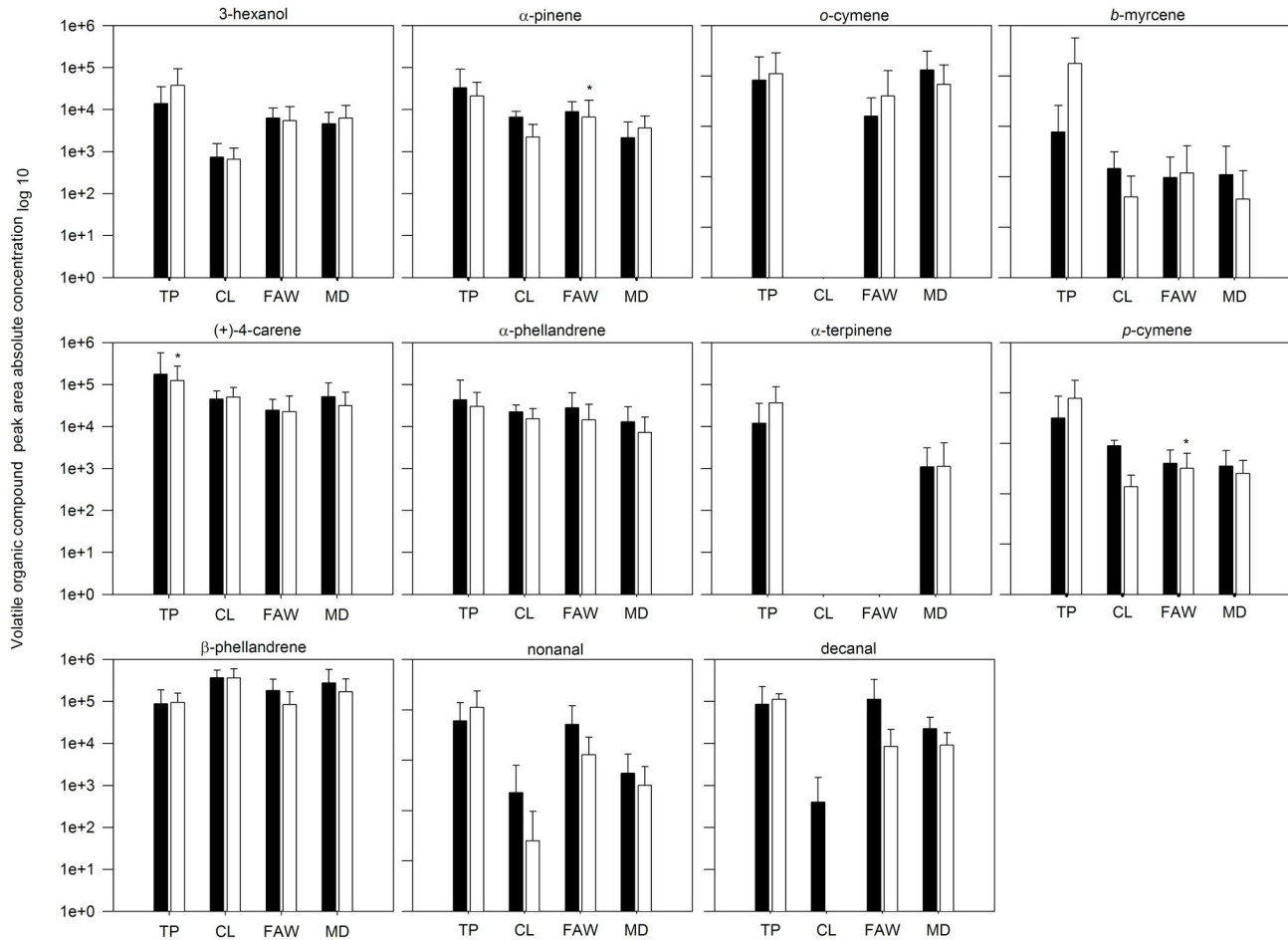
Fibers were injected into a gas chromatograph (GC, Agilent 6890) (Capillary column Equity-1 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, polydimethylsiloxane, Supelco, USA) coupled with a mass spectrometer (MS) model Agilent 5973. The SPME fiber was placed in the injector at 180°C, in splitless mode (5 min) followed by split mode (5 min). GC oven temperatures started at 42°C, which was held for 3 minutes and then raised 1.5 °C/min until they reached 55°C, then raised 3 °C/min until they reached 120°C, which was held for 5 minutes (modified from [20]). The GC-MS transfer line was set at 280°C and the ionization source at 70 eV. Compounds were identified by comparing their spectra with those of the US National Institute of Standards and Technology 98 library and calculating Kovats indexes (KI) by comparing VOC retention times with the retention time of a C8-C20 series of n-alkanes (obtained under the same conditions used for plant VOCs). Standards for β-myrcene and nonanal (Aldrich), and α-pinene, α-phellandrene, and decanal (Sigma) were injected for further identification confirmation. The absolute concentration of individual VOCs was calculated from their peak areas. Total VOC emissions were estimated by the sum of the absolute concentration of each compound in the blend. Then, the relative concentration of each compound was calculated from the sum of the peak areas of all compounds in the blend.

## Statistical analysis

Based on peak abundances of each compounds we determined the absolute concentration of VOCs. Then, the relative concentration was determined as the proportion of each compound in the blend. To analyze the effect of different damage treatments over the VOC emission composition (the absolute and relative VOC concentration) of tomato individuals, we used two approaches: the fold-change in concentration from the constitutive to the induced state and size and shape analysis.

The fold-change in concentration ( $\Delta$ ) is a ratio based on the concentration of VOCs before and after damage. We calculated this ratio using the formula  $\Delta = (T_2 - T_1)/T_1$ , where  $T_1$  is the VOC concentration at time one (i.e., before damage) and  $T_2$  is the VOC concentration at time two (i.e., after damage) [17]. Using the fold-change in concentration we compared chemical differences with respect to each plant's own constitutive emission.

To perform size and shape analysis, the peak area from VOCs detected in the blend of the 30 plants before damage was pooled to be analyzed as the control group. Size and shape analysis allowed us to study differences in the absolute



**Figure 2. Absolute concentration (mean  $\pm$  SD of peak area) of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato plants before (black bars) and after (white bars) damage treatments.** Footnote of Figure 2. Peak absolute concentration represents the abundance of a single volatile in the blend. Damage treatments: TP, tomato psyllids (n=9); CL, Cabbage looper caterpillars (n=8); FAW, Fall armyworm caterpillars (n=6); MD, Mechanical damage (n=7). Asterisks indicate significant differences in the absolute concentration of volatile emissions before and after damage (paired-t test or Wilcoxon test at  $P < 0.05$ ).

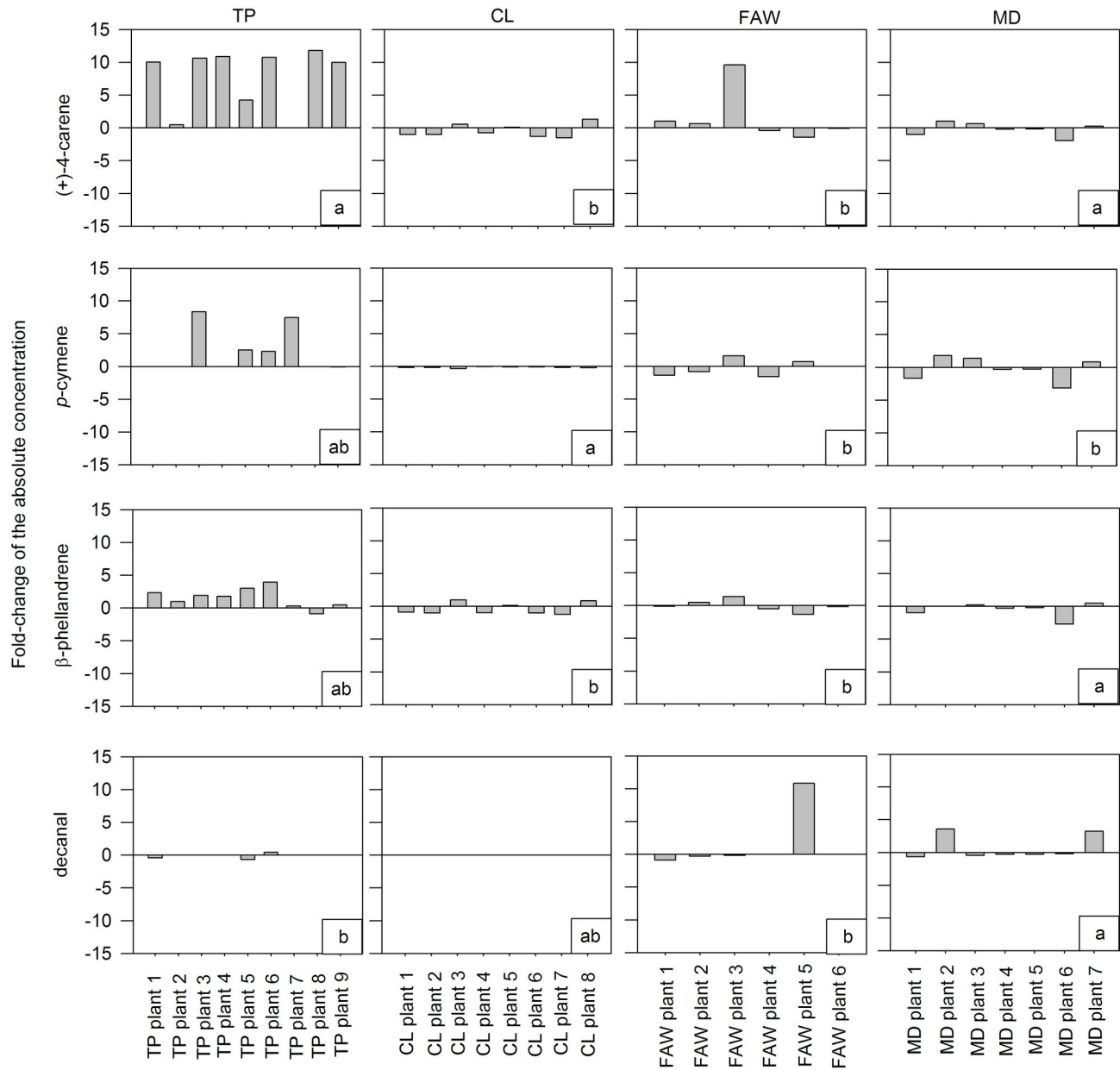
doi: 10.1371/journal.pone.0077199.g002

and relative VOC concentration of individual secondary metabolites, respectively [13,14]. The variable size was calculated by the  $\log_e+1$  transformation of VOCs peak areas. The subtraction of the geometric mean from size values produced the shape variable. The geometric mean was calculated from the  $\log_e+1$  transformation of all VOCs for each plant treatment. Hexanal was excluded from the size analysis because it showed little variation among tomato genotypes and high negative correlation to nonanal ( $r=0.59$ ,  $P < 0.001$ ). The rank of the matrix of the shape variable is one less than that of size matrix [13], thus we excluded variable  $\log_e+1(\alpha\text{-terpinene}) - \log_e(\text{geometric mean})$  from the analysis.  $\alpha\text{-terpinene}$  showed little variation and its coefficient value in the linear discriminants did not significantly contribute to the discrimination of damaged plants.

Fold-change in concentration and size-and-shape matrices were analyzed by a multivariate analysis of variance

(MANOVA). For the fold-change MANOVA, we compared ratio values of individual compounds using damaged treatments as categorical variables. For size and shape MANOVA, data from non-damaged (ND) and damaged treatments (TP, FAW, CL, and MD) were used as categorical variables. MANOVA analyses were followed by a one-way analysis of variance (ANOVA) if we detected a  $P$  value lower than 0.05 for the absolute or relative concentration. In addition, we conducted a paired t-test using log-transformed data to detect changes in the absolute and relative concentration of VOCs before and after damage treatments.

To analyze the uniformity in odor among individuals within each damage treatment, we performed a linear discriminant analysis. Then we calculated the phenotypic distances (Euclidian distances) among individuals from coordinates derived from each linear discriminant (LD). The ordination LDs obtained from both analyses that accounted for at least 85% of



**Figure 3. Volatile organic compounds absolute concentration fold-change from the constitutive to the induced state emitted by Castlemart tomato plants under different damage treatments.** Footnote of Figure 3. The absolute concentration is the abundance of single volatiles in the blend calculated from peak areas in chromatograms. Damage treatments: TP, tomato psyllids; CL, Cabbage looper caterpillar; FAW, Fall armyworm caterpillars; MD, Mechanical damage. Bars represent the fold-change of individual tomato plants within treatments. Spaces without bars indicate lack of change or a fold-changes smaller than 1 (see Table S1).

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.g003

the variation was used to calculate the phenotypic distances among individuals. The phenotypic distances that resulted from the constitutive and induced size-and-shape analysis were used to analyze differences in the blend of individuals within and among treatments, while those that resulted from the fold-change analysis were used to analyze variation of plastic

responses to each treatment. To compare the mean phenotypic distances among treatments we used an ANOVA or a Kruskal-Wallis test. R software version 2.14.1 was used to perform all statistical analyses.

**Table 1.** MANOVA and Linear Discriminant Analysis (LDA) for fold-change in concentration from constitutive to induced volatile organic compounds (VOCs) emission (A) and size and shape VOC concentration analysis (B) for Castlemart tomato plants under different damage treatments.

VOCs	Concentration	MANOVA				LDA					
		d.f.	Pillai	F	P	Eigenvalues			Cumulative variation		
						LD1	LD2	LD3	LD1	LD2	LD3
A. Fold-change	Absolute	3	1.6837	2.093	<0.001	5.79	4.28	1.52	40	72	89
	Residuals	26									
	Relative	3	2.1319	4.0186	<0.001	7.48	5.36	2.92	60	91	
	Residuals	26									
B. Size and Shape	Absolute	4	1.3171	2.1423	<0.001	3.44	3.06	2.25	40	72	89
	Residuals	55									
	Relative	4	1.2184	2.1463	<0.001	3.26	3.01	1.88	40	74	85
	Residuals	55									

Damage treatments: TP, Tomato psyllids; CL, Cabbage looper caterpillars; FAW, Fall Armyworm caterpillars; MD, Mechanical damage.

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.t001

**Table 2.** Mean absolute concentrations (arbitrary peak area/30min ± SD) of volatile organic compounds emitted by non-damaged and damaged Castlemart tomato plants.

VOCs	ND	TP	CL	FAW	MD
3-hexanol	6.07±13.28 <sub>a</sub>	2.39±3.11 <sub>ab</sub>	0.35±0.32 <sub>a</sub>	0.09±0.13 <sub>a</sub>	21.81±25.78 <sub>b</sub>
α-pinene	1.90±3.86	0.62±0.46	1.18±1.15	0.48±0.56	8.96±10.55
o-cymene	9.62±28.80 <sub>a</sub>	0.27±0.55 <sub>b</sub>	§	0.03±0.05 <sub>a</sub>	16.66±15.73 <sub>b</sub>
β-myrcene	0.47±2.45	§	0.20±0.30	0.04±0.04	0.58±1.55
(+)-4-carene	44.52±123.90 <sub>a</sub>	3.44±4.41 <sub>ab</sub>	26.39±18.44 <sub>ab</sub>	0.21±0.21 <sub>a</sub>	83.87±57.74 <sub>b</sub>
α-phellandrene	10.54±28.85	0.84±1.11	7.95±6.02	0.53±0.21	16.75±15.51
α-terpinene	1.24±4.96	§	§	0.01±0.03	1.81±4.79
p-cymene	3.53±8.93 <sub>a</sub>	0.25±0.36 <sub>ab</sub>	0.71±0.49 <sub>ab</sub>	0.28±0.16 <sub>a</sub>	7.63±3.95 <sub>b</sub>
β-phellandrene	265.79±675.77 <sub>b</sub>	23.33±24.06 <sub>b</sub>	191.67±125.67 <sub>a</sub>	2.63±1.84 <sub>b</sub>	465.07±284.68 <sub>a</sub>
nonanal	9.60±14.84 <sub>a</sub>	2.24±5.03 <sub>ab</sub>	0.17±0.49 <sub>b</sub>	0.81±0.46 <sub>ab</sub>	6.34±6.46 <sub>ab</sub>
decanal	34.38±68.03 <sub>a</sub>	2.56±5.60 <sub>ab</sub>	§	0.72±0.28 <sub>ab</sub>	27.07±14.68 <sub>b</sub>

Damage agents: TP, Tomato psyllid nymphs (n=9); CL, Cabbage looper caterpillars (n=8); FAW, Fall Armyworm caterpillars (n=6); MD, Mechanical damage (n=7); ND, Non-damaged plants (data of 30 individuals assigned to damage treatments); § VOCs not detected. Different letters indicate significant differences among damaged plants (ANOVA or Kruskal Wallis tests at  $P < 0.05$ ).

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.t002

## Results

We measured the VOC emission of the same individuals before and after damage. Individuals within each damage treatment differentially changed their total VOCs amount: some individuals increased their emission after induction while others decreased it or maintained it compared to its own constitutive emission (Figure 1). Only CL- and FAW-damaged plants significantly changed their total mean VOC amount (Table S1).

### Herbivore and mechanical damage induced differential fold-changes in the absolute concentration of individual VOCs

Eleven VOCs were detected in the constitutive blend of Castlemart tomato plants: 3-hexanol (KI=780), α-pinene (KI=924), o-cymene (KI=960), β-myrcene (KI=983), (+)-4-

carene (KI=990), α-phellandrene (KI=993), α-terpinene (KI=1006), p-cymene (KI=1014), β-phellandrene (KI=1018), nonanal (KI=1095), and decanal (KI=1195). We did not detect the presence of o-cymene and α-terpinene in the blend of plants assigned to CL damage or the presence of α-terpinene in the blend of plants assigned to FAW damage (Figure 2, VOC emission before damage).

After damage, the mean absolute concentration of some VOCs significantly changed according to each damage treatment (Figure 2, VOC emission after damage). Fold-changes of the absolute concentration of VOCs were used to compare the induced response of Castlemart plants to different damage treatments. We found a significant effect of damage treatments over the fold-change of the absolute concentration (Table 1, A). The fold-change in the absolute concentration of (+)-4-carene, p-cymene, β-phellandrene, and decanal was significantly different among treatments (Figure 3). For

**Table 3.** Relative concentration (mean  $\pm$  SD percentage) of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato plants before and after different damage treatments.

VOCs	TP		CL		FAW		MD	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
3-hexanol	6.54 $\pm$ 9.98	11.63 $\pm$ 18.33	0.13 $\pm$ 0.14	0.20 $\pm$ 0.20	2.44 $\pm$ 2.48	1.75 $\pm$ 2.36	3.20 $\pm$ 3.29	4.94 $\pm$ 6.77
$\alpha$ -pinene	1.24 $\pm$ 2.61	1.86 $\pm$ 0.90	1.45 $\pm$ 0.41	<b>0.41<math>\pm</math>0.22</b>	2.79 $\pm$ 1.94	9.36 $\pm$ 12.11	0.41 $\pm$ 0.27	1.71 $\pm$ 2.64
o-cymene	0.03 $\pm$ 0.10	<b>0.82<math>\pm</math>1.01</b>	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.41 $\pm$ 0.49	1.03 $\pm$ 2.24	2.17 $\pm$ 1.46	2.10 $\pm$ 1.06
$\beta$ -myrcene	0.00 $\pm$ 0.00	0.12 $\pm$ 0.35	0.25 $\pm$ 0.28	0.06 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.39	0.75 $\pm$ 0.88	0.09 $\pm$ 0.24	0.05 $\pm$ 0.13
(+)-4-carene	0.77 $\pm$ 1.76	<b>7.64<math>\pm</math>5.12</b>	8.68 $\pm$ 2.52	<b>11.02<math>\pm</math>1.69</b>	6.47 $\pm$ 4.36	2.90 $\pm$ 2.32	10.85 $\pm$ 3.05	12.00 $\pm$ 2.12
$\alpha$ -phellandrene	0.03 $\pm$ 0.09	<b>2.11<math>\pm</math>1.30</b>	0.00 $\pm$ 0.00	<b>3.24<math>\pm</math>0.56</b>	5.15 $\pm$ 2.02	9.58 $\pm$ 2.28	2.43 $\pm$ 0.97	2.35 $\pm$ 0.99
$\alpha$ -terpinene	0.00 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.18	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.25	0.18 $\pm$ 0.32	0.15 $\pm$ 0.40
<i>p</i> -cymene	0.67 $\pm$ 1.11	<b>0.64<math>\pm</math>0.68</b>	2.05 $\pm$ 0.67	<b>0.35<math>\pm</math>0.18</b>	1.26 $\pm$ 0.75	<b>5.32<math>\pm</math>2.91</b>	0.91 $\pm$ 0.27	1.34 $\pm$ 0.84
$\beta$ -phellandrene	37.84 $\pm$ 36.23	63.00 $\pm$ 21.86	71.59 $\pm$ 14.49	<b>84.63<math>\pm</math>2.52</b>	50.69 $\pm$ 29.71	40.28 $\pm$ 17.06	69.43 $\pm$ 6.26	69.95 $\pm$ 10.14
nonanal	19.10 $\pm$ 14.72	5.95 $\pm$ 10.65	0.40 $\pm$ 0.85	0.06 $\pm$ 0.18	12.86 $\pm$ 13.98	14.68 $\pm$ 7.01	1.64 $\pm$ 1.47	1.00 $\pm$ 0.94
decanal	33.77 $\pm$ 30.35	<b>6.72<math>\pm</math>12.23</b>	0.16 $\pm$ 0.44	0.00 $\pm$ 0.00	17.71 $\pm$ 20.90	14.20 $\pm$ 7.65	8.46 $\pm$ 7.43	4.41 $\pm$ 1.19

The relative concentration represents the percentage of each compound in a blend relative to the sum of the absolute concentration of all compounds in that blend. Damage treatments: TP, tomato psyllids (n=9); CL, Cabbage looper caterpillars (n=8); FAW, Fall armyworm caterpillars (n=6); MD, Mechanical damage (n=7). Bold numbers indicate significant differences in the mean relative emission compared after damage (paired-*t* test or Wilcoxon test at  $P < 0.05$ ).

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.t003

example, in the blend of TP-damaged plants, (+)-4-carene increased their concentration around ten times compared to individuals under other treatments. Also the fold-change in concentration of *p*-cymene and  $\beta$ -phellandrene in the blend of TP-damaged plants was greater compared to the other treatments. Size (Table 2) and shape (Table S3) analysis showed a different pattern of variation among damaged plants and non-damaged individuals.

The relative concentration of individual VOCs resulted in significant differences before and after damage (paired *t* or Wilcoxon test at  $P < 0.05$ ) mainly in the blend of TP- and CL-damaged plants (Table 3). Changes in the relative concentration varied among individuals within treatments before and after VOC collections. The blend of tomato plants before and after TP feeding was variable in terms of the percentage of a given VOC in the blend (e.g.  $\beta$ -phellandrene, nonanal, and decanal in the blend of TP-damaged plants, Figure 4).

### Herbivore and mechanical damage induced different uniformity in odor among individuals

We calculated the variation at the whole blend level among individuals within treatments based on LDA of the fold-change in concentration and size and shape analysis (Table 1, B LDA). We found differences in the mean values of Euclidian distances among individuals calculated from LD coefficients in fold-change (Figure 5) and size and shape (Figure 6) analyses (Table S4). The blend of CL-damaged plants changed their absolute and relative concentration homogeneously; they had the lowest mean Euclidian distances among individuals compared to other treatments. In terms of the fold-change of the relative concentration, the variation among individuals was similar in damage treatments that removed plant tissue (Table 4, A).

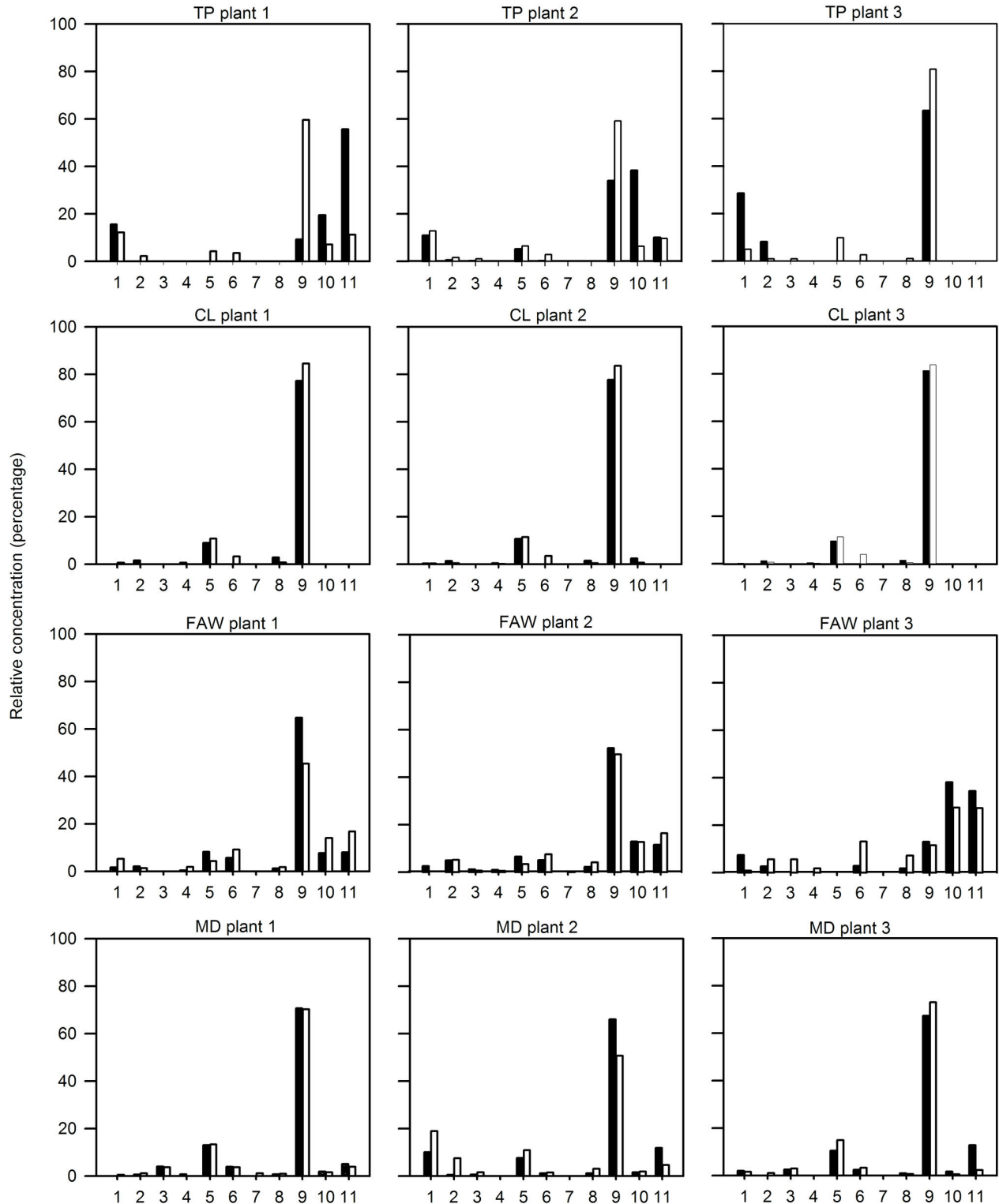
Individuals were plotted before and after damage according to each treatment using the LDA coefficients that resulted from size and shape analysis (Figure 6). The phenotypic distances calculated from LD coordinates of size and shape analysis showed that CL-damaged individuals had the lowest phenotypic distances among them in the absolute and relative concentration compared to non-damaged individuals. In contrast, TP-damaged plants induced the highest variation among individuals compared to other treatments (Table 4, B).

## Discussion

This study broadens current knowledge of herbivore-specific plant responses. Tomato individuals differentially changed their VOC composition under each treatment in line with herbivore-specific responses previously found in tomato [9–12]. However, we demonstrate that plants differentially respond to herbivore or mechanical damage modifying the fold-change in concentration of specific VOCs in the blend and the uniformity of the VOC emission among individual plants. Euclidian distances calculated from linear discriminant analysis showed that this uniformity in odor is the result of homogeneous or heterogeneous changes in the VOC concentration.

### Herbivore-specific blends and uniformity in odor among damaged individuals

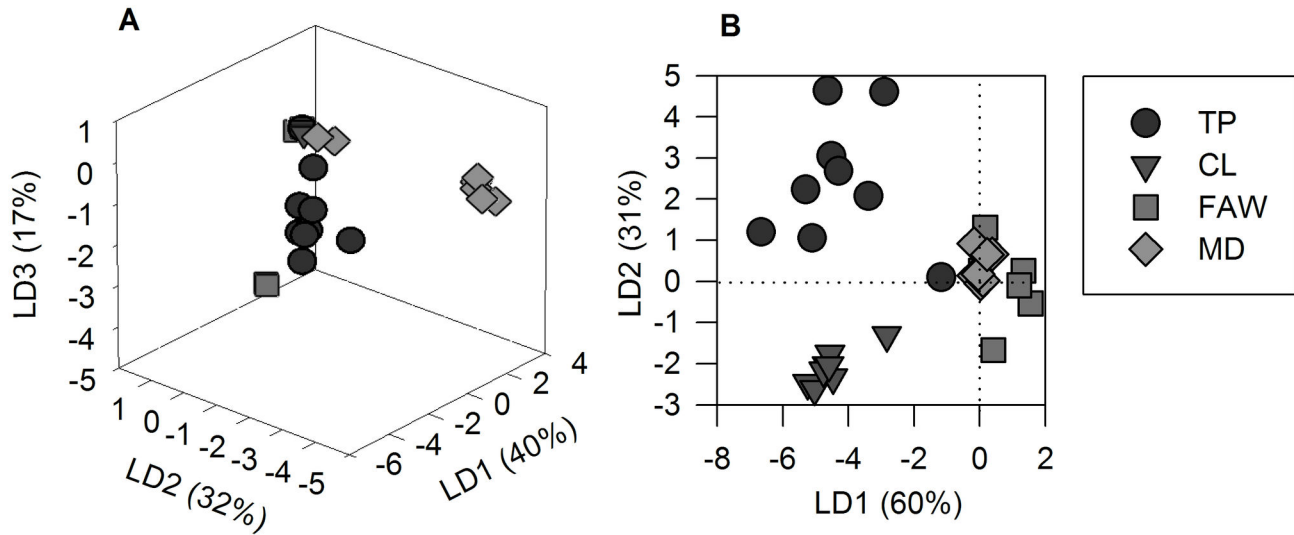
Variation in the components of the constitutive blend of VOCs in Castlemart plants was not unexpected, as genetically based variation in other secondary metabolites has previously been reported [21,22]. After being subjected to different damage treatments, individuals differentially changed the total mean VOC concentration and that one of individual VOCs in their blend. In some cases, the fold-change of some VOCs increased more than ten times relative to its own constitutive emission, suggesting an intense response of plants to that type



**Figure 4. Volatile organic compound blend profile (relative concentration) emitted by three selected tomato individuals before (black bars) and after (white bars) different damage treatments.** Footnote of Figure 4. Bars represent the concentration percent of each compound in a blend relative to the sum of the absolute concentration of all compounds in that blend. VOCs: 3-hexanol (1),  $\alpha$ -pinene (2), *o*-cymene (3),  $\beta$ -myrcene (4), (+)-4-carene (5),  $\alpha$ -phellandrene (6),  $\alpha$ -terpinene (7), *p*-cymene (8),  $\beta$ -phellandrene (9), nonanal (10), and decanal (11)..

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.g004





**Figure 5.** Linear discriminant plots of the fold-change from the constitutive to the induced emission of the absolute (A) and relative (B) volatile organic compounds concentration emitted by individual tomato plants damaged by different agents. Footnote of Figure 5. Each geometrical figure represents an individual. Linear discriminant functions account for 89% of the variability in the absolute concentration analysis and 91% in the relative concentration analysis. Fold-change represents the transition of individuals from a constitutive to an induced state under each damage treatment. Damage treatments: TP, Tomato psyllid nymphs; CL, Cabbage looper caterpillars; FAW, Fall Armyworm caterpillars; MD, Mechanical damage.

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.g005

**Table 4.** Similitude (Euclidian distance mean  $\pm$  SD) among individuals subjected to the same damage treatment according to fold-change (A) and size and shape analysis (B) of volatile organic compounds emitted by Castlemart tomato plants.

Analysis	Concentration	ND <sup>†</sup>	TP	CL	FAW	MD
A. Fold-change	Absolute		2.04 $\pm$ 1.45 <sub>b</sub>	0.14 $\pm$ 0.16 <sub>a</sub>	2.36 $\pm$ 2.20 <sub>b</sub>	2.29 $\pm$ 1.85 <sub>b</sub>
	Relative		2.80 $\pm$ 1.39 <sub>a</sub>	0.92 $\pm$ 0.77 <sub>b</sub>	1.54 $\pm$ 0.68 <sub>b</sub>	0.54 $\pm$ 0.27 <sub>b</sub>
B. Size and Shape	Absolute	2.37 $\pm$ 0.86 <sub>b</sub>	2.44 $\pm$ 0.78 <sub>b</sub>	1.32 $\pm$ 0.60 <sub>a</sub>	2.38 $\pm$ 1.05 <sub>b</sub>	2.36 $\pm$ 1.41 <sub>b</sub>
	Relative	2.44 $\pm$ 0.91 <sub>b</sub>	2.48 $\pm$ 0.85 <sub>b</sub>	1.19 $\pm$ 0.53 <sub>a</sub>	2.50 $\pm$ 1.02 <sub>b</sub>	1.87 $\pm$ 1.33 <sub>ab</sub>

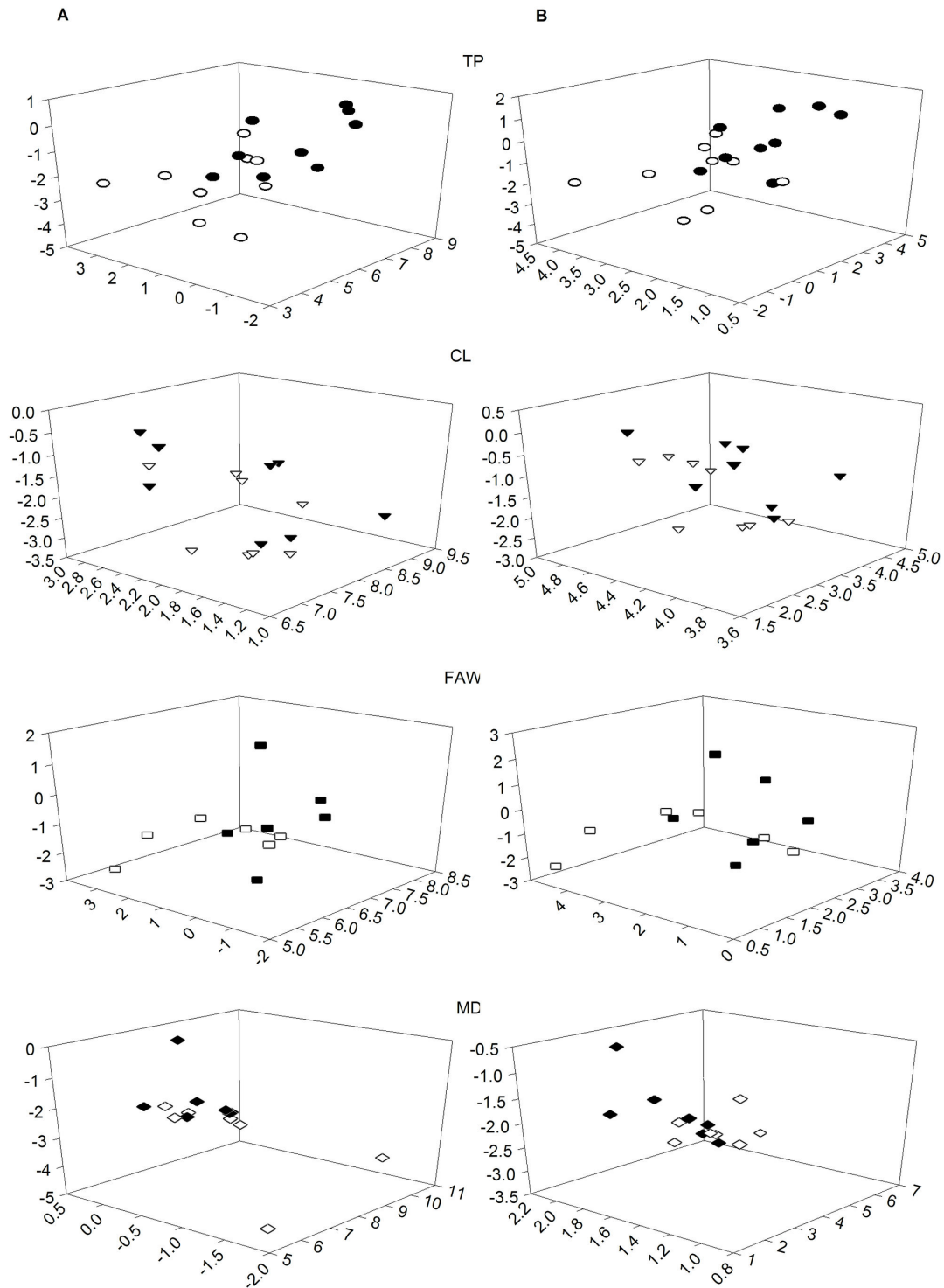
Euclidian distances were calculated from coordinates of linear discriminate analysis of the volatile organic compounds. Damage treatments: TP, Tomato psyllid nymphs; CL, Cabbage looper caterpillar; FAW, Fall Armyworm caterpillar; MD, Mechanical damage. Different letters indicate significant differences among treatments within the same row. <sup>†</sup> Data from 30 tomato individuals before damage was pooled to calculate the phenotypic distances of the control group in size and shape analysis. Different letters indicate significant differences among treatments.

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.t004

of damage (e.g. (+)-4-carene and  $\alpha$ -phellandrene in the blend of TP-damaged plants). The fact that not all VOCs in the blend changed with the same intensity may indicate that plants respond to the genetic and biochemical changes that herbivores induce (i.e. up- or down-regulation of genes [23] associated to herbivore- or damage-associated molecular patterns [24]). In addition, it is possible that the constitutive concentration plays a role in regulating how many times the concentration of a single VOC can change. If the induced absolute concentration is negatively correlated to the constitutive concentration then there would be a trade-off [6] associated to herbivore-induced responses. To our knowledge there is no information about trade-offs induced by herbivore identity. In addition, insect density and duration of herbivory or

mechanical damage can also increase the concentration of VOCs in the blend [14].

Miresmailli et al. [25] showed that plants with moderate herbivory (one larvae per plant) maintained the concentration of some VOCs lower than that of control plants; then, the concentration of VOCs increased with larvae density. We found that the absolute concentration of  $\beta$ -phellandrene in the blend of CL-damaged plants was under that of non-damaged individuals (Table 3). Before and after comparison showed that the concentration of  $\beta$ -phellandrene increased the most after CL feeding, significantly changing its concentration. This indicates that damage caused by moderate herbivory or a single mechanical damage event was enough to cause specific changes in the absolute concentration of some VOCs that also



**Figure 6. Linear discriminant analysis of the absolute (A) and relative (B) concentration of non-damaged (black points) and damaged (white points) Castlemart tomato individuals.** Footnote of Figure 5. Data of non-damaged individuals (30 plants assigned to each treatment) was pooled for comparison with the induced VOC concentration by each treatment. For visual purposes, we extracted the coordinates of individuals before and after each type of damage. Thus, each plot represents the discrimination of damaged individuals against themselves before and after damage. The first three linear discriminant of the absolute and relative VOC concentration accounted for at least 90% of the variation. Damage treatments: TP, Tomato psyllid nymphs; CL, Cabbage looper caterpillars; FAW, Fall Armyworm caterpillars; MD, mechanical damage.

doi: 10.1371/journal.pone.0077199.g006

modified the blend composition (i.e. the relative concentration of VOCs). The lack of significant changes in the absolute and relative VOC concentration in the blend of mechanically-damaged plants may be explained by a unique event of damage that was not long enough to induce changes in the blend. This is in line with other studies showing that only continuous mechanical damage can induce herbivore-like VOC emissions [15]. Although we did not measure plant tissue area removed by the studied insects (which would have been incomparable with TP feeding), we demonstrate that early infestation events can induce changes in odor. In addition, our results show that herbivores differentially changed the uniformity of herbivore-induced VOCs.

The uniformity in odor analyzed in terms of the absolute and relative VOC concentration allows comparing the phenotypic variation induced by herbivores or mechanical damage. Uniform changes in terms of the absolute concentration indicate that individuals within a treatment emit VOCs in the same intensity. In contrast, uniformity in the relative concentration indicates that individuals have similar odors. From size and shape analyzes, we showed that CL induced a uniform VOC emission profile among individuals (i.e. lower Euclidian distance values) compared to individuals under other damage treatments and non-damaged individuals. The same uniformity pattern was found from fold-change in concentration analysis indicating that this uniformity is the result of homogeneous changes in concentration. However, individual plants change their blends' relative concentration in a similar manner in response to tissue damage agents. In the case of CL-damaged individuals, the fold-change in the absolute and relative VOC concentration was similar producing a uniform induced odor. This pattern indicates that the uniformity in VOC emissions among individuals within a group is also herbivore-specific. Additionally, responses to tissue removal suggest the induction of a regulation process resulting in uniform odors among individuals.

### Ecological implications of herbivore-specific changes in concentration and uniformity in odor

In the first stages of infestation when herbivory can be moderate or intermittent, plants respond to insect feeding or walking [16]. We demonstrated that moderate herbivory induced herbivore-specific VOC blends and affects the uniformity in odor among individuals. In the ecological context, the emission of herbivore-induced VOCs regulates plant-plant interaction [8] and plant-carnivore insects' interactions [26]. In plant-plant interactions, green-leaf volatiles (GLV) change their concentration in response to mechanical damage which can be a good indicator for future attack priming [1,27]. According to our results, the fold-change in concentration of the GLV 3-hexanol was not significantly different neither within (before and after damage) nor among treatments (in the blends of plants subjected to different treatments). In contrast, the concentration of some monoterpenes changed in the blends emitted by plants within and among treatments (e.g.  $\alpha$ -phellandrene). Interestingly, CL and TP feeding induced several changes in the VOC blends of tomato individuals while FAW (at least for the fold-change in the absolute concentration)

and mechanical damage did not induce any significant changes. It is possible that moderate herbivory applied to tomato plants under FAW treatment may have not been sufficient to induce more significant changes in the concentration of 3-hexanol or in that of other VOCs. As cited above, Miresmailli et al. [25] showed that the concentration can change with increasing insect density.

In terms of plant-carnivore insects' interaction, changes in the absolute concentration of single VOCs in the blend may induce behavioral responses in carnivore insects, independently of the presence or change of other volatiles in the blend (e.g. (Z)-jasmone [28]). However, changes in the relative concentration modify the entire blend; in this context, the uniformity in odor among individuals became relevant for carnivore insects that use the whole blend of herbivore-induced VOCs [29]. Thus, the uniformity of the VOC emission among individuals attacked by the same herbivore may determine the interaction with insects that use these compounds to find their hosts [16,30,31].

In conclusion, by including individual constitutive variation, we found that herbivores induce specific changes in the concentration of VOCs in the blend of damaged tomato individuals modifying the uniformity in odor among them. Thus, herbivores induce different levels of phenotypic variation that may affect plant-plant or plant-carnivore insects' interactions. Further investigation will focus on testing the effects of the uniformity in odor on plant-biotic interactions.

### Supporting Information

**Table S1. Mean total amount ( $\pm$  SD of arbitrary units of peak area) before and after different damage treatments.**  
(DOCX)

**Table S2. Absolute concentration fold-change from the constitutive to the induced volatile organic compound emission of each plant plotted in Figure 3.**  
(DOCX)

**Table S3. Mean relative concentrations (percentage  $\pm$  SD) of volatile organic compounds emitted by non-damaged and damaged Castlemart tomato plants.**  
(DOCX)

**Table S4. Coefficients of linear discriminants of fold-change and size and shape concentration linear discriminant analysis of Castlemart tomato plants under different damage treatments.**  
(DOCX)

### Acknowledgements

We are grateful to Dr. John Délano for the donation of tomato Castlemart seeds. We thank Biól. Yolanda García for her GC-MS analytical support; Dr. Rafael Bujanos Muniz and Dr. Fernando Baena Juárez for insect donation; Dr. Ernesto Vega for his valuable help in statistical analysis, and M.I. Heberto Ferreira and Ing. Alberto Valencia for their computing technical

support. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM) and a requisite to obtain the doctorate degree. A. Bautista-Lozada acknowledges the scholarship and logistics support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), and UNAM.

## References

- Dudavera N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I (2006) Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Cr Rev Plant Sci* 25: 417-440.
- Arimura GI, Kost C, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim Biophys Acta* 1734: 91-111. doi:10.1016/j.bbali.2005.03.001. PubMed: 15904867.
- Janssen A, Sabelis MW, Bruin J (2002) Evolution of herbivore-induced plant volatiles. *Oikos* 97: 134-138. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.970114.x.
- Heil M (2010) Plastic defence expression in plants. *Evol Ecol* 24: 555-569. doi:10.1007/s10682-009-9348-7.
- Agrawal AA (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294: 321-326. doi:10.1126/science.1060701. PubMed: 11598291.
- Fordyce JA (2006) The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 209: 2377-2383. doi:10.1242/jeb.02271. PubMed: 16731814.
- Turlings TCJ, Wäckers FL (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-damaged plants. In RT Cardé J Millar. *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge University Press. pp. 21-75.
- Heil M, Adame-Álvarez RM (2010) Short signaling distances make plant communication a soliloquy. *Biol Lett* 6: 843-845. doi:10.1098/rsbl.2010.0440. PubMed: 20554558.
- Stout MJ, Workman KV, Bostock RM, Duffey SS (1998) Specificity of induced resistance in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 113: 74-81.
- Thaler JS, Karban R, Ullman DE, Boege K, Bostock RM (2002) Cross-talk between jasmonate and salicylic plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* 131: 227-235. doi:10.1007/s00442-002-0885-9.
- Rodríguez-Saona C, Chalmers JA, Raj S, Thaler JS (2005) Induced plant responses to multiple damagers: differential effects on an herbivore and its parasitoids. *Oecologia* 143: 566-577. doi:10.1007/s00442-005-0006-7. PubMed: 15791425.
- Raghava T, Ravikumar P, Hegde R, Kush A (2010) Spatial and temporal volatile organic compound response of selected tomato cultivars to herbivory and mechanical injury. *Plant Sci* 179: 520-526. doi:10.1016/j.plantsci.2010.07.020. PubMed: 21802610.
- Yarnes CT, Boecklen WJ, Tuominen K, Salminen JP (2006) Defining phytochemical phenotypes: size and shape analysis of phenolic compounds in oaks (Fagaceae, *Quercus*) of the Chihuahua desert. *Can J Bot* 84: 1233-1248. doi:10.1139/b06-076.
- Torres-Gurrola G, Delgado-Lamas G, Espinosa-García FJ (2011) The foliar chemical profile of criollo avocado, *Persea americana* var. *drymifolia* (Lauraceae), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *Trioxa anceps* (Triozidae). *Biochem Syst Ecol* 39: 102-111. doi:10.1016/j.bse.2011.01.011.
- Bricchi I, Leitner M, Foti M, Mithöfer A, Boland W et al. (2010) Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: early signaling and volatile emission in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Planta* 232: 719-729.
- Hilker M, Meiners T (2010) How do plants "notice" attack by herbivorous arthropods? *Biol Rev* 85: 267-280. doi:10.1111/j.1469-185X.2009.00100.x. PubMed: 19961475.
- Morris WF, Brian M, Bergelson J (2006) On testing for a tradeoff between constitutive and induced resistance. *Oikos* 112: 102-110. doi:10.1111/j.0030-1299.2006.14253.x.
- Shorey HH (1963) A simple artificial rearing medium for the cabbage looper. *J Econ Entomol* 56: 536-537.
- Cooper WR, Goggin FL (2005) Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomol Exp Appl* 115: 107-115. doi:10.1111/j.1570-7458.2005.00289.x.
- Sánchez-Hernández C, López MG, Délano-Frier JP (2006) Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient spr2 tomato mutants favor oviposition by insect herbivores. *Plant Cell Environ* 29: 546-557. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01431.x. PubMed: 17080606.
- Gols R, Raaijmakers CE, van Dam NM, Dicke M, Bukevinsky T et al. (2007) Temporal changes affect plant chemistry and tritrophic interactions. *Basic Appl Ecol* 8: 421-433. doi:10.1016/j.baee.2006.09.005.
- Schuman MC, Heinzel N, Gaquerel E, Svatos A, Baldwin IT (2009) Polymorphism in jasmonate signaling pathway partially accounts for the variety of volatiles produced by *Nicotiana attenuata* plants in a native population. *New Phytol* 183: 1134-1148. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02894.x. PubMed: 19538549.
- Rodríguez-Saona CR, Musser RO, Vogel H, Hum-Musser SM, Thaler JS (2010) Molecular, biochemical, and organochemical analyses of tomato plants simultaneously attacked by herbivores from two feeding wilds. *J Chem Ecol* 36: 1043-1057. doi:10.1007/s10886-010-9854-7. PubMed: 20820890.
- Heil M (2012) Damaged-self recognition as a general strategy for injury detection. *Plant Sign Behav* 7: 576-580. doi:10.4161/psb.19921. PubMed: 22516811.
- Miresmailli S, Gries R, Gries G, Zamar RH, Isman MB (2011) Population density and feeding duration of cabbage looper larvae on tomato plants alter the levels of plant volatile emissions. *Pest Manag Sci* 68: 101-107. PubMed: 22034107.
- Kessler A, Heil M (2011) The multiple faces of indirect defenses and their agents of natural selection. *Func Ecol* 25: 348-357. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01818.x.
- Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1781-1785. doi:10.1073/pnas.0308037100. PubMed: 14749516.
- Birkett MA, Campbell CAM, Chamberlain K, Guerrieri E, Hick AJ et al. (2000) New roles for *cis*-jasmonate as an insect semiochemical and plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9329-9334. doi:10.1073/pnas.160241697. PubMed: 10900270.
- Webster B, Bruce T, Pickett J, Hardie J (2010) Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Anim Behav* 79: 451-457. doi:10.1016/j.anbehav.2009.11.028.
- Viswanathan DV, McNickle G, Thaler JS (2008) Heterogeneity of plant phenotypes caused by herbivore specific induced responses influences the spatial distribution of herbivores. *Ecol Entomol* 33: 86-94.
- Dall SRX, Bell AM, Bolnick DI, Ratnieks FLW (2012) An evolutionary ecology of individual differences. *Ecol Lett* 15: 1189-1198. doi:10.1111/j.1461-0248.2012.01846.x. PubMed: 22897772.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AB FJE. Performed the experiments: AB. Analyzed the data: AB FJE. Contributed reagents/materials/analysis tools: AB FJE. Wrote the manuscript: AB FJE.

## *Capítulo tres*

---

“TOMATO PLANTS DOMESTICATION STATUS IS ASSOCIATED WITH ODOR INTRASPECIFIC VARIATION AFTER *BACTERICERA COCKERELLI* (SULC.) (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) ATTACK”

Title: Tomato plants domestication status is associated with odor intraspecific variation after *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Psyllidae) attack.

Bautista-Lozada, Alicia<sup>1</sup>, and Espinosa-García, Francisco Javier<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta Morelia Michoacán. MÉXICO, 58190 Tel. +52 (443) 3 22 27 77, Fax: +52 (443) 322-27-19. e-mail: abautista@oikos.unam.mx; espinosa@oikos.unam.mx.

\*Corresponding author

## Summary

- (1) As an indirect effect of plant domestication, the emission of volatile organic compounds (VOC) has changed modifying the odor of cultivated and wild individuals.
- (2) To understand the effect of plant domestication status over herbivore-induced VOC plasticity we used cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and wild tomato (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) plants. We assessed two variables: the fold-change in concentration of individual volatiles and the variation in the volatile emission among individuals. Fold-change in concentration is a ratio calculated from the volatile emission of the same individual before and after damage. Uniformity in odor was calculated from the values for absolute and relative volatile concentration (size and shape analysis) before and after damage.
- (3) Using *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae) nymphs as damage agent, we found that plant domestication status determined the richness and diversity of tomato constitutive volatile emission. We found a negative correlation between the constitutive and induced volatile emission indicating a trade-off associated to plasticity but not related to tomato domestication status.
- (4) We discuss the effect of the tomato intraspecific herbivore-induced VOC plasticity on plant-insect interactions through (i) changes in composition and (ii) among-individuals variation.

Key-words: volatile organic compounds, tomato domestication, phloem-feeding insects, phenotypic plasticity, phenotypic variation, trade-off

## 1. Introduction

Plant domestication is based on natural phenotypic variation of traits of human interest (Alpert and Simms, 2002). Direct artificial selection favors plant development and reproduction over defensive secondary metabolites (SMs) in cultivated plants compared to their wild relatives (Bazzas *et al.*, 1987; Benrey *et al.*, 1998; Dirzo *et al.*, 2001; Pickersgill, 2007; Rodriguez-Saona *et al.*, 2011). As an indirect effect of artificial selection, there is evidence that crop management intensity or plant mating system has frequently reduced resistance to herbivore insects through changes in SM concentration and diversity (Lindig-Cisneros *et al.*, 1997, 2002; Blanckaert *et al.*, 2011; Ferrari *et al.*, 2012) and plant-insect interactions (Macfayden and Bohan 2010). One of the traits that have been indirectly modified is the volatile organic compound (VOCs) blend induced by herbivory. The effect of domestication over the VOC emission has been studied in terms of trade-offs (*i. e.* the negative correlation between direct and indirect types of chemical defenses (Ballhorn *et al.*, 2008, 2010; Rodriguez-Saona *et al.*, 2011) and in terms of the concentration of single VOCs (*i. e.* the absolute and relative concentration (Gouinguéné *et al.*, 2001; Degen *et al.*, 2004; Salazar-Rojas *et al.*, 2012).

Herbivore-induced VOCs have been considered an example of adaptive phenotypic plasticity inducing the activation of a resistant phenotype (Agrawal, 2001; Agrawal, 2005; Heil and Baldwin, 2002; Cipollini, 2004; Heil 2009) that may attract natural enemies of herbivores (Ninkovic *et al.*, 2001; Ninkovic and Pettersson, 2003; Turlings and Wäckers, 2004; Arimura, 2005; Lou *et al.*, 2006; Kessler and Heil, 2011) or prime the plant for future attack (Hilkers and Meiners, 2010). Herbivore-induced resistance is presumably beneficial to plant fitness evolving as a cost-saving derivative of constitutive resistance, given that possession of both would seem to be redundant (Agrawal, 2001; Agrawal, 2005; Cipollini, 2004; Fritzsche-Hoballah *et al.*, 2004). Therefore, a trade-off between constitutive and induced VOC emission can be expected, such that high investment in constitutive resistance is predicted to be matched by low investment in induced resistance, and vice-versa (Zangerl and Bazzaz, 1999; Agrawal 2005).

The analysis of the intraspecific variation of VOCs between cultivated plants and their wild relatives, studies have shown that domestication has modified their concentration and diversity (Ferrari *et al.*, 2006; Torres-Gurrola *et al.*, 2011) as well as their interactions with the third trophic level (Lou *et al.*, 2006; Augustyn *et al.*, 2010; Kappers *et al.*, 2010). Intraspecific variation of VOCs is usually reported in terms of the mean and variance comparisons between groups of damaged and non-damaged individuals. This is perfectly correct but may fail to detect changes under moderate herbivory treatments due to variation among individuals within and among accessions. Variation in the VOC emission among individuals indicates the level of resemblance in odor within a group of plants. Bautista-Lozada and Espinosa-García (2013) showed that the phenotypic variation in the VOC emission among individuals or uniformity in odor is herbivore-specific. To our knowledge,

there is no information about the effect of plant domestication status over herbivore-induced variation among individuals.

The current work aimed to study the effect of plant domestication status on herbivore-induced VOCs in terms of (i) the correlation between the constitutive and induced VOC emission, (ii) the intraspecific variation in VOC concentration (size and shape analysis) and its chemical diversity (Hill's numbers), and (iii) the fold-change of the absolute and relative concentration of individual VOCs, and (iv) the phenotypic variation in the VOC emission among individuals within each accession. To control for variation, we decided to analyze the same individual before and after damage. Thus, the VOC emission before damage is the control out of which we compared changes after herbivory. To analyze the variation among individuals, we used the variable fold-change (*i. e.*, a ratio of change calculated from the VOC collection of the same individual before and after damage). By using this approach, the study of plant domestication status effect over the VOC plasticity induced by herbivory can be assessed by incorporating among-individual constitutive variation (Bautista-Lozada and Espinosa-García, 2013).

We used the cultivated tomato Río Grande, Río Fuego and Castlemart (*Solanum lycopersicum* L.) and the wild populations label Mocerito, Ensenada, and Potrerillo (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) Spooner G.J. Anderson et R.K. Jansen) and tomato psyllid nymphs of the phloem-feeding insect *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Psyllidae). Our results demonstrate that domestication is related to phenotypic plastic responses to herbivory as well as the uniformity in herbivore-induced VOCs blend amount and composition. Our results are discussed in terms of the ecological consequences of VOC uniformity for plant-insect interactions.

## 2. Materials and Methods

### 2. 1. Plants and insects

We used seeds of three cultivated and three wild tomato accessions. Cultivated accessions were Río Fuego (Caloro, 59052-0-034-1), Río Grande (Edena, 490401-142) and Castlemart (seeds were donated by Dr. John Délano-Frier from CINVESTAV-Irapuato, México). Seeds of wild tomato accessions were collected by Dr. Pedro Sánchez Peña and labeled Mocerito, Ensenada and Potrerillo according to seed population. The location of this population was previously published in Sánchez-Peña *et al.* (2006).

Plants were grown with peat moss substrate COSMOPEAT (Canadian Sphagnum Peat Moss) under greenhouse conditions (28°C±4 and 60% relative humidity during spring and summer). Once germinated, plants were transplanted to 256 mL plastic pots with the same substrate and watered daily without fertilization. We used plants with three to four fully extended leaves for experiments (about 30 days old) (Sánchez-Hernández *et al.*, 2005).



*B. cockerelli* nymphs were reared on cultivated tomato (*S. lycopersicum* L.) and chili (*Capsicum annuum* L.) plants for at least 3 generations under laboratory conditions (25±3°C, 16 h light/8 h dark photoperiod with incandescent light (400-500 lumens)) where they were watered every other day with tap water. Plants were inside a wood cage covered with transparent mesh (100x100x50cm).

## 2.2. Induction treatments

### 2.2.1. Preliminary experiments

To exclude the effect of laboratory conditions on the VOC emission of cultivated and wild tomato accessions during induction treatment, we analyzed the VOC emission of non-damaged plants for five days. The first collection period was performed on day one and five. Although we found differences in VOC absolute concentration among tomato accessions, we found no significant changes in total VOC emission (arbitrary units of peak area/30min±SD of eight plants) between both collection periods for any tomato accession. In preliminary experiments, VOCs were collected, identified and analyzed as described in methods (see below).

### 2.2.2. Tomato psyllid nymphs' induction treatment

Eight plants from each tomato type were used for the induction experiment. Six *B. cockerelli* nymphs from fifth or sixth instar were placed on one leaflet where they were allowed to feed continuously for five days. During induction treatment, plants were inside plastic pots covered with a transparent white mesh under laboratory conditions (25±3°C, 16 h light/8 h dark photoperiod with incandescent light (400-500 lumens)).

To better understand the VOC emission induced by *B. cockerelli* nymphs we performed the same induction treatment on two genotypes of *S. lycopersicum* L. cv. Castlemart: transgenic 35S::*prosystemin* (35S::*prosys*) and mutant suppressor of prosystemin-mediated responses2 (*spr2*). 35S::*prosys* constitutively expresses defense genes that activate induced VOC and *spr2* fails to accumulate JA for defense gene activation and therefore emit reduced levels of VOC (Sánchez-Hernández *et al.*, 2005).

## 2.3. Volatile collection and identification

In order to follow individual responses, VOC were collected before and after treatment with *B. cockerelli* nymphs under a static headspace environment using a solid-phase-microextraction fiber (SPME) of 50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (Supelco, Bellefonte, USA)) cover. Plants were moved from the greenhouse to the laboratory one hour before constitutive VOC collection and introduced into a two-half glass cell apparatus. The volume of the glass-chamber was of 2.5 L, bigger than the one used by Sánchez-Hernández *et al.* (2005). The pot was placed in the base of the glass-cell. The aerial part of the plant was excluded by a split Teflon plate with a guillotined neck and

Teflon tape, and then covered with the upper glass cell. In front of the upper glass cell of the apparatus, there is a tube with an aluminum cap and a rubber septum to allow the insertion of the SPME fiber (fiber insertion tube). Besides there are other two glass tubes, an upper tube on the right side of the apparatus and a lower tube on the left side that function that functioned as air conducts. VOC were collected from the same plant before and after damage using the same SPME fiber.

Before VOC collection, plants were left for an hour inside the upper cell with the two air conducts uncovered to let the ambient air flow to stabilize VOC emission under a 40 W (400-500 lumens) lamp. This period also served as a pre-concentration period before VOC collections. At the end of this period, the two-half glass cells were closed using two 40 mm paperclips and the two air conducts covered with Teflon tape to create a static headspace. SPME fibers were introduced and exposed for 30 minutes; then immediately placed in the injector of a Gas Chromatograph (GC) Agilent model 6890 coupled with a Mass Spectrometer (MS) model Agilent 5973. The GC-MS was equipped with a 30 m capillary column (Equity-1, 0.25 mm diameter and 0.25  $\mu\text{m}$ ). Fibers in the injector were left for 5 minutes in splitless mode and 5 minutes in split mode. The GC-MS was set in the following temperature conditions, similar to those in Sánchez-Hernández *et al.* (2005): injector 180°C. Oven temperatures started at 42°C held for 3 minutes and then raised 1.5°C/min until 55°C, then a 3°C/min raise until 120°C, which was held for 5 minutes. GC-MS transfer line was at 280°C. The mass spectra were taken at 70 eV (in EI mode) with a scanning speed of 1, from 50 to 500 m/z. We used helium as carrier gas with a flow rate of 1 mL/min and 12.57 psi pressure within the column.

Compounds were identified by comparing their Kovats indexes with n-alkanes C8-C20 obtained under the same conditions as chromatographs from VOC retention times, and by comparing the spectra given by the MS with that one of the NIST 98 library spectra. Pure standards were used to verify the retention time and spectrum for  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -phellandrene, nonanal, and decanal (Sigma-Aldrich). The absolute concentration of individual VOC was calculated from peak areas in chromatograms. The total VOC emission was calculated by the sum of the absolute concentration of each VOC in the blend. The relative concentration of each compound was represented the percentage of each compound in the blend.

## 2. 4. Statistical analysis

### 2.4.1. Correlation between the constitutive and the induced total VOC emission

To analyze the correlation between VOC emissions, we used the following formula (Morris *et al.*, 2006):

$$D - C = I$$

where C is the VOC emission of undamaged plants (*i. e.*, before damage), D is the VOC emission of damaged plants (*i. e.*, after damage), and I is the difference in resistance between damaged and undamaged plants. An analysis of covariance (ANCOVA) was performed with I as the response variable, constitutive total amounts of VOC as the continuous variable and PDS (*i. e.*, cultivated and wild) as the categorical variable. Correlations between constitutive and induced VOC for each tomato accession were performed with a Monte Carlo procedure with 100,000 replications. In addition, we compared the differences between the constitutive and the induced VOC emission with a paired-*t* test for each tomato accession.

#### 2.4.2. Size and shape analysis and VOC diversity

Size and shape analysis has been used to study the chemical composition of plant tissues in terms of their absolute and relative concentration (Yarnes *et al.*, 2006; Torres-Gurrola *et al.*, 2011). Variable size was calculated by the  $\log_e+1$  transformation of absolute concentration data (we added 1 to all data to avoid zeros). The subtraction of the geometric mean from size values produced variable shape. The geometric mean was calculated from the  $\log_e+1$  transformation of all VOC for each accession. We excluded hexanal from the analysis because it showed little variation among tomato accessions. The rank of the matrix of variable shape is one less than that of size matrix (Yarnes *et al.*, 2006), thus we excluded variable  $\log_e+1(\alpha\text{-terpinene})-\log_e(\text{geometric mean})$  from the analysis because its concentration was low in the blend of cultivated accessions and absent in the blend of wild accessions.

Chemical diversity indexes were calculated using software PAST 2.17. Hill's numbers and size-and-shape matrix were analyzed with a multivariate analysis of variance (MANOVA) with plant domestication status (PDS) and Tomato Accession (*i. e.* Río Fuego, Río Grande, Castlemart, Mocerito, Ensenada, and Potrerillo) as categorical variables, followed by a two-way analysis of variance (ANOVA). If a significant effect of Tomato Accession was found over individual VOC concentrations, we performed pairwise multiple comparisons. The last step of size and shape analysis was the performance of a linear discriminant analysis (LDA) to look for differences in the VOC blend that discriminate between tomato odors.

#### 2.4.3. Fold-change of the absolute concentration of individual VOC

The fold-change in concentration is a ratio based analysis calculated from the concentration of VOC before and after damage. We calculated this ratio using the formula of deltas:

$$\Delta = \frac{T_2 - T_1}{T_1}$$

where  $T_1$  is the VOC emission of undamaged plants (*i. e.*, before damage),  $T_2$  is the VOC emission of damaged plants (*i. e.*, after damage). Using fold-change in concentration, we compared differences in the VOC concentration with respect to each plant's own constitutive emission. Fold-change matrix was analyzed with a MANOVA followed by a two-way ANOVA with PDS and tomato accession (*i. e.*, Río Fuego, Río Grande, Castlemart, Mocarito, Ensenada, and Potrerillo) as categorical variables. When necessary, we performed pairwise multiple comparisons to detect differences in VOC concentrations among plant groups. Then, we performed a linear discriminant analysis (LDA) to calculate variation among individuals at the whole blend level (see below).

#### 2.4.4. Intraspecific variation in tomato VOC emission among individuals

To analyze the effect of PDS over the VOC emission among individuals within and among tomato accessions we extracted the coordinates for each individual in the discriminant plot that resulted from size and shape and fold-change LDA. Linear discriminants (LD) that accounted for at least 90% of the variation were used to calculate the phenotypic distances among individuals using Euclidian distances. The Euclidian distances that resulted from fold-change in concentration were used to analyze variation among individuals in terms of the plastic response while those obtained from the constitutive and induced size-and-shape analysis, were used to analyze the initial and final variation or uniformity in odor. We used a two-way ANOVA to compare Euclidian distances using PDS and tomato accession as categorical variables. R software version 2.14.1 was used to perform all statistical analysis.

### 3. Results

#### 3.1. Phenotypic plastic responses to *B. cockerelli* are not associated to tomato domestication status

Damage by *B. cockerelli* nymphs significantly modified the total mean amount of VOC of some tomato accessions (Table 1). Based in the before and after VOC collections, we detected differential phenotypic responses of plants within each accession in terms of their total amount (Figure 1). In addition, the correlations between the constitutive and the induced VOC emission were negative for some accessions (Figure 2) but not related to plant domestication status (PDS) (Figure 2).

Complementary induced treatments using Castlemart genotypes *spr2* and *35s::prosys* showed that *B. cockerelli* nymphs differentially modified the total amount of VOC. The mean total amount of VOC emitted by *spr2* significantly increased after nymphs feeding while the emission of *35s::prosys* genotype showed no significant differences between emissions (supplementary Figure 1).

3.2. Tomato VOC diversity and composition is determined by its domestication status VOC identified in the headspace of all tomato accessions were the green-leaf volatile, 3-hexanol (KI=780); monoterpenes,  $\alpha$ -pinene (KI=924), *o*-cymene (KI=960),  $\beta$ -myrcene (KI=983), (+)-4-carene (KI=990),  $\alpha$ -phellandrene (KI=993),  $\alpha$ -terpinene (KI=1006), *p*-cymene (KI=1014),  $\beta$ -phellandrene (KI=1018); and the aldehydes, nonanal (KI=1095), and decanal (KI=1195). We found that the constitutive VOC diversity was associated to PDS ( $F=3.5961$ ,  $P=0.01$ ) rather than tomato accession ( $F=0.9265$ ,  $P=0.54$ ). Hill numbers calculated from the constitutive VOC emission showed that richness (N0) and diversity (N1) in the blend of cultivated accessions is higher than that one of wild accessions (*i. e.* a Shannon index of around 1) (Table 2, A): the constitutive composition of non-damaged cultivated accessions was constituted by 11 compounds while that of wild accessions was constituted of six to eight compounds (Figure 3, constitutive emission). The number of dominant VOC is higher in the blend of wild accessions (N2). In contrast, after *B. cockerelli* feeding, the number of VOCs detected in the blend of cultivated accessions decreased (*i. e.*, a Shannon index of around 0.6) (Table 2, B; Figure 3, induced emission) decreasing the effect of PDS over VOC diversity ( $F=0.59186$ ,  $P=0.70$ ); only tomato accession influenced diversity indexes ( $F=2.15224$ ,  $P=0.004$ ). Likewise, the value of the N1 and N2 also decreased. In addition, we found that the individual absolute and relative constitutive concentration of VOC was also determined by PDS or tomato accession but that the effect of PDS was no longer significant in the induced emission (Table 3).

### 3.3. Fold-change in concentration is associated to tomato domestication status

We detected significant changes in the mean absolute (Figure 3) and relative (supplementary Table 1) concentration of some VOC after *B. cockerelli* nymphs' feeding. Based on this measurement, we show that fold-changes of individual absolute VOC concentrations are associated to PDS and/or tomato accession (Figure 4). For example, the concentration of *o*-cymene was related to PDS ( $F=4.9877$ ,  $P=0.03$ ), that of  $\beta$ -myrcene to PDS ( $F=7.6087$ ,  $P=0.008$ ) and Tomato accession ( $F=3.9568$ ,  $P=0.008$ ), while that one of  $\beta$ -phellandrene only to Tomato accession ( $F=3.5080$ ,  $P=0.01$ ). For the rest of the VOC, the effect of PDS and Tomato Accession was not significant (supplementary Figure 2). In terms of the relative concentration, the effect of PDS and Tomato Accession was also calculated as part as LDA (supplementary Table 2). Based on the before and after approach, we detected high variation in the relative VOC concentration among individuals within accessions (Figure 5).

### 3.4. Among-individual variation in VOC emission is higher in cultivated tomato accessions

Based on the phenotypic distances calculated from the fold-change in concentration and size and shape analysis LDs (supplementary Tables 3 and 4, respectively), we determined the among-individual variation in VOC emission within each accession. We found that the constitutive variation in the VOC emission was related to PDS and Tomato Accession

being cultivated accessions the ones with higher mean values of Euclidian distances compared to wild accessions. The effect of PDS was not significant for variation in the VOC emission among individuals in the induced emission (Table 4; Figure 6). From fold-change in concentration analysis we determined that only the absolute concentration was related to PDS and Tomato Accession, and the relative concentration was only related to Tomato Accessions; also in this case, cultivated accessions had higher mean values of Euclidian distances.

#### 4. Discussion

This study expands the knowledge about intraspecific VOC variation between cultivated and wild relatives by comparing the among-individual variation in composition of the same before and after herbivory. Our findings are in general agreement with previous works. However, the analytical approaches used in this work (*i. e.*, a ratio of change of the same individual before and after damage) and variation in VOC emission among individuals (uniformity in odor) facilitate the understanding about VOC phenotypic plastic responses to herbivory.

##### 4.1. *Bactericera cockerelli* nymphs' reduced VOC emissions

For non-chewing insects the activation of the Jasmonic Acid (JA) or Salicylic Acid (SA) pathway seems to be inconclusive (Walling, 2000; Rodriguez-Saona *et al.*, 2003; Kempema *et al.*, 2007). VOC induced by non-chewing insects have been studied for some plant-herbivore systems other than tomato, but the emission varied depending on the system because it may be increased (Birkett *et al.*, 2003; Scutareanu *et al.*, 2003; Staudt *et al.*, 2010), kept unchanged (Turlings *et al.*, 1998; Rodriguez-Saona *et al.*, 2003; Nissinen *et al.*, 2005) or decreased (Sarmiento *et al.*, 2011) when compared to non-damaged plants. *B. cockerelli* nymphs did not modify the total amount of VOC emission. The effect of *B. cockerelli* feeding over Castlemart genotypes VOC emission is contrary to the expected. The increased total VOC emission after nymphs feeding suggests that these metabolites are negatively regulated by JA. We found, however, that the induced resistance (I) was negatively correlated with the constitutive VOC emission indicating a trade-off associated to plasticity in this trait. However, this correlation was not associated to tomato domestication status. In this work, the trade-off between the constitutive and induced total VOC emission suggests metabolic costs associated to the transition from a constitutive to an induced state. The constitutive VOC emission is determined by tomato domestication status while changes in the VOC amount and its variation are determined by herbivores (*i. e.*, herbivore density, damage intensity). Bautista-Lozada and Espinosa-García (2013) found that Castlemart tomato plants differentially responded to different insect identities. Thus, trade-offs in the VOC emission may also be herbivore-specific. This trade-off can also be associated to changes in resource allocation to resistance structures like trichomes or

other secondary metabolites (Zangerl and Bazzaz, 1992; Walters and Heil, 2007) but more research needs to be done to test this hypothesis.

#### 4.2. Cultivated tomato accessions have more VOC diversity than their wild relatives

Diversity and composition of the VOC emission is determined by tomato domestication status. However, we found that there is considerable more diversity and among-individual variation within cultivated accessions compared to their wild relatives. We speculate that this pattern may be the result of metabolic changes to improve traits of commercial interest (*e. g.*, strawberry flavor (Aharoni *et al.*, 2004)). Based on the fold-change in concentration analysis, we showed that tomato VOC emission plasticity is under the double regulation of contrasting selective forces (*e. g.*, the absolute and relative concentration of  $\beta$ -myrcene) then differentially changing the VOC blend of cultivated and wild tomato plants. Here, we point out that size and shape analysis of the induced VOC emission did not detect the effect of tomato domestication status or tomato accessions under this treatment of moderate feeding by *B. cockerelli* (Table 5 B and Figure 4). Compared to other works studying the intraspecific variation of VOC between cultivated and wild relatives (Gouinguené *et al.*, 2001; Fritzsche-Hoballah *et al.*, 2002; Degen *et al.*, 2004; Chen and Welter, 2005; Kappers *et al.*, 2010), our work compares changes in composition before and after herbivory of the same group of individuals detecting relevant changes associated to domestication status.

#### 4.3. Tomato domestication increased and maintained VOC diversity and among-individual variation

The constitutive high diversity and high uniformity in the VOC can attract predator insects to tomato crop fields (*e. g.*, *Coccinella septempunctata* (Ninkovic *et al.*, 2011)) also having bottom-up effects on herbivores and parasitoid development (Gols *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011). High richness and diversity of VOC in the blend of cultivated accessions can explain variation patterns in VOC emissions among individuals compared to wild accessions. In this work, *B. cockerelli* nymphs reduced the variation among individuals in cultivated accessions. However, the uniformity of VOC among individuals is herbivore-specific at least for Castlemart accession (Bautista-Lozada and Espinosa-García, 2013). According to Dall *et al.* (2012), variation among individuals within a single population can cause individuals to participate in interactions with different intensities (Vaswanathan *et al.*, 2008). In terms of the VOC emission, the intensity of the interaction between the plants' emission and carnivore insects would be related to the attraction (or repellency) at the individual plant or population level determined by odor variation. In addition, we speculate that the low uniformity in the VOC emission among individuals may be a barrier to carnivore insects if the range of VOC detection is narrow (Ngumbi *et al.*, 2012) and compromise VOC use as a source of information (Poveda and Kessler 2012).

In summary, intraspecific variation among tomato individuals or its level of uniformity is attributed to changes in chemical diversity, from low to high in wild and cultivated accessions, respectively. This work shows that the artificial and natural selection have indirectly regulated individual and group VOC plasticity, measured here by the fold-change in concentration and uniformity in odor. Further research will focus on the ecological effects of VOC uniformity in the interaction between plants and carnivore insects through associative learning.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. Pedro Sánchez-Peña for the donation of the tomato wild population seeds and to Dr. John Délano for the donation of the Castelmart seeds. We thank also to Biól. Yolanda García for her GC-MS analytical support; Dr. Ernesto Vega for his valuable help in statistic analysis; M.I. Heberto Ferreira and Ing. Alberto Valencia for their computing technical support, and Dr. Martin Heil for his valuable theoretical contributions. This study was supported by UNAM-PAPIIT IN227607 and CIECO-UNAM POFJEG granted to F. J. Espinosa-García. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). A. Bautista-Lozada acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), and UNAM.

#### References

- Agrawal AA, 2001. Phenotypic plasticity in the interaction and evolution of species. *Science* 294: 321-326.
- Agrawal AA, 2005. Future directions in the study of induced plants induced responses to herbivory. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 97-105.
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FWA, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schaub W, Bouvomeester HJ. 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *The Plant Cell* 16: 3110-3151.
- Alpert P, Simms EL. 2002. The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when it is good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology*. 16: 285-297.
- Augustyn WA, Botha BM, Combrinck S, Du Plooy W. 2010. Correlation of volatile profiles of twenty mango cultivars with their susceptibilities to mango gall fly infestation. *South African Journal of Botany*. DOI: 10.1016/j.sajb.2010.07.005.
- Bautista-Lozada A, Espinosa-García FJ. 2013. Odor uniformity among tomato individuals in response to herbivory depends on insect species. *PLOS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0077199



- Ballhorn DJ, Kautz S, Lion U, Heil M. 2008. Trade-offs between direct and indirect defences of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of Ecology*. 96: 971-980.
- Bazzaz FA, Chiarello NR, Coley PD, Pitelka LF. 1987. Allocation of resources to reproduction and defense. *Biosciences* 37: 58-67.
- Benrey B, Callejas A, Rios L, Oyama K, Denno RF. 1998. The effects of domestication of Brassica and Phaseolus on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. *Biological Control* 11:130-140.
- Birkett MA, Chamberlain K, Guerrieri E, Pickett JA, Wadhams LJ, Yasuda T. 2003. Volatiles from whitefly-infested plants elicit a host-locating response in the parasitoid *Encarsia formosa*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1589-1600.
- Blanckaert I, Paredes-Flores M, Espinosa-García FJ, Piñero D, Lira R. 2012. Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi arid region of Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59: 557-573.
- Chen YH, Welter SC. 2005. Crop domestication disrupts a native tritrophic interaction associated with the sunflower, *Helianthus annuus* (Asterales: Asteraceae). *Ecological Entomology* 30: 673-683.
- Cipollini DF. 2004. Stretching the limits of plasticity: Can a plant defend against both competitors and herbivores? *Ecology* 85: 28-37
- Dall SRX, Bell AM, Bolnick DI, Ratniecks LW. 2012. An evolutionary ecology of individual differences. *Ecology Letters* 15:1189-1198.
- Degen T, Dillmann C, Marion-Poll F, Turlings TCJ. 2004. High genetic variability of herbivore-induced volatile emission within a broad range of maize inbred lines. *Plant Physiology* 135: 1928-1938.
- Dirzo R, Lindig R, Rosenthal JP. 2001. Plantas cultivadas y sus parientes silvestres: sistemas modelo para estudios de ecología química. In: Anaya AL, Espinosa-García FJ, Cruz-Ortega R, eds. *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Plaza y Valdes, 607-631.
- Ferrari MJ, Stephenson AG, Mescher MC, De Moraes CM. 2006. Inbreeding effects on blossom volatiles in *Cucurbita pepo* subs. *Texana* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* 93: 1768-1774.
- Fritzsche-Hoballah MEF, Tamò C, Turlings TCJ. 2002. Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *Journal of Chemical Ecology* 28: 951-968.

- Gols R, Wagenaar R, Bukovinszky T, van Dam NM, Dicke M, Bullock JM, Harvey JA. 2008. Genetic variation in defense chemistry in wild cabbages affects herbivores and their endoparasitoids. *Ecology* 89: 1616–1626.
- Gouinguéné S, Degen T, Turlings TCJ. 2001. Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* 11: 9-16.
- Harvey JA, van Dam NM, Raaijmakers CE, Bullock JM, Gols R. 2011. Tri-trophic effects of inter- and intra-population variation in defense chemistry of wild cabbage (*Brassica oleracea*). *Oecologia* 166:421-431.
- Heil M. 2009. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science* 14: 356-363.
- Heil M, Baldwin IT. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7: 61-67.
- Hilker M, Meiners T. 2010. How do plants “notice” attack by herbivorous arthropods? *Biol Rev* 85: 267-280.
- Kappers IF, Hoogerbrugge H, Bouwmeester HJ, Dicke M. 2011. Variation in herbivore-induced volatiles among cucumber (*Cucumis sativus* L.) varieties has consequences for the attraction of carnivorous natural enemies. *Journal of Chemical Ecology* 37: 180-100.
- Kessler A, Heil M. 2011. The multiple faces of indirect defenses and their agents of natural selection. *Functional Ecology* 25: 348-357.
- Kempema LA, Cui XP, Holzer FM, Walling LL. 2007. *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology* 143: 849–865.
- Lindig-Cisneros R, Benrey B, Espinosa-García FJ. 1997. Phytoalexins, resistance traits, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1997-2011.
- Lindig-Cisneros R, Dirzo R, Espinosa-García FJ. 2002. Effects of domestication and agronomic selection on phytoalexin antifungal defense in *Phaseolus* beans. *Ecological Research* 17: 315-321.
- Liu D, Trumble JT. 2006. Ovipositional preferences, damage thresholds, and detection of the tomato-potato psyllid *Bactericerca cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) on selected tomato accessions. *Biological Entomology Research* 96: 197-204.

- Lou Y, Hua X, Turlings TCJ, Cheng J, Chen X, Ye G. 2006. Differences in induced volatiles emissions among rice varieties result in differential attraction and parasitism of *Nilaparvata lugens* eggs by the parasitoid *Anagrus nilaparvatae* in the field. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2375-2387.
- Macfadyen S, Bohan DA. 2010. Crop domestication and the disruption of species interactions. *Basic and Applied Ecology* 11: 116-125.
- Morris WF, Traw MB, Bergelson J. 2006. On testing for a tradeoff between constitutive and induced resistance. *Oikos* 112: 102-110.
- Ninkovic V, Al Albasi A, Pettersson J. 2001. The influence of aphid-induced plants volatiles on ladybird beetle searching. *Biological Control*. 21: 191-195.
- Ninkovic V, Pettersson J. 2003. Searching behaviour of sevenspotted ladybird, *Coccinella septempunctata* - effects of plant-plant odour interaction. *Oikos*. 100: 65-70.
- Ninkovic V, Al Abassi S, Ahmed E, Glinwood R, Petterson J. 2011. Effect of the within-species plant genotype mixing on habitat preference of a polyphagous insect predator. *Oecologia* 166: 391-400.
- Nissinen A, Ibrahim M, Kainulainen P, Tilikkala K, Holopainen JK. 2005. Influence of carrot psyllid (*Trioza apicalis*) feeding or exogenous Limonene or Methyl Jasmonate treatment on composition of carrot (*Daucus carota*) leaf essential oil and headspace volatiles. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53: 8631-8638.
- Ngumbi E, Jordan M, Fadamiro H. 2012. Comparison of associative learning of host-related plant volatiles in two parasitoids with different degrees of host specificity, *Cotesia marginiventris* and *Micropilis croceipes*. *Chemoecology* 22: 207-215.
- Pickersgill B. 2007. Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100:925–940.
- Poveda K, Kessler A. 2012. New synthesis: plant volatiles as functional cues in intercropping systems. *Journal of Chemical Ecology* 38: 1341.
- Rodriguez-Saona C, Crafts-Brandner SJ, Cañas LA. 2003. Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. *Journal of Chemical Ecology* 29: 2539-2550.
- Rodríguez-Saona C, Vorsa N, Singh AP, Johnson-Cicalese J, Szendrei Zsofia, Mescher MC, Frost CJ. 2011. Tracing the history of plant traits under domestication in cranberries: potential consequences on anti-herbivore defences. *Journal of Experimental Botany*. 62: 2633-2644.

Salazar-Rojas VM, Herrera-Cabrera BE, Delgado-Alvarado A, Soto-Hernández M, Castillo-González F, Cobos-Peralta M. 2012. Chemotypical variation in *Vanilla planifolia* Jack. (Orchidaceae) from the Puebla-Veracruz Totonacapan region. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59: 875-887.

Sánchez-Hernández C, López MG, Délano-Frier J. 2005. Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient spr2 tomato mutants favor oviposition by insect herbivores. *Plant, Cell and Environment* 29: 546-557.

Sánchez-Peña P, Oyama K, Núñez-Farfán J, Fornoni J, Hernández-Verdugo S, Márquez-Guzmán J, Garzón-Tiznado JA. 2006. Sources of resistance to whitfly (*Bemisia* spp.) wild populations of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* (Dunal) spooner G. J. Anderson et R. K. Jansen in Northwestern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 711-719.

Sarmiento RA, Lemos F, Bleeker PM, Schuurink RC, Pallini A, Almeida MGO, Lima ER, Kant M, Sabelis MW, Janssen A. 2011. An herbivore that manipulates plant defence. *Ecology letters* 14: 229-236.

Schilmiller AL, Howe GA. 2005. Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 369-377.

Scutareanu P, Bruin J, Posthumus AM, Drukker B. 2003. Constitutive and herbivore-induced volatiles in pear, alder and hawthorn trees. *Chemoecology* 13: 63-74.

Staudt M, Jackson B, El-Aouni H, Buatois B, Lacroze JP, Poëssel JL, Sauge MH. 2010. Volatile organic compound emission induced by the aphid *Myzus persicae* differ from resistant and susceptible peach cultivars and a wild relative. *Tree Physiology* 30: 1320-1334.

Torres-Gurrola G, Delgado-Lamas G, Espinosa-García FJ. 2011. The foliar chemical profile of criollo avocado, *Persea americana* var. *drymifolia* (Lauraceae), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *Trioza anceps* (Trioziidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 102-111.

Turlings TCJ, Bernasconi M, Bertossa R, Bigler F, Caloz G, Dorn S. 1998. The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biological Control*. 11: 122-129.

Turlings TCJ, Wäckers F. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. En: Cardé, T. R. and Millar, G. J (Eds.) *Advances in insect chemical ecology*. Cambridge.

Viswanathan DV, McNickle G, Thaler JS. 2008. Heterogeneity of plant phenotypes caused by herbivore specific induced responses influences the spatial distribution of herbivores. *Ecological Entomology* 33: 86-94.

Walters D, Heil M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 3-17.

Walling LL. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*. 9: 195–216.

Yarnes CT, Boecklen WJ, Tuominen K, Salminen J-P. 2006. Defining phytochemical phenotypes: size and shape analysis of phenolic compounds in oaks (Fagaceae, *Quercus*) of the Chihuahua desert. *Canadian Journal of Botany* 84: 1233–1248.

Zangerl AR, Bazzaz F. 1992. Theory and pattern in plant defense allocation. In: Fritz, R. S. and Simms, E. L. eds. *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution and genetics*. University of Chicago Press, 363-391.

**Table 1** Mean ( $\pm$  SD of eight plants) VOC emission before and after *B. cockerelli* nymphs' feeding

PDS	Accession	VOC emission		<i>P</i>
		Before	After <sup>†</sup>	
Cultivated	Río Fuego	155 274.88 $\pm$ 282 483.06	47 435.63 $\pm$ 25 408.52	0.003
	Río Grande	88 695.50 $\pm$ 114 311.91	60 734.00 $\pm$ 35 948.63	0.008
	Castlemart	49 284.88 $\pm$ 44 425.89	34 486.63 $\pm$ 48 660.23	0.250
Wild	Mocorito	77 724.88 $\pm$ 71 037.53	343 002.50 $\pm$ 519 810.16	0.645
	Ensenada	186 633.13 $\pm$ 271 839.98	68 870.88 $\pm$ 63 157.81	0.004
	Potreriillo	105 141.88 $\pm$ 90 408.45	43 981.63 $\pm$ 55 899.78	0.01

PDS, plant domestication status. <sup>†</sup>After five days.

**Table 2** Diversity indexes of VOCs emitted by cultivated and wild tomato accessions

Diversity index	A. Constitutive emission						Effect	
	Río Fuego	Río Grande	Castlemart	Mocorito	Ensenada	Potrerrillo	PDS	Accession
Shannon	1.02 ± 0.32	1.00 ± 0.23	0.87 ± 0.43	0.67 ± 0.24	0.72 ± 0.15	0.81 ± 0.30	7.5014**	0.5517
Simpson	0.49 ± 0.18	0.51 ± 0.11	0.43 ± 0.20	0.34 ± 0.13	0.38 ± 0.08	0.42 ± 0.13	5.5261	0.6919
N0	7.25 ± 1.98	6.25 ± 1.67	6.00 ± 2.83	4.00 ± 1.31	4.75 ± 1.28	4.25 ± 2.05	15.1667***	0.6282
N1	1.19 ± 0.73	1.08 ± 0.53	0.95 ± 0.72	0.47 ± 0.38	0.50 ± 0.24	0.72 ± 0.65	9.5461**	0.4128
N2	2.32 ± 1.03	2.04 ± 0.50	1.88 ± 0.88	3.35 ± 1.29	2.70 ± 0.55	2.59 ± 0.74	9.9311**	1.1218
	B. Induced emission							
Shannon	0.64 ± 0.32	0.74 ± 0.20	0.78 ± 0.46	0.77 ± 0.27	0.66 ± 0.17	0.60 ± 0.27	0.2150	0.5845
Simpson	0.37 ± 0.16	0.36 ± 0.10	0.43 ± 0.22	0.42 ± 0.14	0.37 ± 0.08	0.34 ± 0.15	0.0286	0.5575
N0	5.87 ± 0.99 <sub>ac</sub>	5.87 ± 1.55 <sub>b</sub>	3.50 ± 2.45 <sub>ab</sub>	4.62 ± 2.07 <sub>ab</sub>	3.25 ± 1.28 <sub>ab</sub>	2.87 ± 1.24 <sub>ac</sub>	1.0678	4.7754**
N1	0.48 ± 0.61	0.54 ± 0.30	0.81 ± 0.87	0.64 ± 0.52	0.42 ± 0.26	0.38 ± 0.22	0.7674	0.7539
N2	3.57 ± 2.30	2.94 ± 0.82	1.94 ± 1.02	2.68 ± 1.14	2.83 ± 0.58	2.31 ± 1.06	0.3148	1.8383

Column effect indicate the *F* values of the two-way analysis of variance about the effect of plant domestication status (PDS) or tomato accession over each diversity index. N0, N1, and N2 are Hills' numbers. N0, indicate Different letters within the same column indicate significant differences among tomato accessions. Significant codes:  $P < 0.05$ , \*;  $P < 0.01$ , \*\*;  $P < 0.001$ , \*\*\*

**Table 3** Effect of plant domestication status (PDS) and tomato accession (Tomato) over the concentration of volatiles organic compounds (VOCs) emitted by cultivated and wild tomatoes.

VOC	A. Constitutive				B. Induced			
	Absolute		Relative		Absolute		Relative	
	PDS	Tomato	PDS	Tomato	PDS	Tomato	PDS	Tomato
3-hexanol	<b>5.7174</b>	<b>4.7815</b>	<b>5.7174</b>	<b>4.7815</b>	0.4185	7.4041	0.4185	<b>7.4041</b>
$\alpha$ -pinene	0.6105	0.9167	0.6105	0.9167	0.0307	0.5030	0.0307	0.5030
<i>o</i> -cymene	<b>12.2806</b>	0.9147	<b>12.2806</b>	0.9147	2.5978	4.2629	2.5978	<b>4.2629</b>
$\beta$ -myrcene	<b>7.0741</b>	<b>3.5251</b>	<b>7.0741</b>	<b>3.5251</b>	1	1	1	1
(+)-4-carene	<b>10.6729</b>	1.9313	<b>10.6729</b>	1.9313	2.4517	1.9470	2.4517	1.9470
$\alpha$ -phellandrene	0.3734	1.5950	0.3734	1.5950	0.0439	2.0429	0.0439	2.0429
$\alpha$ -terpinene	0.2674	0.6980			1	1		
<i>p</i> -cymene	<b>13.2344</b>	0.1349	<b>13.2344</b>	0.1349	0.7242	4.4124	0.7242	<b>4.4124</b>
$\beta$ -phellandrene	<b>7.4542</b>	1.2676	<b>7.4542</b>	1.2676	3.1571	3.7768	3.1571	3.7768
nonanal	<b>23.8031</b>	<b>3.2974</b>	<b>23.8031</b>	<b>3.2974</b>	0.0860	2.4302	0.0860	2.4302
decanal	<b>9.3318</b>	<b>6.6047</b>	<b>9.3318</b>	<b>6.6047</b>	<b>6.7308</b>	11.7715	6.7308	<b>11.7715</b>

Numbers are *F* values obtained from size and shape analysis of the absolute and relative volatile organic compounds (VOC) concentration emitted by tomato accessions. Bold numbers indicate a significant effect of categorical variables over the individual VOC concentration at  $P < 0.05$ .



**Table 4** Uniformity in volatile organic compounds (VOC) emission among individuals in terms of their absolute and relative concentration of volatiles emitted by cultivated and wild tomato plants

Emission	Concentration	Cultivated				Wild		Effect	
		Río Fuego	Río Grande	Castlemart	Mocorito	Ensenada	Potreriillo	PDS	Accession
Constitutive	Absolute	2.60±1.28 <sub>ab</sub>	1.96±0.82 <sub>ab</sub>	3.22±1.48 <sub>a</sub>	2.23±1.47 <sub>b</sub>	1.50±0.71 <sub>b</sub>	0.84±0.48 <sub>ab</sub>	38.879 ***	9.998 ***
	Relative	2.41±0.87 <sub>ab</sub>	2.25±1.15 <sub>ab</sub>	2.96±1.10 <sub>a</sub>	1.62±0.79 <sub>b</sub>	1.84±0.88 <sub>b</sub>	2.15±1.10 <sub>ab</sub>	18.999 ***	2.984 *
Fold-change	Absolute	2.60±1.28 <sub>a</sub>	1.96±0.82 <sub>a</sub>	3.22±1.48 <sub>a</sub>	2.23±1.47 <sub>ab</sub>	1.50±0.71 <sub>bc</sub>	0.84±0.48 <sub>c</sub>	38.879 ***	9.998 ***
	Relative	1.80±1.33 <sub>a</sub>	1.88±0.87 <sub>a</sub>	2.79±1.26 <sub>a</sub>	1.65±1.59 <sub>b</sub>	2.77±1.84 <sub>a</sub>	0.93±0.66 <sub>b</sub>	3.337	9.348 ***
Induced	Absolute	2.08±0.79 <sub>ab</sub>	2.25±1.02 <sub>ab</sub>	2.96±1.59 <sub>a</sub>	1.62±1.16 <sub>b</sub>	1.84±0.59 <sub>b</sub>	2.15±0.93 <sub>ab</sub>	0.116	8.912 ***
	Relative	2.06±0.75 <sub>ab</sub>	2.20±1.02 <sub>ab</sub>	2.28±1.47 <sub>a</sub>	3.12±1.15 <sub>c</sub>	1.49±0.62 <sub>b</sub>	1.89±0.96 <sub>ab</sub>	0.007	9.660 ***

Values indicate the level of uniformity of the VOC blend among individuals based on the Euclidian distances calculated from the linear discriminant analysis. The fold-change in concentration indicates the transition from a constitutive to an induced state. Size and shape analyses were performed in the constitutive and induced VOC emission. Column effect indicate the *F* values of the two-way analysis of variance about the effect of plant domestication status (PDS) or tomato accession over each concentration.

**Supplementary Table 1** Mean ( $\pm$  SD) relative concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato accessions before and after *Bactericera cockerelli* nymphs feeding.

VOC	Cultivated								Wild			
	Rio Fuego		Río Grande		Castlemart		Mocorito		Ensenada		Potrerillo	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
3-hexanol	5.47 $\pm$ 6.48	2.14 $\pm$ 6.06	5.73 $\pm$ 11.69	<b>0.83</b> $\pm$ <b>1.14</b>	11.65 $\pm$ 19.44	3.50 $\pm$ 6.68	0.70 $\pm$ 1.98	N.D.	3.80 $\pm$ 5.04	7.96 $\pm$ 6.46	2.06 $\pm$ 3.20	0.33 $\pm$ 0.93
$\alpha$ -pinene	0.51 $\pm$ 0.81	N.D.	0.31 $\pm$ 0.56	0.14 $\pm$ 0.41	0.07 $\pm$ 0.13	0.08 $\pm$ 0.21	0.07 $\pm$ 0.19	0.05 $\pm$ 0.15	0.53 $\pm$ 0.75	0.12 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.15	N.D.
<i>o</i> -cymene	0.75 $\pm$ 1.02	N.D.	8.53 $\pm$ 12.78	0.81 $\pm$ 0.72	0.85 $\pm$ 1.08	0.33 $\pm$ 0.94	N.D.	0.15 $\pm$ 0.29	0.14 $\pm$ 0.38	N.D.	N.D.	N.D.
$\beta$ -myrcene	0.02 $\pm$ 0.04	N.D.	N.D.	N.D.	2.02 $\pm$ 3.99	N.D.	N.D.	0.05 $\pm$ 0.15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(+)-4-carene	8.12 $\pm$ 5.76	7.05 $\pm$ 5.94	4.95 $\pm$ 5.48	<b>11.27</b> $\pm$ <b>3.52</b>	5.35 $\pm$ 6.74	5.89 $\pm$ 7.09	8.30 $\pm$ 3.96	15.73 $\pm$ 16.76	20.99 $\pm$ 19.55	13.86 $\pm$ 6.39	11.18 $\pm$ 5.27	9.61 $\pm$ 6.75
$\alpha$ -phellandrene	0.79 $\pm$ 0.99	<b>0.24</b> $\pm$ <b>0.69</b>	0.41 $\pm$ 1.06	0.95 $\pm$ 0.86	0.53 $\pm$ 0.88	0.17 $\pm$ 0.47	0.75 $\pm$ 1.04	0.91 $\pm$ 1.37	1.29 $\pm$ 0.91	0.40 $\pm$ 1.14	0.44 $\pm$ 0.82	0.36 $\pm$ 1.02
$\alpha$ -terpinene	0.06 $\pm$ 0.16	N.D.	N.D.	N.D.	0.13 $\pm$ 0.37	N.D.	N.D.	0.07 $\pm$ 0.20	0.03 $\pm$ 0.08	N.D.	N.D.	N.D.
<i>p</i> -cymene	0.92 $\pm$ 0.79	<b>N.D.</b>	1.93 $\pm$ 4.32	0.64 $\pm$ 0.43	10.56 $\pm$ 25.56	0.12 $\pm$ 0.35	0.63 $\pm$ 1.53	0.16 $\pm$ 0.30	0.17 $\pm$ 0.49	0.32 $\pm$ 0.80	0.29 $\pm$ 0.54	N.D.
$\beta$ -phellandrene	58.93 $\pm$ 25.05	70.8 $\pm$ 22.51	18.46 $\pm$ 17.63	<b>77.38</b> $\pm$ <b>8.99</b>	50.56 $\pm$ 30.35	78.47 $\pm$ 27.90	75.77 $\pm$ 21.96	71.94 $\pm$ 13.76	70.73 $\pm$ 18.31	77.33 $\pm$ 5.78	64.72 $\pm$ 23.02	76.57 $\pm$ 14.12
nonanal	6.78 $\pm$ 7.50	<b>0.43</b> $\pm$ <b>1.22</b>	11.08 $\pm$ 4.65	<b>0.74</b> $\pm$ <b>1.12</b>	2.32 $\pm$ 3.02	2.66 $\pm$ 3.92	2.98 $\pm$ 6.19	2.62 $\pm$ 5.60	N.D.	N.D.	1.13 $\pm$ 2.33	0.13 $\pm$ 0.37
decanal	17.66 $\pm$ 22.58	19.2 $\pm$ 23.42	58.36 $\pm$ 23.23	<b>7.22</b> $\pm$ <b>11.24</b>	9.80 $\pm$ 10.65	22.26 $\pm$ 18.57	11.60 $\pm$ 18.12	14.28 $\pm$ 15.67	2.34 $\pm$ 6.55	N.D.	9.49 $\pm$ 6.67	13.00 $\pm$ 16.61

**Supplementary Table 2** Effect of plant domestication status (PDS) and tomato accession (Tomato) over the fold-change in the relative concentration of volatiles organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomatoes.

VOCs	PDS	Tomato
3-hexanol	<b>6.2384</b>	<b>4.5047</b>
$\alpha$ -pinene	0.5098	1.4650
<i>o</i> -cymene	0.7648	2.5532
$\beta$ -myrcene	<b>7.6087</b>	<b>3.9562</b>
(+)-4-carene	0.8642	1.4813
$\alpha$ -phellandrene	0.5660	2.1549
$\alpha$ -terpinene	0.3333	0.6667
<i>p</i> -cymene	0.0051	<b>3.4443</b>
$\beta$ -phellandrene	<b>4.0894</b>	<b>3.4569</b>
nonanal	<b>7.1253</b>	1.9372
decanal	0.0592	1.0035

Values represent the *F* value that resulted from one-way analysis of variances with PDS and Tomato as independent variables. Values in bold indicate a significant effect over the VOC concentration. In the constitutive and relative concentration,  $\alpha$ -terpinene was not included in the analysis (see methods).

**Supplementary Table 3** Coefficients of linear discriminants of fold-changes in concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato accessions.

VOC	Absolute			Relative		
	LD1	LD2	LD3	LD1	LD2	LD3
3-hexanol	<b>-1.16</b>	0.42	0.00	-0.04	-0.27	0.01
$\alpha$ -pinene	-0.53	<b>-1.08</b>	<b>-0.81</b>	<b>-1.17</b>	<b>0.98</b>	-0.88
<i>o</i> -cymene	0.18	1.13	-0.46	0.29	<b>-0.24</b>	<b>-1.50</b>
$\beta$ -myrcene	0.46	<b>2.40</b>	-0.53	<b>1.17</b>	<b>-2.08</b>	<b>1.00</b>
(+)-4-carene	0.00	0.02	-0.04	0.05	0.00	0.01
$\alpha$ -phellandrene	<b>1.77</b>	-0.46	<b>0.27</b>	0.50	0.30	0.90
$\alpha$ -terpinene	0.41	0.65	-0.38	0.45	-1.22	-0.32
<i>p</i> -cymene	0.13	0.18	0.22	0.83	0.15	-0.50
$\beta$ -phellandrene	0.06	-0.01	0.01	0.12	0.07	-0.06
nonanal	-0.37	0.20	-0.02	-0.38	-0.34	-0.68
decanal	0.03	-0.09	-0.08	-0.03	0.08	-0.03
Proportion of trace	49	27	11	51	28	12

Values represent the *F* value that resulted from one-way analysis of variances with PDS and Tomato as independent variables. Values in bold indicate a significant effect over the VOC concentration. In the constitutive and relative concentration,  $\alpha$ -terpinene was not included in the analysis (see methods).

**Supplementary Table 4** Coefficients of linear discriminants of size and shape concentration analysis of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato accessions

VOC	Constitutive						Induced					
	Absolute			Relative			Absolute			Relative		
	LD1	LD2	LD3	LD1	LD2	LD3	LD1	LD2	LD3	LD1	LD2	LD3
3-hexanol	0.01	-0.12	<b>-0.30</b>	-0.01	0.16	0.29	<b>0.26</b>	-0.04	-0.01	<b>-0.26</b>	0.03	0.01
$\alpha$ -pinene	-0.01	0.01	0.09	0.03	-0.03	0.14	-0.01	0.16	<b>-0.20</b>	0.01	-0.14	<b>0.20</b>
<i>o</i> -cymene	<b>-0.40</b>	-0.11	-0.08	0.39	0.13	0.03	-0.10	<b>0.35</b>	0.05	0.10	<b>-0.32</b>	-0.05
$\beta$ -myrcene	<b>0.35</b>	<b>-0.54</b>	<b>0.52</b>	-0.27	0.39	-0.50	0.12	0.12	0.35	-0.12	-0.16	-0.35
(+)-4-carene	0.16	0.11	0.17	-0.14	-0.15	-0.12	0.02	0.21	0.05	-0.02	-0.23	-0.05
$\alpha$ -phellandrene	0.28	-0.27	0.03	-0.24	0.24	-0.03	-0.02	0.13	0.01	0.02	-0.18	-0.02
$\alpha$ -terpinene	-0.11	0.20	-0.24				-0.01	-0.21	-0.01			
<i>p</i> -cymene	-0.14	0.08	0.07	0.12	-0.08	-0.08	0.04	0.07	0.20	-0.04	-0.06	-0.20
$\beta$ -phellandrene	-0.05	<b>0.65</b>	-0.20	-0.04	-0.52	0.16	0.13	<b>-1.80</b>	<b>0.57</b>	-0.13	<b>1.99</b>	<b>-0.56</b>
nonanal	-0.25	0.18	-0.08	0.23	-0.15	0.09	-0.07	0.01	-0.08	0.07	0.01	0.08
decanal	-0.08	0.02	0.15	0.09	-0.07	-0.10	<b>-0.28</b>	-0.05	0.00	<b>0.28</b>	0.05	0.00
Proportion of trace	0.54	0.25	0.16	0.56	0.15	0.02	60	22	12	61	21	12

Values in bold indicate contributed the most to tomato accessions discrimination. In the constitutive and relative concentration,  $\alpha$ -terpinene was not included in the analysis (see methods).

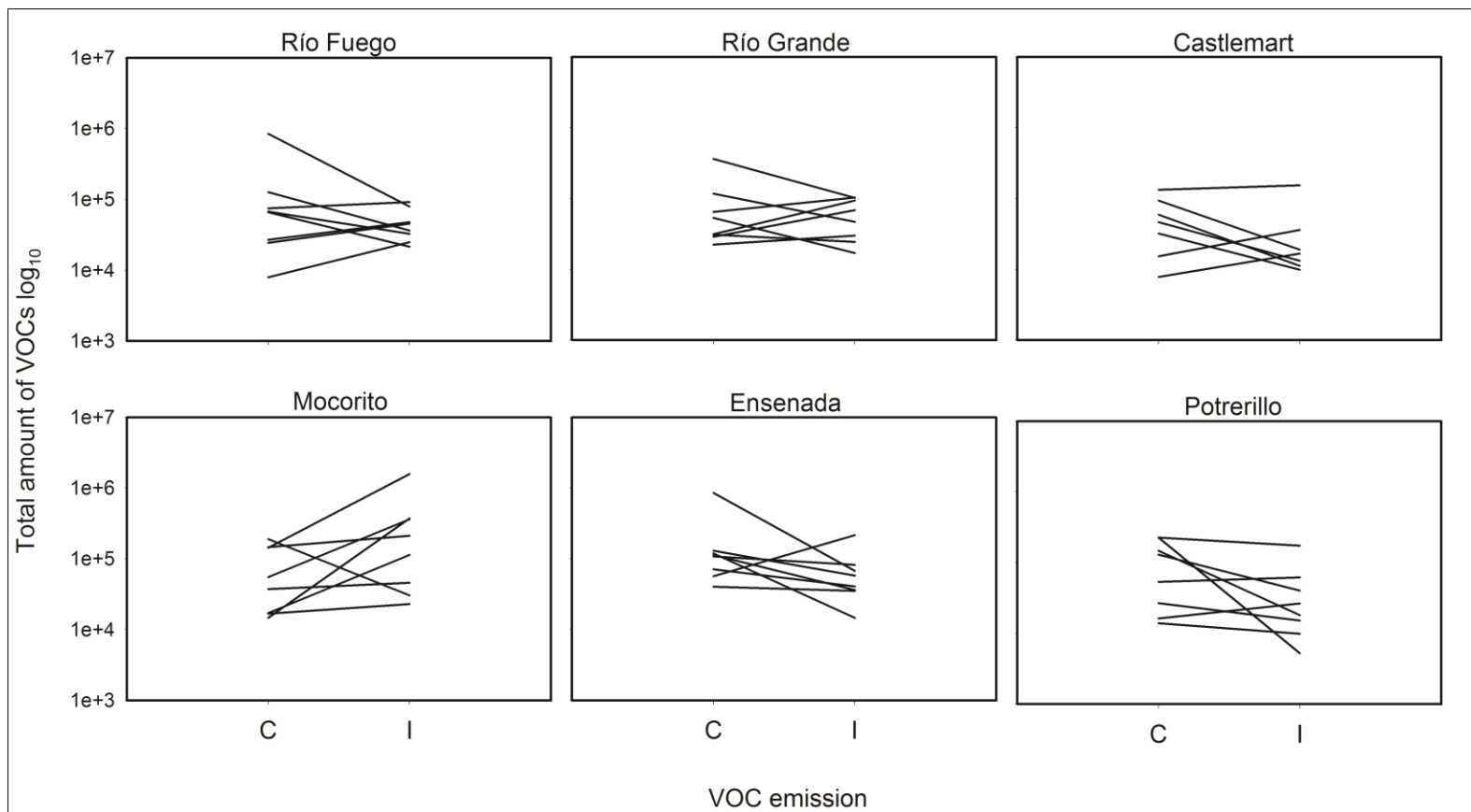


Figure 1. Total amount of volatile organic compounds (VOC) emitted by individual tomato plants before (C) and after (I) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs.

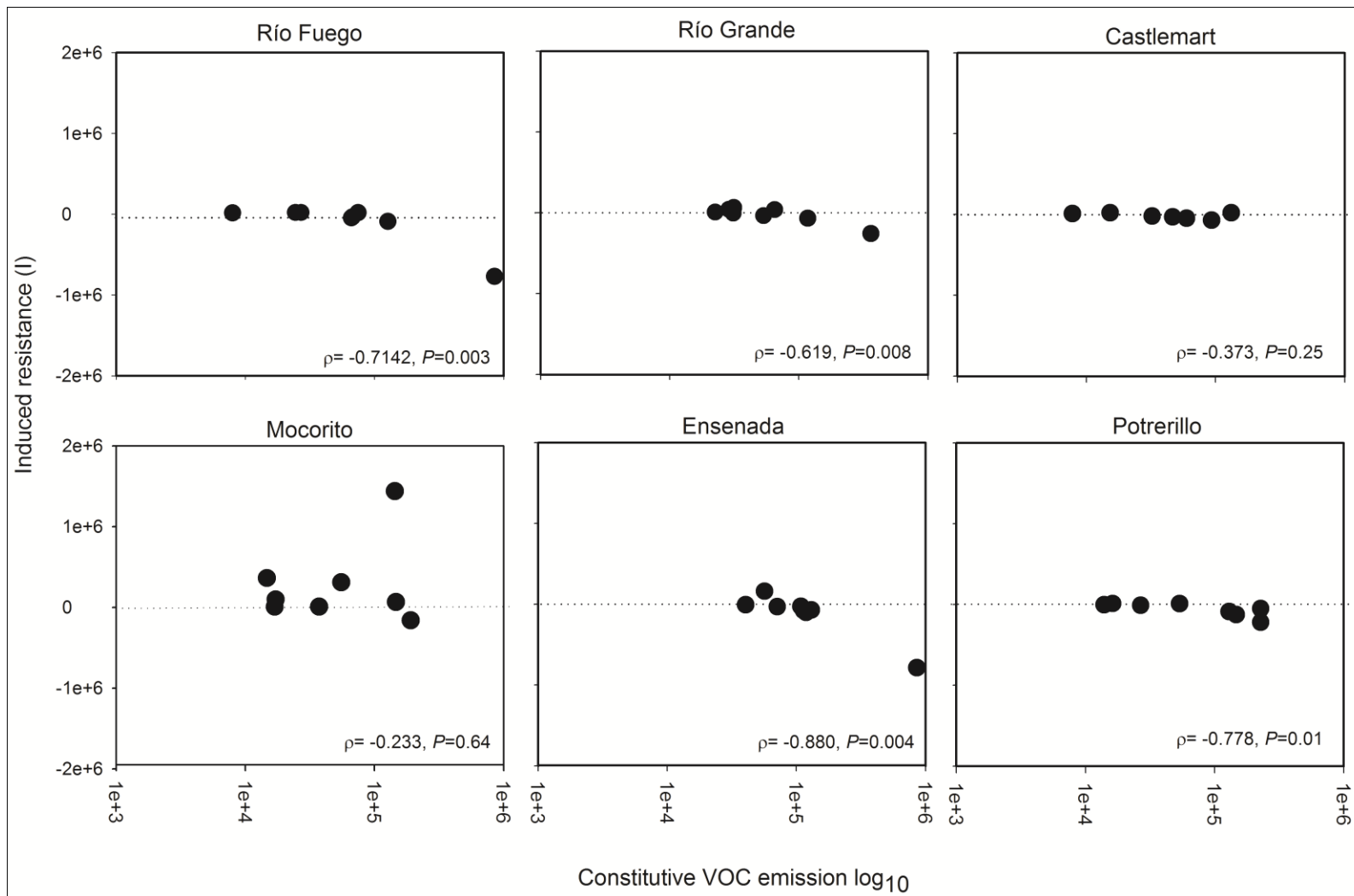


Figure 2. Correlation between the constitutive (arbitrary units of volatile abundance) and induced (the difference in resistance between damaged and undamaged plants (see methods)) volatile organic compounds (VOC) emission of cultivated and wild tomato plants.



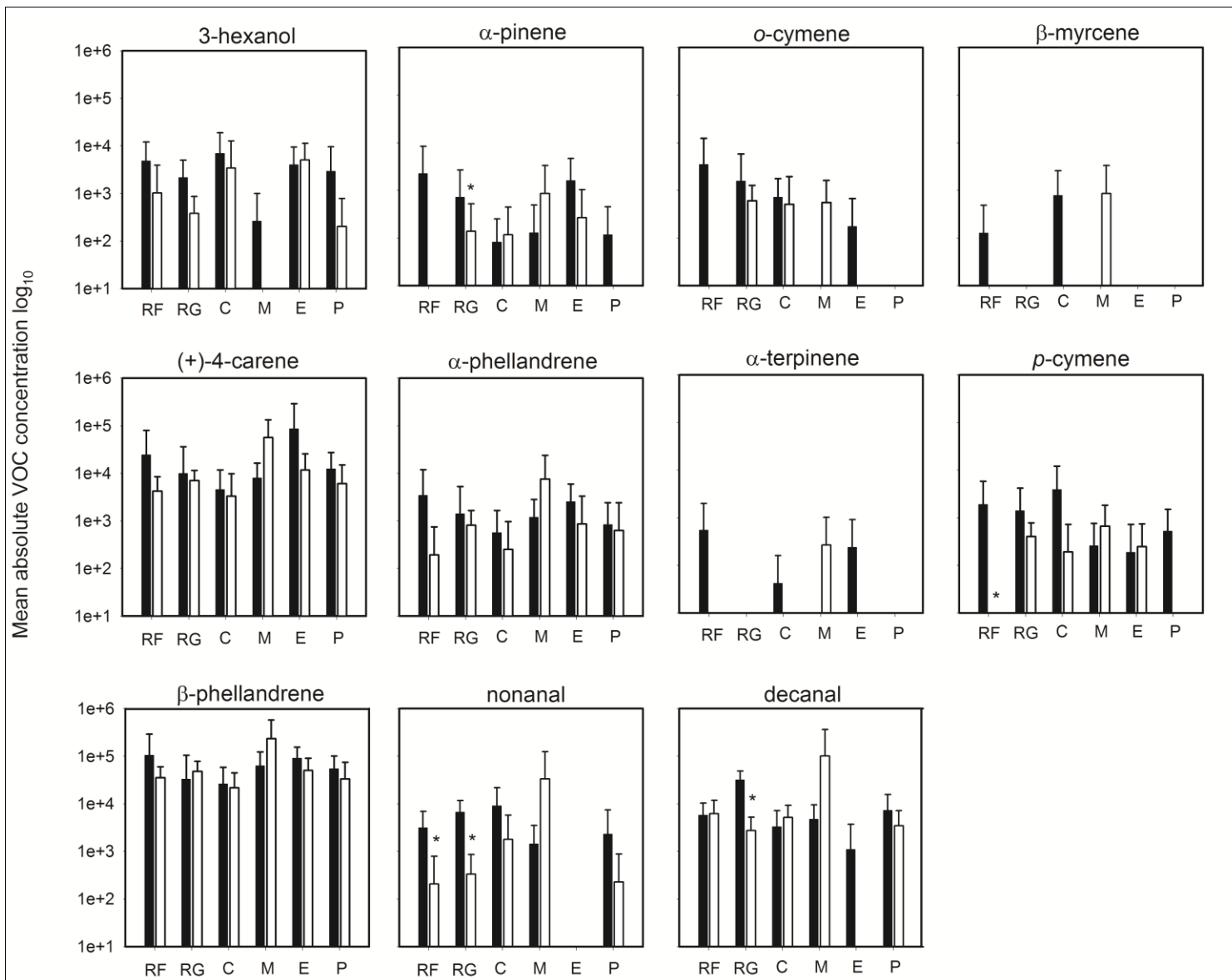


Figure 3. Mean ( $\pm$  SD of eight plants) absolute concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato accessions before (black bars) and after (white bars) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. Cultivated accessions: RF, Río Fuego; RG, Río Grande; C, Castlemart. Wild accessions: M, Mocerito; E, Ensenada; P, Potrerillo. Asterix indicate significant differences in VOC emission before and after damage (Wilcoxon or paired-*t* test at  $P < 0.05$ ).

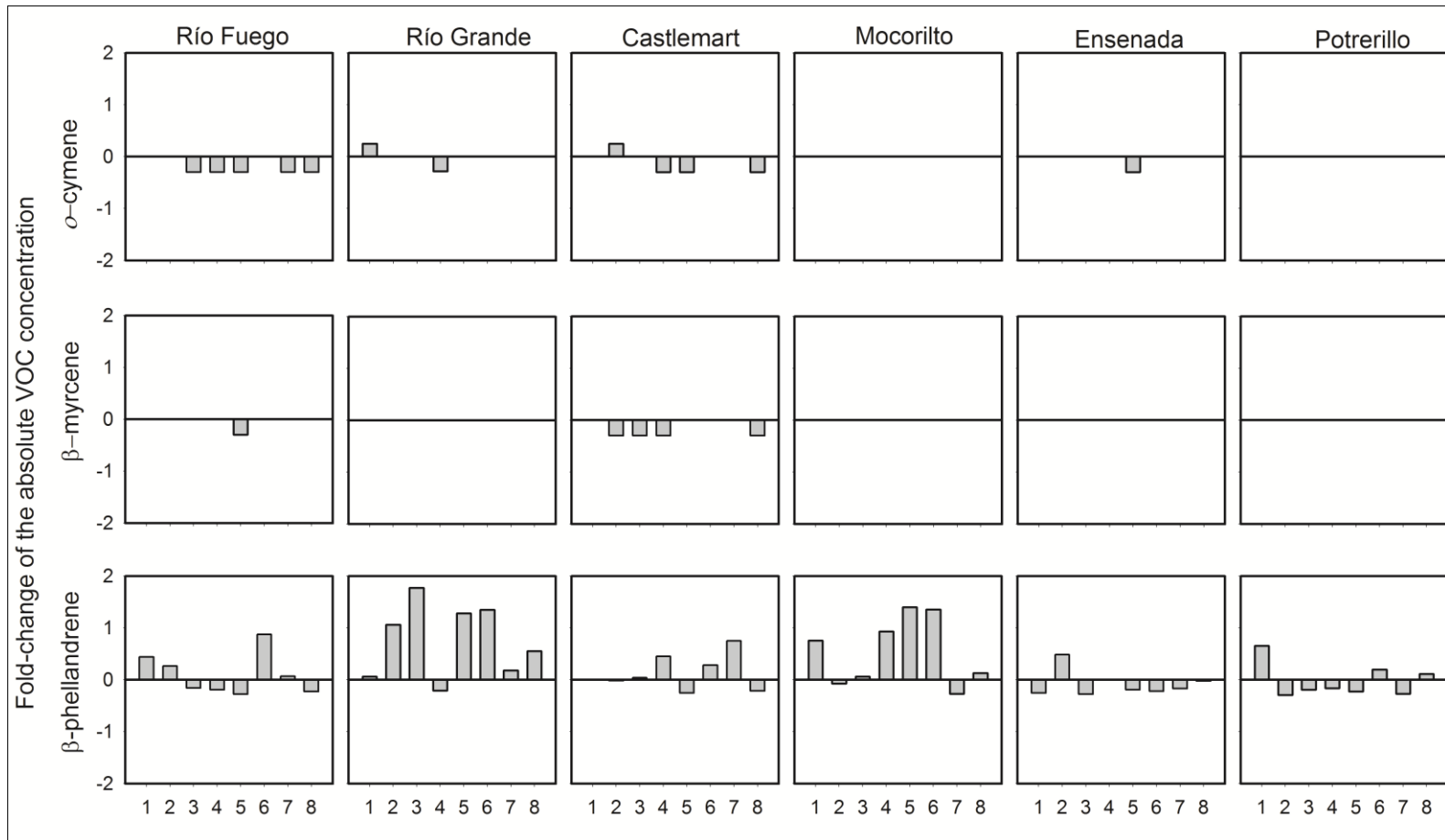


Figure 4. Fold-change of the absolute concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato individuals. Fold-change represents the transition from a constitutive to an induced state and was calculated by the formula:  $(T_2 - T_1) / T_1$  where  $T_1$  represents the VOC emission before damage and  $T_2$  represents the VOC emission after damage by *Bactericera cockerelli* nymphs.

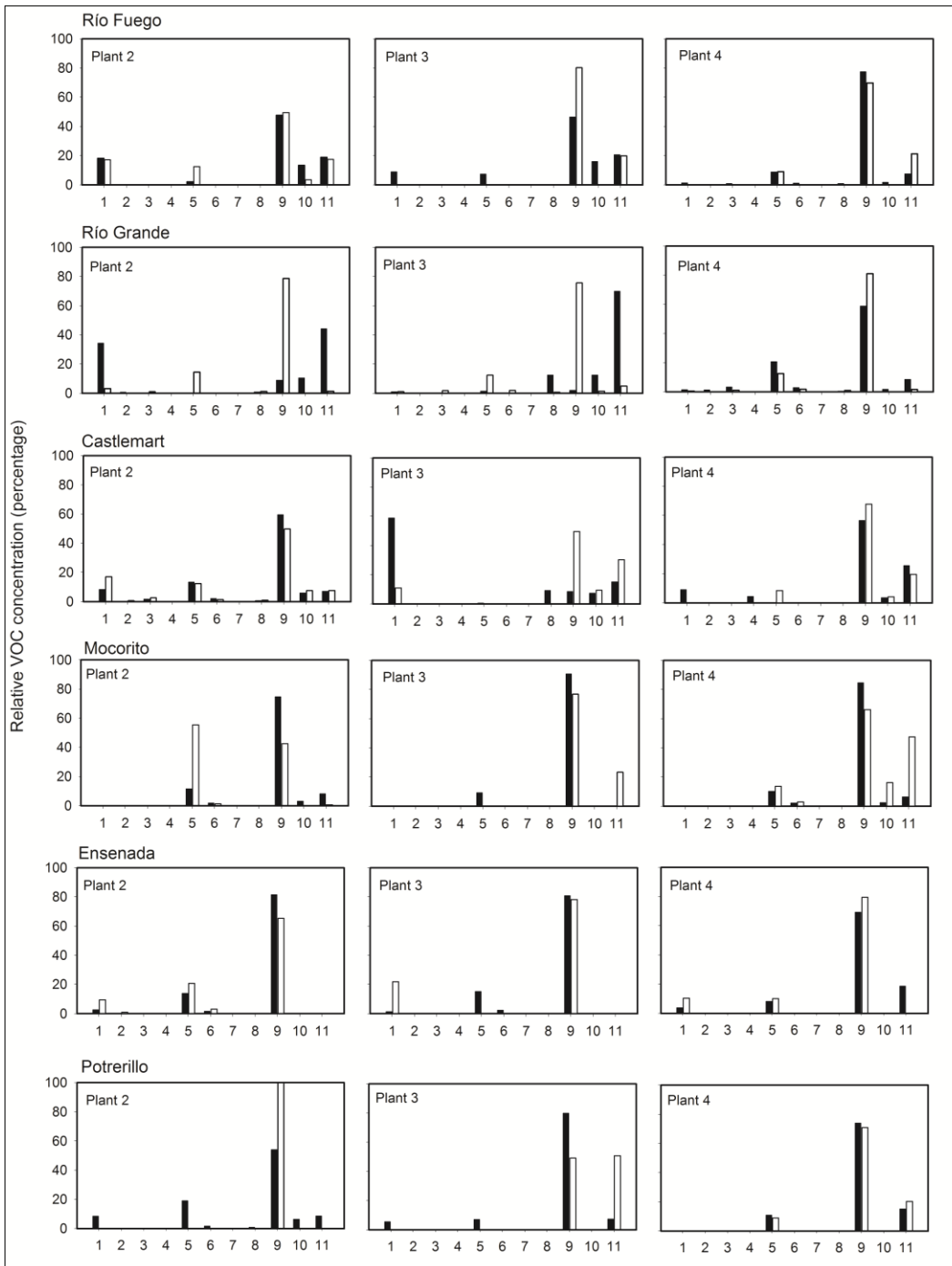
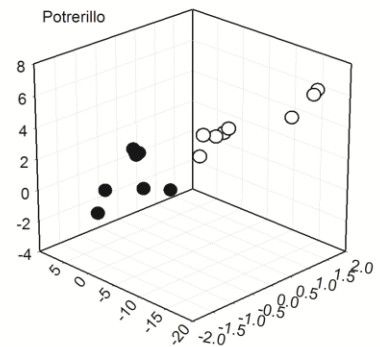
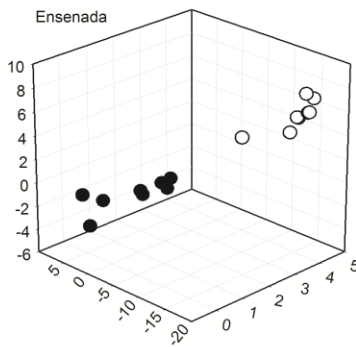
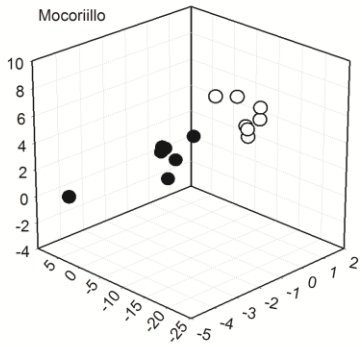
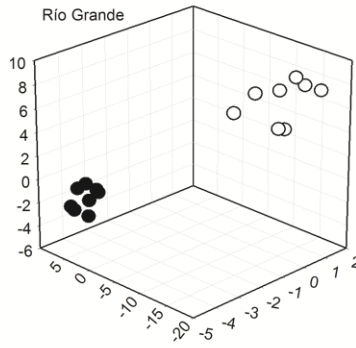
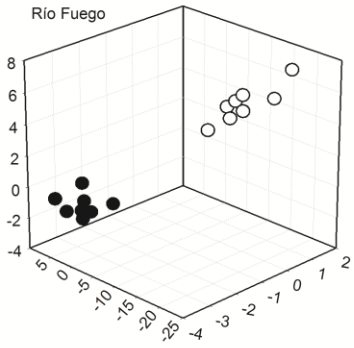


Figure 5. Individual relative concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by three cultivated and three wild tomato individuals before (black bars) and after (white bars) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. Plants 2, 3 and 4 within each tomato accession were chosen to exemplify individual variation.

**A**



**B**

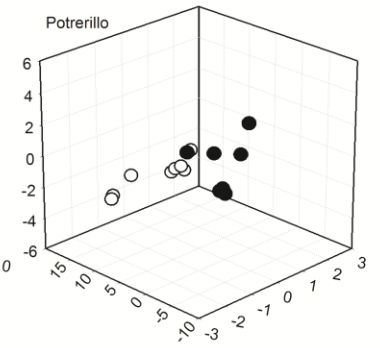
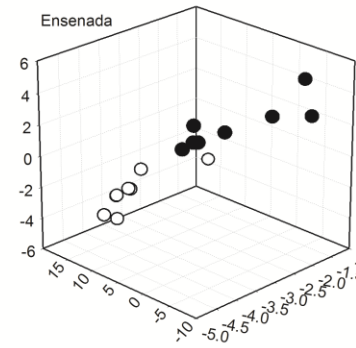
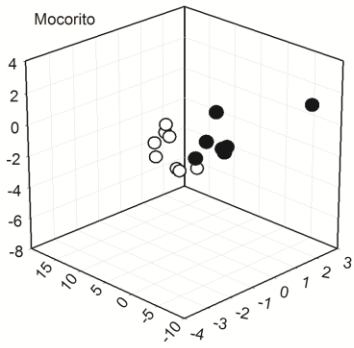
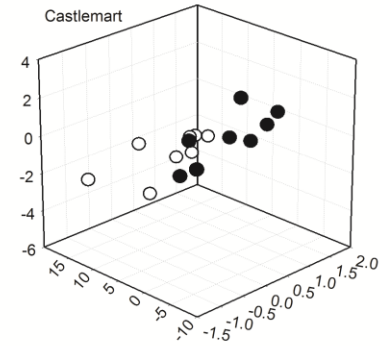
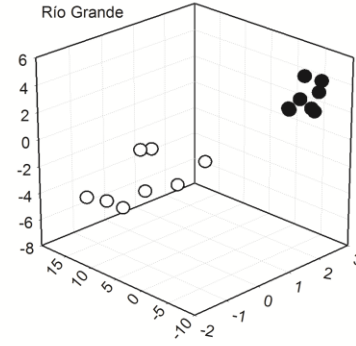
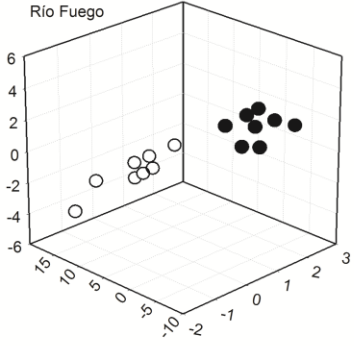
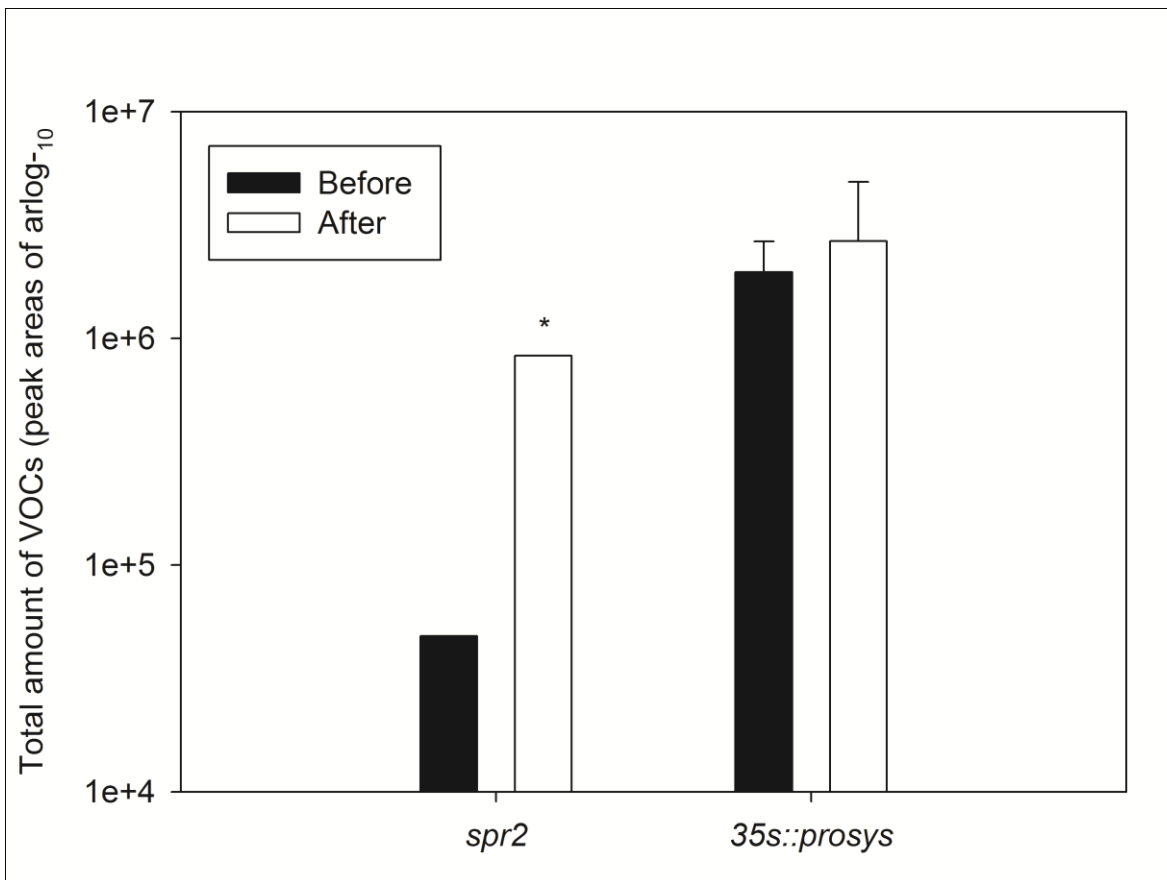
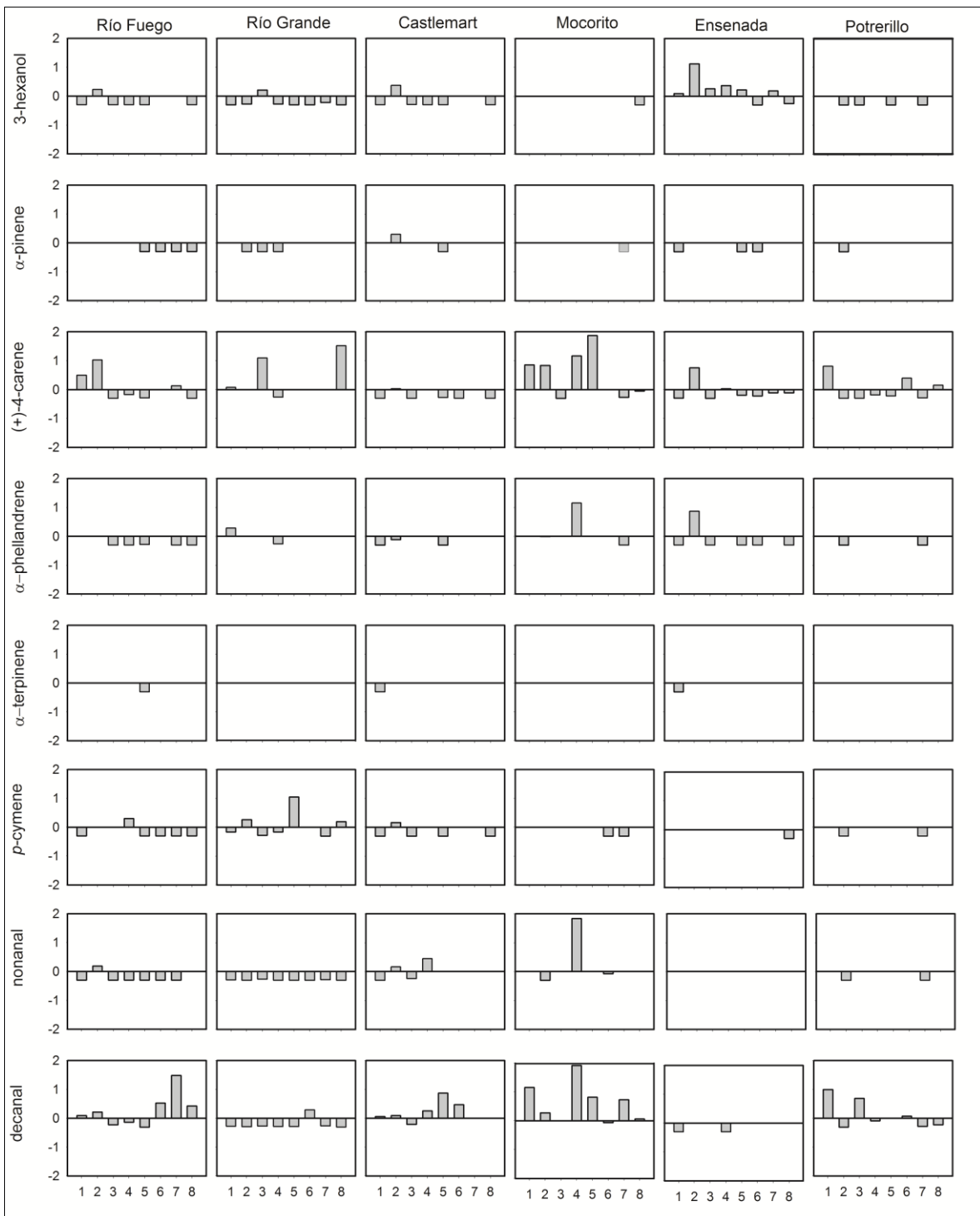


Figure 6. Linear discriminant analysis of the absolute (A) and relative (B) concentration of volatile organic compounds (VOCs) of tomato individuals before (black points) and after (white points) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. For visual purposes, we extracted the coordinates of individuals before and after each type of damage. Thus, each plot represents the discrimination of damaged individuals against themselves before and after damage. The first three linear discriminant of the absolute and relative VOC concentration accounted for at least 90% of the variation.





Supplementary Figure 1. Mean ( $\pm$  SD of eight plants) absolute concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato accessions before (black bars) and after (white bars) damage by *Bactericera cockerelli* nymphs. Asterix indicates significant differences between constitutive and induced VOC emission (paired-*t* test at  $P < 0.5$ ). *spr2*, mutant suppressor of prosystemin-mediated responses2; *35S::prosys*, transgenic *35S::prosystemin*.



Supplementary Figure 2. Fold-change of the absolute concentration of volatile organic compounds (VOC) emitted by cultivated and wild tomato individuals. Fold-change represents the transition from a constitutive to an induced state and was calculated by the formula:  $T_2 - T_1 / T_1$  where  $T_1$  represents the VOC emission before damage and  $T_2$  represents the VOC emission after damage by *Bactericera cockerelli* nymphs.

## **Capítulo cuatro**

---

“¿EL PARASITOIDE *Tamarixia triozae* USA LOS  
VOLÁTILES FOLIARES DEL JITOMATE PARA  
LOCALIZAR A SU PRESA? “

## ¿EL PARASITOIDE *Tamarixia triozae* USA LOS VOLÁTILES FOLIARES DEL JITOMATE PARA LOCALIZAR A SU PRESA?

### DOES THE PARASITOID *Tamarixia triozae* USE TOMATO VOLATILES IN HOST FINDING?

Bautista-Lozada Alicia<sup>1,2</sup>, Espinosa-García Francisco Javier<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México;

<sup>2</sup>Laboratorio de Ecología Química, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta, Morelia, Michoacán. MÉXICO, C.P. 58190 Tel. +52 (443) 3 22 27 21, Fax: +52 (443) 322-27-19. [abautista@cieco.unam.mx](mailto:abautista@cieco.unam.mx)\*, [espinosa@cieco.unam.mx](mailto:espinosa@cieco.unam.mx).

\*Autor de correspondencia

#### RESUMEN

La resistencia química de la planta tiene una función importante en las interacciones entre insectos plaga y sus enemigos naturales. Las plantas emiten compuestos volátiles en respuesta a herbivoría que pueden atraer a insectos depredadores o parasitoides. Por lo tanto, determinar si los volátiles de los cultivos atraen a los enemigos naturales de las plagas que los atacan permitiría incluir la resistencia de la planta en programas de control biológico. El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de hembras de *Tamarixia triozae* (Hymenoptera; Eulophidae) hacia volátiles de jitomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Río Fuego) inducidos por ninfas de *Bactericera cockerelli* (Hemiptera; Psyllidae). El diseño experimental fue completamente al azar con tres tratamientos: plántulas no atacadas, atacadas (con 50 ninfas 5 d) y expuestas (colocadas al lado de las plantas atacadas durante el tratamiento de inducción). Cada tratamiento fue replicado tres veces y analizado mediante un ANDEVA. No hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración absoluta y relativa de los volátiles de plántulas entre tratamientos, ni en la elección de las avispas entre los volátiles de plantas no atacadas y atacadas ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, las avispas mostraron preferencia ( $p = 0.04$ ) por los volátiles de plantas expuestas sobre las atacadas cuando ambos olores se presentaron juntos. Los resultados muestran que hembras de *T. triozae* no utilizan volátiles inducidos de plantas atacadas por su hospedero *B. cockerelli*. Los cambios en la emisión de volátiles inducidos por *B. cockerelli* podrían no ser adaptativos para las plantas de jitomate.

Palabras clave: Interacciones tritróficas, volátiles, tomate, psílidos, comportamiento.

#### INTRODUCCIÓN

El control biológico de plagas agrícolas de jitomate requiere de nuevas herramientas para el diseño e implementación de programas de manejo de plagas que reduzcan la

aplicación de agroquímicos (Kennedy, 2003). El psílido *Bactericera cockerelli* Sulc. (Hemiptera; Psyllidae), es una de las principales plagas del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en México y EEUU. (Liu y Trumble, 2006). La avispa parasitoide *Tamarixia triozae* (Hymenoptera; Eulophidae) es su principal agente de control biológico cuya producción comercial está destinada a la liberación masiva en campos de cultivo. Es necesario entender cuáles son los mecanismos por los cuales las avispas de *T. triozae* encuentran a sus hospederos, ninfas de *B. cockerelli*, para identificar los factores que facilitan este proceso una vez que han sido liberadas. En este contexto, se ha demostrado (Ninkovic *et al.* 2011) que el uso de compuestos volátiles orgánicos emitidos por plantas infestadas puede ser importante en la localización de una planta dañada y en la permanencia de los insectos benéficos dentro de un campo de cultivo.

Las plantas emiten compuestos volátiles orgánicos cuya mezcla cambia después de la herbivoría, la cual puede resultar atractiva para insectos parasitoides y depredadores (Turlings *et al.*, 1995, 2004). Esta relación entre la planta e insectos depredadores puede ser mutualista si ambas partes se benefician: por parte de la planta, la emisión inducida por herbivoría atrae a insectos depredadores disminuyendo el efecto negativo de la herbivoría sobre las plantas y, por parte de insectos depredadores, éstos asocian el olor de la planta con su presa, lo que facilita el proceso de localización (Turlings *et al.*, 2000; Arimura, 2005). Esta relación mutualista es considerada adaptativa si ambas partes aumentan su adecuación (Turlings y Wäckers, 2004).

La emisión de volátiles inducidos por ninfas *B. cockerelli* produce mezclas específicas en plantas cultivadas y silvestres de jitomate (Bautista-Lozada, A (2013)<sup>[1]</sup>), donde hay gran variación en olor en entre los individuos de jitomate atacados por el psílido (Bautista-Lozada y Espinosa-García, <sup>[2]</sup>). En este trabajo pusimos prueba la hipótesis de que hembras de *T. triozae* responden diferencialmente a los cambios en la emisión de volátiles de jitomate inducidos por la alimentación de ninfas de *B. cockerelli*.

<sup>1</sup> Emisión de volátiles de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) inducidos por herbivoría: estado de domesticación de la planta e identidad del herbívoro como factores condicionantes de variación. Tesis de doctorado, 2013. Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>2</sup> Bautista-Lozada A., and F. J. Espinosa-García. 2013. Odor uniformity among tomato individuals in response to herbivory depends on insect species. PONE. DOI:10.1371/journal.pone.0077199.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Desarrollo de material vivo

Se utilizaron plantas de jitomate de la variedad Río Fuego las cuales se germinaron en almácigos con sustrato COSMOPEAT (Canadian Sphagnum Peat Moss) en condiciones de invernadero ( $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4$  y 60 % de humedad relativa durante las estaciones de primavera y verano). Posteriormente, se trasplantaron a vasos de plástico de 256 mL con el mismo sustrato. Las ninfas de *B. cockerelli* se obtuvieron a partir de una colonia establecida en el laboratorio utilizando plantas de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) como hospederas. Para esto, se construyó una jaula de madera forrada con tela de organza translúcida de 100 x 70 x 70 cm (largo x ancho x alto), para permitir que el psílido tuviera el suficiente espacio y evitar que escapara.

Las ninfas parasitadas fueron donadas por la empresa de reproducción de insectos benéficos KOPPERT México S. A. de C. V. Las avispas emergidas se mantuvieron en envases de plástico de 2 L con el fondo forrado de tela organza translúcida donde se colocaron gotas de miel para su alimentación. Las hembras adultas utilizadas en los experimentos de comportamiento tenían entre 2 y 6 días de emergidas de la ninfa de *B. cockerelli* (Sulc.). Antes de las pruebas de olfatometría, las avispas se separaron por sexo y se mantuvieron a  $9\text{ }^{\circ}\text{C}$  al menos 12 h, en ayuno. La separación de sexos se realizó mediante la identificación de características morfológicas de las antenas de acuerdo al criterio utilizado por Onagbola *et al.* (2009) para individuos de la especie *Tamarixia radiata*, especie hermana de *T. triozae*.

### Colecta e identificación de volátiles

#### Tratamientos

Para los tratamientos se utilizaron plantas de jitomate de 3 a 4 hojas completamente desarrolladas de acuerdo a los métodos de Thaler *et al.* (2002) y Sánchez-Hernández *et al.* (2005). Las plantas fueron asignadas aleatoriamente a los diferentes tratamientos con tres repeticiones por tratamiento en el caso de la cuantificación de volátiles (Cuadro 1). Este número de repeticiones es común en trabajos donde se recolectan volátiles (Birkett *et al.*, 2003; Raghava *et al.*, 2010). Para las pruebas de olfatometría se utilizó un extracto obtenido de una sola recolección de cada tratamiento.

**Cuadro 1. Tratamientos y obtención de extractos de plantas de jitomate para cuantificación y pruebas de olfatometría.**

Tratamientos	Grupos de plantas Río Fuego para:	
	Cuantificación de volátiles	Olfatometría
Plantas atacadas: 50 ninfas alimentándose durante 5 d	1ra recolección, N= 8	N= 8
	2da. recolección, N= 6	
	3era. recolección, N= 6	
Plantas expuestas a plantas atacadas: plantas colocadas a 15 cm de las plantas atacadas durante el tratamiento <sup>†</sup>	1ra. recolección, N= 8	N= 8
	2da. recolección, N= 6	
	3era. recolección, N= 6	
Plantas no atacadas colocadas a 8 m de plantas atacadas y expuestas	1ra. recolección, N= 8	N= 8
	2da. recolección, N= 8	
	3era. recolección, N= 8	

<sup>†</sup>Este testigo se incluye porque en condiciones naturales las plantas vecinas no dañadas están espacialmente junto a plantas dañadas y los insectos depredadores pueden responder a ellas (Ninkovic *et al.*, 2011).

#### Colecta de compuestos volátiles orgánicos

Las plantas fueron colocadas dentro de una estructura de alambre (15 cm x 45 cm) cubiertas con dos bolsas para hornear (material Polietilentereftalato, marca Reynolds, 406 mm x 444 mm, EE. UU.), formando una cámara alrededor de las plantas. Se utilizaron cartuchos de carbón activado para la colectar los volátiles. Para cada cartucho se utilizaron 200 mg de carbón activado, el cual fue introducido en pipetas Pasteur previamente lavadas con agua y jabón, con algodón en los extremos para evitar fugas. La punta de las pipetas se cortó para ajustar la longitud de los cartuchos a 14.5 cm. Los cartuchos fueron previamente lavados con una mezcla de Hexano y Acetato de etilo 1:1. Para eliminar los disolventes de este lavado, los cartuchos fueron puestos en un horno a 100 °C por 12 h.

En cada colecta se usaron dos cartuchos: uno, para la colecta de volátiles y otro, como trampa para purificar el aire. El cartucho de colecta se conectó al vacío mediante un tubo de



teflón de 1 cm de diámetro interno, controlando el flujo de aire a  $65 \text{ mL min}^{-1}$  (Flujómetro modelo TMR1-010071, Cole Palmer, EE. UU.). Este flujo se mantuvo durante 5 h (de 11:00 a 16:00 h) por el cual pasó un total de 18 L de aire. El extracto se obtuvo lavando el cartucho con 1 mL de solución de n-Tetradecano ( $76 \text{ pg mL}^{-1}$  disuelto en cloruro de metileno calidad HPLC (marca Fermont)) como estándar interno. Después, el extracto fue concentrado a  $200 \text{ }\mu\text{L}$ , de los que se inyectaron  $2 \text{ }\mu\text{L}$  en el cromatógrafo de gases.

#### Identificación de compuestos volátiles orgánicos

Se inyectaron  $2 \text{ }\mu\text{L}$  de extracto concentrado en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un detector de masas Agilent 5973 Network. El cromatógrafo está equipado con una columna capilar Equity<sup>TM</sup>-1(Supelco) con 100% polidimetilsiloxano de 30 m. de largo,  $0.32 \text{ mm}$  de diámetro y  $0.5 \text{ }\mu\text{m}$  de grosor de la película. Las condiciones de temperatura del cromatógrafo para el análisis de los volátiles fueron: inyector,  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura inicial del horno  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , que se incrementó  $1.5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  hasta  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura que se mantuvo 3 min, para después incrementarse a  $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , hasta  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura que se mantuvo por 5 min. La temperatura de la línea de transferencia del cromatógrafo al espectrómetro de masas fue de  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ . El espectro de masas fue tomado a  $70 \text{ eV}$  en modo EI con una velocidad de escáner de 1 de 35 a  $500 \text{ m/z}$ . Usamos Helio como gas acarreador a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  a  $12.57 \text{ psi}$  de presión dentro de la columna.

El criterio para la identificación de los compuestos se basó en el tiempo de retención de los compuestos. Para los análisis estadísticos sólo se tomó en cuenta aquéllos compuestos que aparecieran mínimo tres veces en los cromatogramas de plantas sometidas a cada tratamiento. Para la identificación de los compuestos, se utilizó el tiempo de retención en el algoritmo Kovatz (IK) usando una serie de n-alcanos ( $\text{C}_8\text{-C}_{20}$ ) como estándar en la columna Equity 1. Así mismo, la identidad de los compuestos se confirmó mediante comparación de los espectros de la muestra con los de la biblioteca NIST MS 2.0.

#### Olfatometría de dos vías

Se utilizó un olfatómetro de dos vías o Y de  $10 \text{ cm}$  de largo para el cuerpo,  $5 \text{ cm}$  para cada brazo y  $1 \text{ cm}$  de diámetro interno. Éste fue colocado sobre una mesa color negro en un cuarto oscuro con una lámpara de luz blanca ( $515 \text{ lúmenes}$ ) a  $15 \text{ cm}$  frente él. Se hizo pasar un flujo de  $65 \text{ mL min}^{-1}$  de aire a través del olfatómetro mediante un sistema de mangueras de silicona (marca Brand,  $0.9 \text{ cm}$  diámetro interno, Alemania) para que arrastrara los volátiles de los extractos hacia el cuerpo del olfatómetro. Los extractos fueron colocados en rectángulos de papel filtro ( $0.5 \times 2 \text{ cm}$ ) dentro de pipetas Pasteur, conectadas a la vez a los brazos del olfatómetro por su extremo más ancho. El aire jalado por vacío pasó a través de un cartucho de carbón activado conectado a un matraz Kitasato con capacidad de  $250 \text{ mL}$  con  $100 \text{ mL}$  de agua corriente; este aire pasó después por la pipeta Pasteur con el papel filtro impregnado del extracto hasta la boca del olfatómetro. Se colocaron  $2 \text{ }\mu\text{L}$  del extracto

en los pedazos de papel filtro y donde se dejó por aproximadamente un minuto antes de conectar las pipetas a los brazos del olfatómetro. Los extractos se colocaron antes de introducir a las avispas al olfatómetro. Una vez colocada una hembra de *T. triozae* en el olfatómetro, el sistema se cerró conectando el flujómetro a la boca de éste, después se encendió el sistema de vacío.

Se realizaron dos observaciones simultáneas de 5 min durante las cuales las avispas debían elegir uno de los brazos. La preferencia de las avispas por alguna de las fuentes de olor fue registrada cuando pasaron más de un minuto dentro de uno de los brazos dentro del tiempo de observación. La prueba se consideró como no elección si la avispa no permanecía más de 1 min o permaneció inmóvil en el cuerpo del olfatómetro. Después de cada observación se cambió la posición de las fuentes de olor para evitar un efecto de la posición del olfatómetro. Los olfatómetros fueron reemplazados por otros limpios después de cinco observaciones continuas.

#### Análisis estadísticos

Para analizar la elección de las avispas, se realizó una prueba binomial utilizando únicamente el número de individuos que hizo una elección. En la prueba binomial se analizaron los datos de los individuos que optaron por uno de los brazos en cada prueba contra el total con una probabilidad de 0.5 de elegir uno de los brazos. Se analizó la emisión total de volátiles así como su concentración absoluta y relativa mediante una prueba de análisis de varianza de una vía (ANDEVA). Los valores de emisión total y de concentración absoluta fueron transformados a su logaritmo natural para el análisis; los valores de concentración relativa fueron transformados calculando el arcoseno de la raíz de cada valor y analizados con un análisis de varianza de una vía. En caso de no cumplir con los parámetros de normalidad u homocedasticidad, los datos de porcentaje fueron analizados con una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R 2.14.1.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Identidad de compuestos volátiles de hojas de jitomate

Se encontraron los siguientes compuestos volátiles orgánicos en el perfil de plantas de la variedad Río Fuego: 3-hexanol,  $\alpha$ -pineno, *o*-cimeno, (+)-4-careno,  $\alpha$ -felandreno, *p*-cimeno,  $\beta$ -felandreno, nonanal y decanal. En observaciones previas y utilizando fibras de microextracción en fase sólida, también se observaron los compuestos  $\beta$ -mirceno (IK = 983) y limoneno (IK = 1021) en el perfil de esta variedad. Al comparar la emisión total de volátiles, no se encontraron diferencias significativas emisión entre grupos de plantas dañadas ( $237.12 \pm 95.00$  pg por 5 h), atacadas ( $514.19 \pm 300.48$  pg por 5 h) y expuestas ( $326.19 \pm 181.63$  pg 5 h) (ANDEVA  $F = 0.4537$ ,  $p = 0.65$ ). Así mismo, no se encontraron

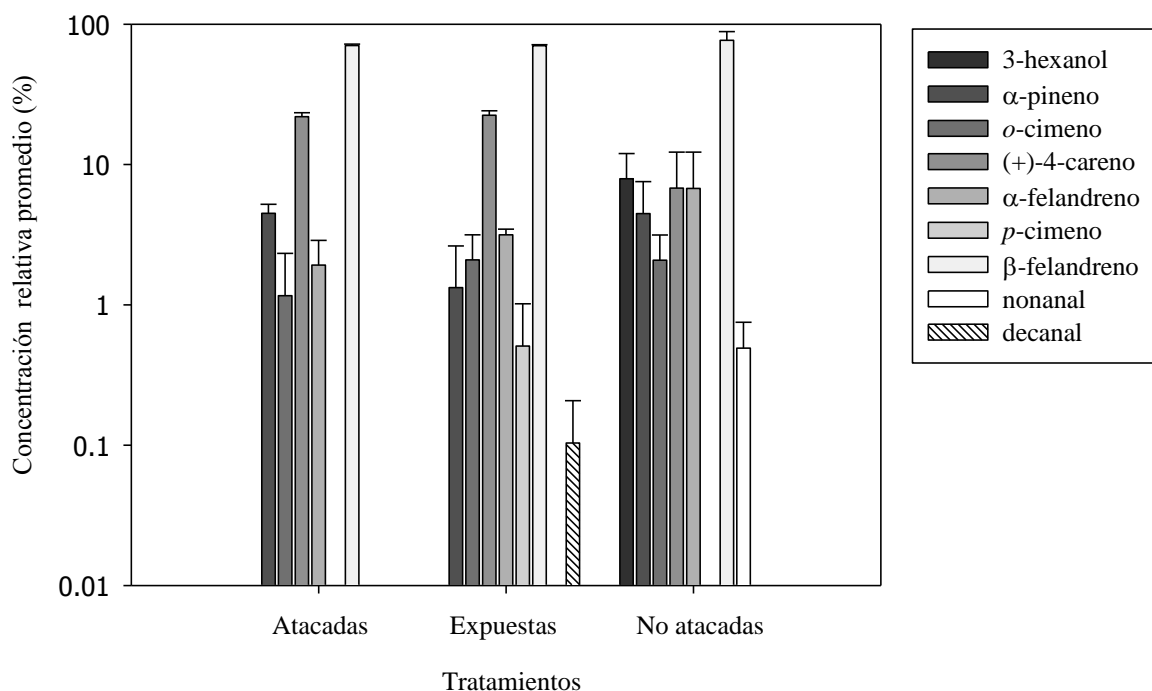
diferencias significativas en la concentración absoluta (Cuadro 2) y relativa de volátiles entre tratamientos (Figura 1).

**Cuadro 2. Concentración absoluta promedio ( $\pm$  error estándar de tres repeticiones por tratamiento) de volátiles emitidos por plantas de jitomate Río Fuego de acuerdo a tres tratamientos**

Compuestos	IK	Tratamiento		
		Plantas atacadas	Plantas expuestas	No atacadas
3-hexanol	750	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	26.21 $\pm$ 13.31
$\alpha$ -pineno	924	13.50 $\pm$ 6.74	14.50 $\pm$ 14.44	15.01 $\pm$ 10.52
<i>o</i> -cimeno	969	8.01 $\pm$ 8.01	15.63 $\pm$ 11.16	7.06 $\pm$ 3.62
(+)-4-careno	990	70.34 $\pm$ 38.55	109.50 $\pm$ 62.56	23.00 $\pm$ 18.57
$\alpha$ -felandreno	993	7.85 $\pm$ 5.63	14.61 $\pm$ 7.76	22.89 $\pm$ 18.61
<i>p</i> -cimeno	1014	0.00 $\pm$ 0.00	1.69 $\pm$ 1.69	0.00 $\pm$ 0.00
$\beta$ -feladreno	1018	226.49 $\pm$ 122.95	357.11 $\pm$ 204.35	159.97 $\pm$ 56.43
nonanal	1095	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.64 $\pm$ 0.87
decanal	1195	0.00 $\pm$ 0.00	1.14 $\pm$ 1.14	0.00 $\pm$ 0.00

#### IK, Índice Kovatz

El compuesto mayoritario en la emisión de volátiles de jitomate fue el  $\beta$ -felandreno cuya concentración relativa fue de aproximadamente 70 % mientras que la concentración relativa de casi todos los compuestos minoritarios fue menor al 1% (Figura 1). La concentración absoluta y relativa de este compuesto es mayoritaria en la mezcla de volátiles de otras variedades cultivadas de jitomate (por ejemplo, Moneymaker (Jansen *et al.*, 2008)) e incluso en la mezcla de volátiles de plantas de jitomate silvestre (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*)<sup>[1]</sup>.

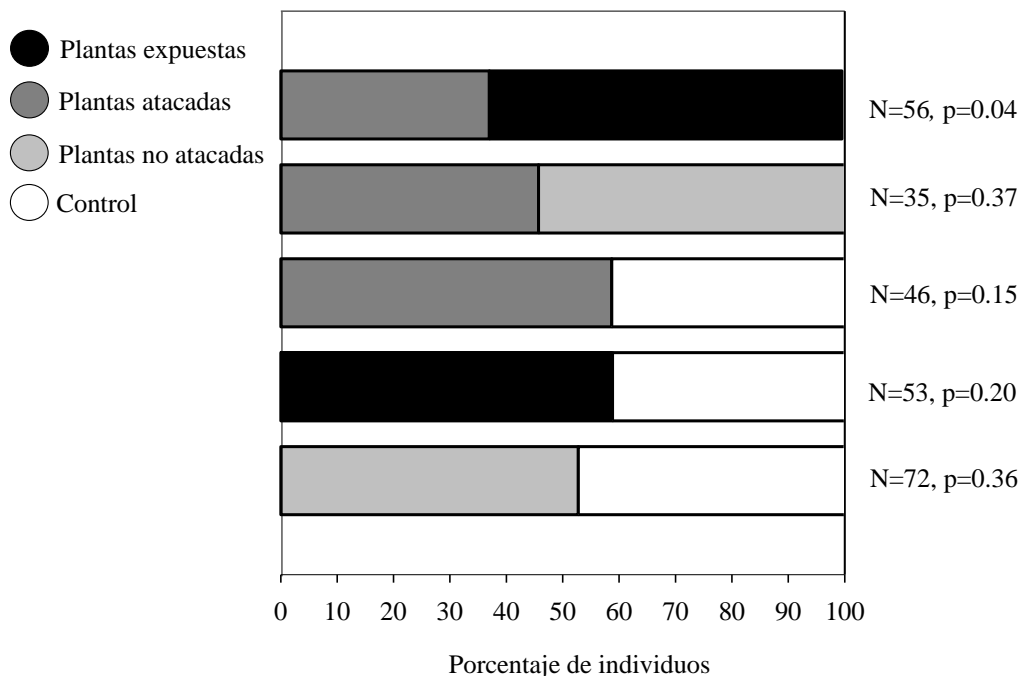


**Figura 1. Concentración relativa promedio ( $\pm$  error estándar de tres repeticiones) de compuestos volátiles emitidos por plantas de jitomate variedad Río Fuego bajo tres tratamientos.**

No se detectó la presencia de los compuestos 3-hexanol, *p*-cimeno, nonanal y decanal en la mezcla de volátiles de plantas dañadas, mientras que la presencia de estos compuestos fue variable en la mezcla de volátiles emitidos por plantas no atacadas y expuestas. La ausencia de diferencias significativas entre plantas atacadas y no atacadas concuerdan con los resultados de Pareja *et al.* (2007) quienes compararon la composición del olor de plantas de *Centaurea nigra* no atacadas y atacadas (50 individuos por planta) por el áfido *Uroleucon jaceae*.

## Respuesta de hembras de *Tamarixia triozae* a volátiles de plantas de jitomate

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 2) excepto cuando el extracto de plantas atacadas fue presentado contra el extracto de plantas expuestas ( $p = 0.04$ ) donde un 60 % de las hembras prefirieron el olor de plantas expuestas sobre aquél de plantas atacadas.



**Figura 2. Porcentaje de hembras de *T. triozae* que eligieron entre dos fuentes de olor de acuerdo a tres tratamientos. Tratamientos: plantas no atacadas, plantas atacadas (50 ninfas 5 d) y plantas expuestas (plantas colocadas a 15 cm de las plantas atacadas durante el tratamiento).**

Los resultados muestran que hembras de *T. triozae* no utilizan los volátiles de jitomate inducidos por ninfas de *B. cockerelli*. De acuerdo con Mann *et al.* (2010), hembras de *Tamarixia radiata* Waterson no prefirieron los volátiles de plantas de *Citrus* atacadas por el psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), sino que prefirieron los volátiles provenientes de las ninfas del psílido de esta especie. Es posible que al igual que su especie hermana, *T. trioza* responda a estímulos provenientes de las ninfas de *B. cockerelli*. No obstante, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el uso de volátiles podría estar relacionado con otros procesos de asociativos que promuevan la permanencia de hembras jóvenes de *T. triozae* en parcelas de jitomate.

Ninkovic *et al.* (2011), muestran que los volátiles de plantas de cebada expuestas a volátiles de plantas atacadas son preferidas por *Coccinella septempunctata*. En este sentido, la variabilidad y diversidad de volátiles en el ambiente tienen una función importante en la atracción y permanencia de insectos benéficos en una parcela. Por otro lado, Pareja *et al.* (2007) mostraron que no hubo diferencias significativas en la elección de parasitoides de *Aphidius funebris* entre plantas no atacadas y atacadas de *C. nigra* con una densidad de 50 individuos por planta pero prefirieron el olor del complejo planta-insecto cuando la densidad fue de 200 individuos.

#### Consideraciones acerca del uso de volátiles de plantas inducidos por herbivoría por *T. triozae*

La decisión de analizar los volátiles de jitomate de plantas expuestas y la respuesta de *T. triozae* a su olor fue el de reproducir las condiciones naturales de los cultivos donde plantas no atacadas se encuentran al lado de plantas atacadas. Los resultados indican que a pesar de no haber diferencias significativas en la composición de la emisión, es posible que las hembras hayan respondido a la presencia o ausencia de algún compuesto específico en la mezcla de volátiles de plantas expuestas (Figura 2). Por ejemplo, se ha demostrado que otros parasitoides responden a cambios mínimos en la concentración de un solo compuesto (*Coccinella septempunctata* en respuesta a la emisión de (Z)-jasmona inducidos por áfidos en plantas de lechuga (Birckett *et al.*, 2000)).

El uso de volátiles inducidos por herbivoría por parte de los parasitoides está basado en el aprendizaje asociativo por el cual un animal aprende a asociar un estímulo que no tiene un significado específico (*i. e.* neutral) con algún estímulo significativo (*i. e.* presa u hospedero) produciendo un efecto positivo o negativo. Como resultado, en encuentros subsecuentes el estímulo que antes era neutral se vuelve significativo, es decir, condicionado pues se asocia con el estímulo significativo (Vet *et al.*, 1995).

En esta investigación, las hembras utilizadas no emergieron de plantas de jitomate. Es posible que el comportamiento de *T. triozae* se modifique si las hembras emergieran de ninfas criadas en plantas de jitomate y con ello lograr el condicionamiento antes descrito. Por esta razón, y a pesar de que en este trabajo las hembras de *T. triozae* no respondieron a volátiles de jitomate inducidos, la información generada sirve de base para futuros estudios donde se tome en cuenta (1) la experiencia de parasitismo de las hembras (Bernays *et al.*, 1995), (2) la especie de planta a partir de la cual se criaron las ninfas de donde emergen los individuos de *T. triozae* (Ode, 2006) y (3) la densidad de ninfas sobre la planta (Pareja *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES

La alimentación de ninfas de *B. cockerelli* no produce cambios químicos en plantas de jitomate que atraigan a hembras de su principal parasitoide, *T. triozae*. Los cambios en la

mezcla de volátiles inducidos por ninfas de *B. cockerelli* puede no ser adaptativa para plantas de jitomate.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la empresa de reproducción de insectos benéficos Koppert México por la donación de material biológico para esta investigación, al Dr. Rafael Bujanos Muñoz del INIFAP por donar adultos de *B. cockerelli* para comenzar una colonia en el laboratorio. También agradecemos a las siguientes personas del Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM: a la Biól. Yolanda García por su apoyo en el análisis cromatográfico; al Dr. Ernesto Vega por su ayuda en los análisis estadísticos y a los ingenieros Heberto Ferreira y Alberto Valencia por el apoyo técnico computacional. Este estudio fue financiado por UNAM-PAPIIT proyecto-IN227607 otorgado a F.J. Espinosa-García. Este artículo forma parte de la tesis de doctorado de A. Bautista-Lozada en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A. Bautista-Lozada agradece también el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de una beca de estudios de posgrado.

#### LITERATURA CITADA

Arimura, G. I., C. Kost, and W. Boland. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochem. Biophys. Acta.* 1734:91-111.

Bautista-Lozada A., and F. J. Espinosa-García. 2013. Odor uniformity among tomato individuals in response to herbivory depends on insect species. *PONE*. DOI:10.1371/journal.pone.0077199.

Bernays, E. A. 1995. Effects of experience on host-plant selection. *In: Chemical Ecology of Insects 2*. Cardé, R. T., & W. J., Bell. eds. Chapman & Hall. New York. EE. UU. pp: 47-64.

Birckett, M. A., C. A. M. Campbell, K. Chamberlain, E. Guerreri, A. J. Hick, J. L. Martin, M. Matthes, J. A. Napier, J. Pettersson, J. A. Pickett, G. M. Poppy, E. M. Pow, B. J. Pye, L. E. Smart, G. H. Wadhams, L. J. Wadhams, and C. M. Woodcock. 2000. New roles for *cis*-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *PNAS*. 97: 9329-9334.

Jansen, R., J. W. Hofstee, F. Verstappen, H. Bouwmeester, M. Posthumus, and E. van Henten. 2008. A method to detect baseline emission and plant damage induced volatiles in a greenhouse. *Acta Hort.* 801: 1415-1422.

Kessler A., and M. Heil. 2011. The multiple faces of indirect defenses and their agents of natural selection. *Funct. Ecol.* 25: 348-357.

- Kennedy, G. G. 2003. Tomato, pests, parasitoids, and predators: tritrophic interactions involving the genus *Lycopersicon*. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 51-72.
- Liu D., and J. T. Trumble. 2006. Ovipositional preferences, damage thresholds, and detection of the tomato-potato psyllid *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) on selected tomato accessions. *B. Entomol. Res.* 96: 197-204.
- Mann, R. S., J. A. Qureshi, P. A. Stansly, and L. L. Stelinsky. 2010. Behavioral responses of *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae) to volatiles emanating from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and citrus. *J. Insect Behav.* 23: 447-458.
- Ninkovic, V., S. Al Abasi, E. Ahmed, R. Glinwood, and J. Petterson. 2011. Effect of within-species plant genotype mixing on habitat preference of a polyphagous insect predator. *Oecologia* 166: 391-400.
- Ode, P. J. 2006. Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 163-85.
- Onagbola, E. O., D. R. Boina, S. L. Hermann, and L. L. Stelinski. 2009. Antennal sensilla of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102: 523-531.
- Pareja, M., M. C. B. Moraes, S. J. Clark, M. A. Birkett, and W. Powell. 2007. Response of the aphid parasitoid *Aphidius funebris* to volatiles from undamaged and aphid-infested *Centaurea nigra*. *J.Chem. Ecol.* 33: 695-710.
- Raghava, T., P. Ravikumar, R. Hedge, and A. Kush. 2010. Spatial and temporal volatile organic compound response of selected tomato cultivars to herbivory and mechanical injury. *Plant Sci.* 179: 520-526.
- Sánchez-Hernández, C., M. G. López, and J. Délano-Frier. 2005. Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient spr2 tomato mutants favor oviposition by insect herbivores. *Plant Cell Environ.* 29: 546-557.
- Thaler, J. S., R. Karban, D. E. Ullman, K. Boege, and R. M. Bostock. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylic plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* 131: 227-235.
- Turlings, T. C. J., J. H. Loughrin, P. J. McCall, U. S. R. Röse, W. J. Lewis, and J. H. Tumlinson. 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *PNAS.* 92: 4169-4174.



Turlings, T. C. J., H. T. Alborn, J. H. Loughrin, and J. H. Tumlinson. 2000. Volicitin, an elicitor of maize volatiles in oral secretion of *Spodoptera exigua*: isolation and bioactivity. *J. Chem. Ecol.* 26: 189-202.

Turlings, T. C. J., and F. Wäckers. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *In: Advances in insect chemical ecology.* Cardé, T. R. y Millar, G. J (eds.) Cambridge. Nueva York. EE. UU. págs. 21-75.

Vet L. E. M., W. J. Lewis, and R. T. Cardé. 1995. Parasitoid foraging and learning. *In: Chemical ecology of insects.* Cardé, R.T. y W. J. Bell (eds.) Chapman and Hall. Nueva York. EE. UU. págs. 65-101.

## ***Capítulo cinco***

---

### **DISCUSIÓN GENERAL**

## DISCUSIÓN GENERAL

El proceso de domesticación vegetal, a través de la selección artificial de caracteres fenotípicos y genéticos, ha modificado morfológicamente a las especies silvestres. La variación intraespecífica actual parte de la variación fenotípica natural, en la selección de fenotipos y en la incorporación de nuevos genes para crear variedades con características específicas de interés comercial (Herrera, 1992), por ejemplo: el sabor, el color o el aroma (Johns, 1990). En sistemas cultivados y naturales, los compuestos volátiles orgánicos, componentes del aroma de flores, hojas, tallos y raíces, son mediadores entre la planta y su entorno biótico. Este conjunto de volátiles ha sido llamado "volatiloma" de una planta (Maffei *et al.*, 2011) y es utilizado como fuente de información y no como fuente directa de recursos (Heil, 2010). La plasticidad del volatiloma en respuesta a la herbivoría es considerada como adaptativa dado que el fenotipo de resistencia es inducido por insectos y se supone que facilita la localización de la presa por los enemigos naturales de insectos herbívoros. Esta interacción mutualista entre la planta y el tercer nivel trófico a través de la información emitida por la planta atacada depende de la confiabilidad de la señal química y de la respuesta de los enemigos naturales (Turlings *et al.*, 1990; Vet *et al.*, 1992). No obstante, la variación en emisión de volátiles entre individuos puede comprometer su valor adaptativo si la variación entre plantas de una misma población es muy alta y poco predecible (Fordyce, 2006).

En este trabajo evaluamos la hipótesis del estado de domesticación de la planta y la herbivoría como factores determinantes de plasticidad de la emisión. Los dos principales resultados de esta investigación validan la hipótesis general sobre el efecto del estado de domesticación y la herbivoría en la plasticidad de la emisión de volátiles inducidos. El análisis de la variación de volátiles de diferentes variedades de jitomate basado en el método de comparación antes-después, permitió establecer el efecto del estado de domesticación y de la herbivoría en la magnitud del cambio en concentración de volátiles dentro y entre variedades de jitomate. Los resultados obtenidos muestran que el efecto indirecto de la domesticación del jitomate, incrementó y mantuvo la variación de volátiles constitutiva entre individuos cultivados, sin embargo, la plasticidad de este rasgo depende de las especies de insectos involucrados (capítulo uno) y de la variedad de jitomate (capítulo dos). El comportamiento de hembras de *Tamarixia triozae*, las cuales no discriminaron entre la volátiles de plantas de jitomate atacadas y no atacadas por ninfas de *B. cockerelli* (capítulo tres), sugiere que la emisión inducida por este insecto no representa una señal confiable para la localización de su presa.

A continuación se discute el efecto de la herbivoría y el estado de domesticación en la variación en la emisión inducida del jitomate sobre así como las posibles consecuencias ecológicas de esta variación en el establecimiento del mutualismo entre el primer y el tercer nivel trófico a través de la emisión inducida de compuestos volátiles orgánicos.

## *El estado de domesticación del jitomate y la herbivoría como factores de variación en la emisión de volátiles*

La domesticación modificó de forma directa ciertos caracteres que marcaron las diferencias intraespecíficas entre plantas cultivadas y sus parientes silvestres (síndrome de domesticación (Chaudhary, 2013)). Los compuestos volátiles orgánicos foliares evolucionaron indirectamente bajo procesos de selección artificial marcando diferencias entre variedades cultivadas y silvestres de la misma especie (Gouinguéné *et al.*, 2001; Fritzsche-Hoballah *et al.*, 2002; Degen *et al.*, 2004; Chen y Welter, 2005). Tanto en sistemas cultivados como silvestres, la discriminación y aceptación de individuos parte de la gama de fenotipos químicos vegetales así como del espectro de alimentación de los insectos (Vet *et al.*, 1993). Por esta razón, la variación en la mezcla de volátiles es también variación en la información química disponible para los insectos del tercer nivel trófico (Heil, 2010).

La plasticidad adaptativa de este carácter fenotípico debe ser predecible para los miembros que interactúan a través de ellos para poder establecer una interacción mutualista con beneficios a nivel de su adecuación (Fordyce, 2006; Heil, 2010). Sin embargo, ya que los volátiles son una fuente de información y no un recurso directamente explotado por los insectos depredadores, el mutualismo planta-enemigos naturales puede condicionarse a la variación de la emisión del complejo planta-herbívoro y a la sensibilidad de los insectos depredadores hacia la emisión (Herrera, 2009).

Los resultados de la primera parte de esta investigación (capítulo uno), muestran que la variación de volátiles entre individuos es herbívoro-específico (Bautista-Lozada y Espinosa-García, 2013): el daño ocasionado por diferentes tipos de herbívoros induce diferentes grados de variación entre individuos a nivel de la concentración y composición de la mezcla de volátiles. Al analizar la magnitud del cambio en concentración absoluta y relativa, cada grupo de plantas asignado a un tratamiento de herbivoría o daño mecánico produjo una mezcla y un nivel de variación específico (uniformidad en la emisión de volátiles herbívoro-específica). Entre los tratamientos de daño, aquellos insectos que indujeron mayor y menor variación fueron las ninfas de *Bactericera cockerelli* y las larvas de *Trichoplusia ni*, insecto chupador y masticador respectivamente.

Los insectos chupadores y masticadores, dañan a la planta de forma diferencial en términos de la frecuencia (tiempo de alimentación) y área de daño a los tejidos, induciendo diferentes respuestas genéticas y bioquímicas en jitomate (Rodríguez-Saona *et al.*, 2010). A partir de los resultados observados, es posible que el nivel de variación o uniformidad en la emisión de volátiles responda al efecto del tipo de alimentación del herbívoro o el efecto sinérgico de su tipo de alimentación y las moléculas presentes en su saliva (inductores). De esta forma, es posible que las plantas respondan al tipo de daño y/o a los inductores asociados a cada herbívoro (*herbivore-induced associated patterns* o *mechanical-damage associated patterns* (Heil, 2012)); para validar esta hipótesis es necesario abordar el problema con una metodología diferente donde se aísle el daño a tejidos de la saliva de los

insectos a partir de los cuales se podría establecer una escala de intensidad de daño controlando la variación en la concentración constitutiva de compuestos.

La variación constitutiva, a partir de la cual derivó la variación inducida, está asociada al estado de domesticación de la planta (capítulo dos). Contrario a lo esperado, la variación entre individuos en la emisión de volátiles dentro de cada variedad fue mayor entre individuos cultivados. Es posible que riqueza de volátiles encontrada sea el resultado de modificaciones en el metabolismo primario del jitomate durante el transcurso de su evolución bajo selección artificial. Sin embargo, después de la alimentación por ninfas de *B. cockerelli*, el efecto del estado de domesticación disminuyó la variación de volátiles. De acuerdo a los resultados obtenidos en los primeros dos capítulos, la variación en la emisión de volátiles está asociada al estado de domesticación del jitomate pero la herbivoría tiene un efecto mayor en la variación inducida.

La plasticidad de la emisión de volátiles medida en este trabajo como la relación entre la emisión de volátiles constitutiva e inducida, tampoco está asociada al estado de domesticación del jitomate. La correlación negativa entre la emisión constitutiva y la inducida puede explicarse también como un compromiso entre los compuestos volátiles y otro tipo de metabolitos relacionados con la resistencia directa (Balhorn *et al.*, 2008) o estructuras de resistencia como los tricomas. En el caso de que el proceso de asociación de compuestos volátiles inducidos por herbivoría y la localización de la presa esté asociado a la variación en la emisión de volátiles entre individuos, la plasticidad de este rasgo fenotípico no puede ser adaptativo si la variación es herbívoro-específica e interfiere con el proceso de localización, discriminación y elección de presas de sus enemigos naturales.

#### *Posibles efectos de la variación en la emisión de volátiles entre individuos en la atracción de insectos del tercer nivel trófico*

La variación intraespecífica constitutiva y la variación entre individuos herbívoro-específica permite a insectos del tercer nivel trófico discriminar y elegir entre diferentes fenotipos de resistencia. La discriminación de fenotipos por parte de los insectos (tanto herbívoros como depredadores) es una fuerza selectiva que puede mantener o diversificar la variación natural. La variación inducida de volátiles herbívoro-específica se traduciría en diferentes intensidades de interacción entre la planta y el tercer nivel trófico, es decir, individuos más atractivos que otros en función de la mezcla inducida por el mismo herbívoro. Si la tasa de atracción es alta, es benéfica para ambos miembros; en este caso, la resistencia indirecta mediante volátiles inducidos por herbivoría es efectivo. Sin embargo, la defensa indirecta mediante volátiles inducidos por herbivoría no puede ser adaptativo bajo los esquemas de variación entre individuos herbívoro-específica; la atracción de insectos del tercer nivel trófico hacia plantas dañadas por sus presas puede comprometerse si este comportamiento es sensible a la variación de volátiles (Herrera, 2009).

El trabajo realizado por Wason y Hunter (2014) muestra que la variación en la emisión de volátiles de *Asclepsias syriaca* inducida por *Danaus plexippus* no afecta la

atracción de insectos del tercer nivel trófico. En este caso el rango de variación de volátiles inducidos por *D. plexippus* es detectado por sus enemigos naturales, sin embargo, puede no serlo por otras especies de depredadores ya que se espera que el rango de detección de señales químicas presentes en el ambiente esté asociado a su espectro de alimentación (generalista o especialista; Vet *et al.*, 1992).

La defensa indirecta, que va más allá de la atracción de enemigos naturales a plantas dañadas por herbívoros, implica ventajas adaptativas para los miembros que participan en la interacción. Al presentar diferentes olores de plantas de jitomate a hembras de *T. triozae* (capítulo tres), principal parasitoide de ninfas de *B. cockerelli*, las hembras no discriminaron los volátiles de plantas de jitomate cultivado atacadas por ninfas de *B. cockerelli* de los volátiles de plantas no dañadas. Este resultado sugiere que *T. triozae* no es atraída por la mezcla de volátiles del grupo de plantas posiblemente debido a la variación entre individuos inducida por *B. cockerelli* (Bautista-Lozada y Espinosa-García, 2013). El proceso de localización de esta especie podría responder a señales tanto visuales como químicas provenientes del ambiente o directamente de la ninfa (Mann *et al.*, 2010).

De acuerdo con Vet *et al.* (1993), el rango de alimentación de los insectos del tercer nivel trófico determina el uso de señales químicas en el ambiente. Sin embargo, el comportamiento observado de hembras de *T. triozae* sugiere que la variación en la emisión de volátiles inducidos también determina su respuesta. A pesar de que la variación herbívoro-específica y la respuesta de insectos parasitoides fueron medidas utilizando variedades cultivadas diferentes (Castlemart y Río Fuego, respectivamente), las conclusiones obtenidas son válidas para proponer nuevas hipótesis de investigación ya que el efecto de la domesticación tiene un efecto significativo sólo en la variación entre individuos en la emisión constitutiva de volátiles (capítulos uno y dos). Si bien la atracción de los insectos del tercer nivel trófico abarque la variación de compuestos volátiles (Wason y Hunter, 2014), la variación en la emisión de compuestos volátiles entre individuos sí cuestiona el valor adaptativo de este carácter inducido. En este caso, la variación herbívoro-específica ejercería un efecto abajo-arriba (*bottom-up effect*; Keeler *et al.*, 2006) en las interacciones tritróficas mediadas por metabolitos secundarios (Poelman *et al.*, 2008).

En conclusión, el estado de domesticación del jitomate y la herbivoría son dos factores reguladores de la variación de la emisión de volátiles dentro y entre variedades. Contrario a lo esperado, dentro de las variedades cultivadas hay mayor variación entre individuos comparado con sus parientes silvestres, sin embargo, la variación inducida por *B. cockerelli* disminuye las diferencias intraespecíficas. La variación herbívoro-específica podría afectar la atracción de insectos del tercer nivel trófico si la atracción está condicionada por la variación inducida por herbivoría.

## ¿Cómo incorporar la variación en la emisión entre individuos en el manejo agronómico de plagas?

Los nuevos esfuerzos en agro-ecología en términos del control de plagas buscan aumentar la eficiencia de los recursos energéticos, territoriales, hidrológicos y de biodiversidad (Keating *et al.*, 2009). La disminución de la biodiversidad de artrópodos en agro-ecosistemas comparado con aquella encontrada en sistemas naturales de especies cultivadas (por ejemplo, arroz; Chen y Bernal, 2011) puede aumentar mediante la presencia de la diversificación de especies vegetales, lo cual amplía la gama de estímulos químicos y alimenticios que favorecen la biodiversidad de insectos y las interacciones entre ellos (Tscharrntke *et al.*, 2008).

La variación en la emisión de volátiles inducidos como mecanismo de resistencia, puede incorporarse al Control Biológico por Conservación (CBC) si se establece un sistema de cultivo mixto. Por ejemplo, el sistema de atracción-repulsión (*push-pull* en inglés; Khan *et al.*, 2008) aplicado en jitomate podría incluir diferentes variedades de jitomate con especies atractivas y repelente de insectos herbívoros (especies trampa y especies disuasorias). Los resultados de este trabajo de investigación apoyan la estrategia utilizada por el CBC donde la variación en emisión de volátiles provee una fuente más de diversidad química en el ambiente para atraer, retener enemigos naturales y posiblemente afectar a los herbívoros en la detección de plantas hospederas. En este contexto, permitir que plantas cultivadas utilicen su propia resistencia favorecería el establecimiento de interacciones tritróficas en agro-ecosistemas que disminuirían el uso de plaguicidas (Macfadyen *et al.*, 2010).

Para el caso del jitomate, los resultados de este trabajo indican que el CBC o el control biológico, por inundación podrían utilizarse contra plagas específicas que inducen cambios en el volatiloма que resultan en señales confiables para el tercer nivel trófico. Obviamente, el uso del volatiloма inducido en control biológico fracasaría si la plaga predominante en un sitio suprimiera la emisión de volátiles o bien si el agente de control biológico no usara el volatiloма de la planta. La variación en la utilidad del volatiloма dependiente del herbívoro, y de la variación en uso de los enemigos naturales, difícilmente concuerda con la visión muy extendida de la función adaptativa generalizada de la emisión de volátiles como defensa indirecta contra los herbívoros. Así, futuras investigaciones deben enfocarse en el estudio del efecto de la variación en la emisión de volátiles en la atracción de enemigos naturales y su compatibilidad con el control biológico.

## LITERATURA CITADA EN LA SECCIÓN DE DISCUSIÓN

Aharoni A, Giri AP, Verstappen FWA, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schaub W, Bouvomeester HJ. 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *The Plant Cell* 16: 3110-3151.

Balhorn DJ, Kautz S, Lion U, Heil M. 2008. Trade-offs between direct and indirect defenses of lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Ecology* 96: 971-980.

Bautista-Lozada A, Espinosa-García FJ. 2013. Odor uniformity among tomato individuals in response to herbivory depends on insect species. *PLOS One*. DOI:10.1371/journal.pone.0077199.

Chaudary B. 2013. Plant domestication and resistance to herbivory. *International Journal of Plant Genomics*. doi.10.1155/2013/572784.

Chen YH, Bernal CC. 2011. Arthropod diversity and community composition on wild and cultivated rice. *Agricultural and Forest Entomology* 13: 181-189.

Heil, M. 2010. Plastic defence expression in plants. *Evolutionary Ecology* 24: 555-569.

Heil M. 2012. Damaged-self recognition as a general strategy for injury detection. *Plant Sign Behavior* 7: 576-580.

Herrera C. 2009. Multiplicity in unity: Plant subindividual variation and interactions with animals. The University of Chicago Press. Estados Unidos de América. 437 pp.

Johns T. 1990. *The Origins of Human Diet and Medicine*. the university of Arizona Press, Tucson.

Keating BA, Carberry PS, Bindraban PS, Asseng S, Meinke H, Dixon J. 2010. Eco-efficient agriculture: concepts, challenges, and opportunities. *Crop Science*. Doi.2135/cropsci2009.10.0594.

Keeler M, Chew FS, Goodale BC, Reed JM. 2006. Modelling the impact of two exotic invasive species on a native butterfly: top-down vs. bottom-up effects. *Journal of Animal Ecology* 75: 777-788.

Khan ZR, James DG, Midega CAO, Pickett JA. 2008. Chemical ecology and conservation biological control. *Biological Control* 45:210-224.



- Macfadyen S, Bohan DA. 2010. Crop domestication and the disruption of species interactions. *Basic and Applied Ecology* 11: 116-125.
- Maffei ME, Gertsch J, Appendino G. 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Products Report* 28:1359–1380.
- Mann RS, Qureshi JA, Stansly PA, Stelinsky LL. 2010. Behavioral responses of *Tamarixia radiate* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae) to volatiles emanating from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and citrus. *Journal of Insect Behavior* 23: 447-458.
- Poelman EH, van Loon JJA, Dicke M. 2008. Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Cell* 13: 534-541.
- Rodriguez-Saona CR, Musser RO, Vogel H, Hum-Musser SM, Thaler JS. 2010. Molecular, biochemical, and organismal analyses of tomato plants simultaneously attacked by herbivores from two feeding wilds. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1043-1057.
- Tscharnke T, Bommarco R, Clough Y, Crist TO, Klein D, Rand TA, Tylianakis JM, van Nouhuys S, Vidal S. 2008. Conservation biological control and enemy diversity on a landscape scale. *Biological Control* 45:238-253.
- Vet LEM, Dicke M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* 37:141-172.
- Wason EL, Hunter MD. 2014. Genetic variation in plant volatile emission does not result in differential attraction of natural enemies in the field. *Plant-microbe-animal interactions. Oecologia* 174:479-491.