



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

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD**  
**MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS**

**ECOLOGÍA QUÍMICA DE LA INTERACCIÓN DEL BARRENADOR DE LA RAMA DEL**  
**AGUACATERO, *COPTURUS AGUACATAE* KISSINGER,**  
**CON *PERSEA AMERICANA* MILL. CV. HASS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CLAUDIO MELÉNDEZ GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

**DRA. EK DEL VAL DE GORTARI**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD IIES-M

OFICIO CPCB/429/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**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 **24 de febrero de 2020**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **MELÉNDEZ GONZÁLEZ CLAUDIO**, con número de cuenta **403016927**, con la tesis titulada, "**Ecología química de la interacción del barrenador de la rama del aguacatero *Copturus aguacatae* Kissinger con *Persea americana* Mill. cv. Hass**", realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ARMANDO EQUIHUA MARTÍNEZ  
Vocal: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN  
Secretaría: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI  
Suplente: DR. RICARDO REYES CHILPA  
Suplente: DRA. KARINA BOEGE PARÉ

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 06 de agosto de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADEDIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 330211).

A los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Francisco Javier Espinosa García

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Dra. Ek del Val de Gortari

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A mi tutor el Dr. Francisco Javier Espinosa García por su confianza y apoyo (tanto moral como económico) que fueron imprescindibles para concluir este proyecto.

Al Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas y la Dra. Ek del Val de Gortari, miembros de mi comité tutorial, a quienes agradezco sus aportaciones desde sus diferentes ópticas y perspectivas, con las cuales enriquecieron el presente proyecto.

A los miembros del jurado de mi examen: Dr. Armando Equihua Martínez, Dr. Juan Núñez Farfán, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Ek del Val de Gortari y Dra. Karina Boege Paré cuyos comentarios permitieron mejorar la versión final de este trabajo.

A la Biol. Yolanda Magdalena García Rodríguez por su asistencia técnica en las colectas de campo, procesamiento de muestras y entrenamiento en análisis cromatográficos.

A las Juntas Locales de Sanidad Vegetal de Acuitzio-Villa Madero y Tingambato por facilitarme el acceso a las huertas de aguacate. A los ingenieros de sanidad vegetal Roberto Cervantes Servín y Orlando Morales Reyes por su asistencia técnica en las colectas de campo.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Química y Agroecología: Yola, Ángel, Homero, Fátima, Celso, Lupita, Lupita Torres por su amistad y apoyo.

## **DEDICATORIA**

A mi compañera de vida, Paulette  
y al fruto de nuestro amor, Jun

## Índice

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Referencias	8
Capítulo 1. Efecto de la variación fitoquímica en la amplitud de dieta de los insectos herbívoros	11
Resumen	12
Abstract	13
Diferentes escalas en la amplitud de dieta en los insectos fitófagos	13
Hipótesis sobre la amplitud de dieta	16
La variación fitoquímica como rasgo evolutivo. La isla de recursos	18
Teoría de la coevolución fitoquímica	19
La carrera armamentista entre plantas e insectos fitófagos	21
Diferencias entre insectos herbívoros especialistas y generalistas	22
Respuesta inducida de defensa directa e indirecta de las plantas por herbívoros generalistas y especialistas	28
El papel de la herbivoría en el mantenimiento de la diversidad fitoquímica	31
La hipótesis del procesamiento de la información	32
Respuesta de los insectos a la variación fitoquímica	36
Hipótesis de espacio libre de enemigos (ELE) o de las interacciones tritróficas	38
Consideraciones finales	43
Referencias	46
Capítulo 2. Los perfiles metabólicos de <i>Persea americana</i> cv. Hass revelan cambios estacionales asociados al barrenador de las ramas, <i>Copturus aguacatae</i>	61
Abstract	62
Introduction	62
Materials and methods	63
First field study and sampling	63
Second field study	63
Sample processing	63
GC-MS análisis	63
Sample TMS derivatization	64
Data analysis	64
Results	64
Leaf volátiles and chemotype determination	64
Branch volatile chemical composition	64
Infestation status	64
Metabolomics comparison between bored and non-bored trees	64
Seasonal variation	64
Bored and non-bored trees comparison	65

Correlations among compounds	66
Discussion	68
Funding	69
Conflict of interest	69
Acknowledgements	69
References	69
Apéndice A-Información suplementaria	71
Capítulo 3. <i>Persea americana</i> intraspecific phytochemical variation correlates with adult feeding preference and larvae performance from the avocado branch borer, <i>Copturus aguacatae</i> (Coleoptera: curculionidae).	80
Abstract	80
Introduction	81
Methods and materials	83
Vegetal material-avocado saplings	83
Avocado Branch borer adults and larvae	83
Feeding preference experiment	83
Larvae performance experiment	84
Leaf samples	84
Trunk samples	84
Sample processing	85
GC-MS analysis	85
Statistical analysis	85
Results	86
Compounds identification	86
Adult feeding preference	86
ABB larvae performance	87
Hass and Creole avocados chemical composition	87
Compounds relation with ABB preference or performance	92
Avocados trunk induced response	94
Discussion	96
Host chemical differences	97
Host chemistry and ABB adults feeding preference	97
Host chemistry and ABB larvae performance	98
Avocado trees induced response	98
References	100
Supplementary information	105
Capítulo 4. Ensayos iniciales para identificar compuestos del aguacate <i>Persea americana</i> cv. Hass afectando la preferencia del barrenador de las ramas del aguacatero, <i>Copturus aguacatae</i> , Kissinger	108
Resumen	108
Introducción	109
Materiales y métodos	110



Colecta de ramas con larvas	110
Obtención de extractos	110
Análisis de los extractos	111
Colecta de insectos adultos	111
Bioensayos	111
Ensayo con segmentos de ramas	111
Ensayo en disco de papel	112
Ensayos de olfatometría	112
Análisis estadísticos	112
Resultados y discusión	112
Relación entre el diámetro de las ramas y la incidencia de larvas	112
Relación entre el diámetro de ramas y preferencia de alimentación de insectos adultos	113
Ensayo de preferencia de alimentación con ramas de diferente diámetro	114
Variación de los perfiles químicos de las ramas de diferente diámetro	114
Relación de la incidencia de larvas con los fitoquímicos de las ramas	116
Relación entre la preferencia alimentación con los fitoquímicos de las ramas	117
Composición de las fracciones de la rama	118
Efecto de los componentes de la rama sobre la conducta de alimentación de hembras del barrenador	119
Ensayos de olfatometría	119
Conclusión	120
Referencias	121
Capítulo 5. Discusión general	123
Referencias	128

## Resumen

Las plantas producen una gran cantidad de metabolitos secundarios (fitoquímicos) que varían en el tiempo y el espacio, entre órganos dentro de la misma planta, entre individuos dentro de las poblaciones, entre poblaciones y entre especies. Se ha propuesto que la diversidad de fitoquímicos y su variación son consecuencia de la coevolución entre las plantas y sus consumidores (patógenos y herbívoros). Sin embargo, también se mantiene vigente la hipótesis no adaptacionista, llamada hipótesis del barrido, la cual sostiene que la diversidad fitoquímica surge por mutaciones al azar y se mantiene porque incrementa la posibilidad de que nuevos metabolitos activos surjan por mutaciones; y por lo tanto muchos de los metabolitos secundarios no tienen función alguna en las interacciones con los consumidores de las plantas y sólo unos pocos intervienen en la defensa vegetal (de allí que la podamos catalogar como una hipótesis de barrena única).

En el presente estudio se plantea qué si la variación fitoquímica es un rasgo defensivo aún en un contexto de variación genética y fitoquímica reducidas, esperamos que ocurran correlaciones entre la variación de compuestos o sus combinaciones con la presencia-ausencia de sus herbívoros y/o con la preferencia y desempeño. Seleccionamos al cultivo de aguacate *Persea americana* cv. Hass, el cual es propagado clonalmente por esquejes, y a una de sus principales plagas, el barrenador de las ramas *Copturus aguacatae* (insecto especialista), como modelo de estudio, ya que previamente se había reportado una correlación entre la variación fitoquímica de los compuestos volátiles foliares y la incidencia de barrenador. Se realizó una revisión de literatura conducente a analizar las diferentes hipótesis que tratan de explicar el efecto de la variación fitoquímica sobre los insectos herbívoros con diferente amplitud de dieta (generalistas o especialistas). Dicha revisión muestra que la escalada de defensas y contradefensas que ocurre como consecuencia de la coevolución no es el origen de la especialización de los insectos y que el resultado de una carrera armamentista coevolutiva considerando la interacciones tritróficas y las limitaciones neurales de los insectos conduce hacia un incremento en la diversidad de metabolitos secundarios y en su diversidad funcional.

En el presente estudio se analizó la composición de compuestos volátiles y semivolátiles de las ramas del árbol de aguacate Hass por cromatografía de gases y espectrometría de masas (en adelante GC-MS), ya que este insecto afecta este órgano en particular. Comparando los perfiles cromatográficos de árboles vecinos infestados y no infestados por el barrenador a lo largo de dos años identificamos compuestos que varían con el

tiempo (variación estacional), con el grosor de las ramas (variación ontogénica) y compuestos relacionados con la respuesta inducida por la infestación. Mostramos que más de una docena de terpenoides incrementan en concentración como respuesta a la presencia de las larvas del barrenador, en concordancia con la hipótesis adaptacionista.

Posteriormente, en un segundo experimento evaluamos la preferencia de alimentación y desempeño de las larvas del barrenador tanto en el aguacate Hass como en el aguacate criollo, dos hospederos de *C. aguacate* con composición química diferente. Obtuvimos los perfiles cromatográficos por GC-MS y a través de un análisis estadístico identificamos cuales compuestos están relacionados con un efecto en la preferencia o el desempeño. De acuerdo a la hipótesis de barrido o barrera única esperábamos que uno o pocos compuestos estuvieran relacionados con el pobre desempeño de las larvas y con la menor preferencia por parte de los insectos adultos. En contraste, de acuerdo a la hipótesis multibarrera esperamos encontrar combinaciones de compuestos relacionados con la preferencia (tanto atrayentes como disuasorios) y con el desempeño (tanto estimulantes como antialimentarios). Los resultados son consistentes con la hipótesis multibarrera y con la hipótesis de limitaciones neurales, la cual establece que los insectos especializados eligen al hospedero de mayor calidad nutrimental utilizando los fitoquímicos como indicadores. La mayor preferencia y desempeño se observó en la variedad criolla (el hospedero nativo), encontramos compuestos que posiblemente participan en la atracción de insectos adultos (estragol), otros que estimulan la alimentación, y otros antialimentarios.

Finalmente, se realizaron algunos experimentos con insectos adultos, explorando su respuesta a los fitoquímicos del aguacate. Se reportan un sesquiterpeno con posible efecto estimulante de oviposición, otros compuestos relacionados con la preferencia de alimentación (terpenos y azúcares) así como compuestos posiblemente disuasorios (fenoles). De esta forma se mostró que hay una gran cantidad de compuestos de diferentes clases químicas en el aguacate que están relacionados con un efecto positivo o negativo en la preferencia o desempeño de una de sus principales plagas en armonía con la hipótesis coevolutiva y con la barrera múltiple.

## Abstract

Plants produce a large number of secondary compounds (phytochemicals) that varies in space and time, among organs within the same plant, between individuals within populations, between populations and between species. Has been proposed that phytochemical diversity and variation is a consequence of coevolution between plants and their consumers (pathogens and herbivores). However, nowadays the non-adaptationist hypothesis named screening hypothesis stays current, which sustain that phytochemical diversity arises from random mutations and is maintained because increase the possibility that new bioactive metabolites arise by mutations; and thus many secondary compounds do not have a function on interactions between plants and their consumers and only a few ones participate on plant defense (this hypothesis consider defense as a single barrier).

In the present study is established that if phytochemical variation is a defensive trait in constrained genetic and phytochemical context then should be detectable correlations between phytochemical variation, compounds combinations, and pest presence/absence, preference and performance. We select Hass avocado, *Persea americana* cv. Hass which is mainly propagated by grafting, and one of their main plagues, the avocado branch borer *Copturus aguacatae*, as a study model, since previously has been reported a correlation between foliar volatile phytochemical variation and avocado branch borer infestation. A state of art review was achieved to analyze the different hypothesis that attempts to explain the phytochemical variation effect on herbivorous insects with different diet breadth (generalist or specialist). Such review showed that the defense-counterdefense arms race that occurs as a consequence of coevolution is not the origin of insects' diet breadth, and the output of a coevolutionary arms race considering tri-trophic interactions and insect neural constraints drive an increase of phytochemical diversity and its functional diversity.

In the present study, the composition of volatile and semivolatile branch compounds was analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), due to this insect affect this particular organ. It would expect that branch phytochemical variation will be more important and with biological meaning than leaves phytochemicals. Comparing chromatographic profiles between infested non-infested neighbors' avocado trees by the branch borer, along two years, we identified compounds that varies with the time (seasonal variation), branch diameter (ontogenetic variation) and compounds related

with an induced response. We showed that a set of sixteen terpenoids were related to induced response in agreement with the coevolutionary hypothesis (adaptationist hypothesis).

A previous study was reported that Hass avocado trees from Michoacan could be classified according to its leaf volatile profile on chemotypes common and rare. Between rare chemotypes, there are trees resembling creole avocado chemical composition because have a high amount of estragole, and this compound was positively correlated with *C. aguacatae* incidence. With this background was proposed, in a second experiment (in greenhouse), to compare avocado branch borer preference and performance on two hosts with a different profile of volatile compounds, Hass and Creole avocado. Later, through multivariate analysis was determined which compounds (or combinations) are related to preference or performance.

Later, in a second experimental study, we tested the feeding preference and larvae performance of *C. aguacatae* both Hass and Creole avocado, two *C. aguacatae* host with different phytochemical composition. According to the single barrier hypothesis we expected that one or few compounds was related to poor larvae performance and feeding preference. In contrast, according to multibarrier hypothesis we expected found compound combinations related to preference (attractants and stimulants) and with performance (stimulants and antifeedants). The results are consistent with multibarrier hypothesis and with neural constraints hypothesis, which establishes that specialized insects choose the host with high nutritional quality using phytochemicals as clues. The higher preference and performance were recorded on the creole variety (the original host), and the effect was more accentuated on preference, more compounds were related to attraction and nutritional quality. Regarding the multibarrier hypothesis, we found compounds that probably participate in insect attraction, others as feeding stimulants, and antifeedants.

Finally, some experiments with adult insects were developed exploring their response to avocado phytochemicals. One sesquiterpene is reported as putative oviposition stimulant, other components related to feeding preference (terpenes and sugars), as well as dissuasive compounds (phenols). In that way was showed that there is a high variety of compounds from different chemical nature in avocados that are related to a positive or negative effect from one of their main plague in harmony with the phytochemical coevolutionary hypothesis and multibarrier hypothesis.

## Introducción

Las plantas producen una enorme diversidad de metabolitos secundarios (MS) o fitoquímicos, por ejemplo, una hoja de *Arabidopsis thaliana* contiene cerca de dos mil metabolitos secundarios diferentes (Roepenack-Lahaye et al., 2004). A diferencia de los metabolitos primarios, los MS son dispensables para las funciones básicas de crecimiento y reproducción, pero tienen funciones específicas en la respuesta vegetal a estrés abiótico y biótico. Particularmente, en las interacciones con otros organismos los MS vegetales están implicados en la defensa o resistencia contra herbívoros, patógenos y en la competencia con otras plantas; así como en la atracción o mantenimiento de polinizadores, dispersores y mutualistas (Hartmann, 2007).

Otra característica importante de los MS vegetales es que varían (cualitativa y cuantitativamente) en el espacio y el tiempo. Por ejemplo, hay una clara diferenciación química entre los diversos tejidos de un individuo y que cambian de acuerdo con la edad de la planta (ontogenia). Además, existe variación entre individuos dentro de una población, y entre poblaciones. Algunos metabolitos se expresan de manera constitutiva mientras que otros se expresan en respuesta a diferentes tipos de estrés (respuesta inducida) (Yolanda M. García-Rodríguez et al., 2012; Moore et al., 2014). De tal forma que las plantas y sus poblaciones se comportan como mosaicos químicos que cambian con el paso del tiempo y varían en el espacio (Nyman, 2010).

Aunque es ampliamente aceptado que la principal función de los MS vegetales es la defensa contra herbívoros y patógenos (Hartmann, 2007), el efecto de la diversidad y la variación fitoquímica sobre los insectos herbívoros apenas comienza a estudiarse y entenderse (Raguso et al., 2015).

El estudio de los MS implicados en las interacciones entre plantas e insectos herbívoros resulta relevante debido a que a nivel mundial las pérdidas en productos agrícolas (pre- y post-cosecha) debidas a insectos pueden llegar hasta un 70% (Manosathiyadevan et al., 2017). En este sentido, la Ecología química es la disciplina científica encargada de estudiar el papel de los metabolitos secundarios como portadores de información en las interacciones que se establecen entre organismos. El conocimiento generado por esta disciplina puede ser útil para el diseño de estrategias de control de insectos. Por ejemplo, en el desarrollo de trampas para insectos plaga utilizando MS atrayentes o mediante la selección de variedades vegetales con algún tipo de resistencia a la plaga.

Con respecto a la diversidad fitoquímica, hay dos teorías contrastantes que tratan de explicar la diversidad y redundancia en actividad biológica de los MS. La primera propone que muchos de los MS producidos por las plantas no tienen una función pero se mantienen porque son la materia prima para que por mutación surjan otros compuestos con mejorada actividad biológica, y la redundancia se debe a que una misma enzima produce varios compuestos estructuralmente relacionados y con similar actividad biológica (Firn & Jones, 2003; Jones & Firn, 1991a). Es decir que sólo unos pocos MS son adaptativos y que las interacciones sinérgicas entre compuestos son raras. Por otra parte, la hipótesis adaptacionista explica que la diversidad de MS se debe a una carrera armamentista entre las plantas y sus consumidores (herbívoros y patógenos) donde la presencia de un grupo de compuestos químicamente relacionados y con actividad biológica similar es resultado de una escalada de defensas y contradefensas (Cornell & Hawkins, 2003). Es decir, que la mayoría de los compuestos son o han sido adaptativos. Además, las interacciones positivas y sinérgicas entre compuestos de diferente naturaleza química son comunes y producto de la carrera armamentista (Richards et al., 2016). De tal forma que la amplia diversidad fitoquímica es consecuencia tanto de las interacciones que establecen las plantas con sus múltiples consumidores como de la optimización de la actividad biológica a través de mezclas de compuestos.

Por otra parte, la variación fitoquímica puede afectar las interacciones entre plantas e insectos herbívoros en múltiples formas. Porque los insectos usan a los MS vegetales como señales para reconocer y evaluar a los mejores hospederos. Una planta posee compuestos que pueden ser atrayentes o repelentes para un insecto, estimuladores de la alimentación y la oviposición, además de toxinas y compuestos antidigestivos. Pero los compuestos que son efectivos para defenderse contra un insecto pueden ser benéficos para otro. Un caso bien documentado es el de los alcaloides pirrolizidínicos producidos por plantas del género *Senecio*. En estas plantas los alcaloides funcionan como una defensa contra insectos generalistas y como estimulantes de la oviposición para insectos especialistas (Macel, 2011). Desde el punto de vista de los insectos, las plantas son un recurso heterogéneo que varía en composición química de un tejido a otro y de una planta a otra, de manera que la variación fitoquímica puede funcionar por sí misma como un rasgo defensivo (Nyman, 2010) y los insectos deben elegir un hospedero y un tejido con la combinación adecuada de MS que tenga menor efecto perjudicial en su desempeño y adecuación.

En este trabajo utilizamos como modelo de las interacciones planta-insecto al aguacatero Hass, *Persea americana* cv. Hass y al barrenador de las ramas del aguacatero, *Copturus aguacate* Kissinger. El aguacate Hass es un híbrido que se reproduce principalmente por clonación (mediante injerto) lo que ha llevado a una gran uniformidad genética en las huertas y una reducida variación fitoquímica. Sin embargo, es posible encontrar diferentes fenotipos químicos de terpenoides y fenilpropanoides (variación química discreta) en las huertas de Michoacán (Espinosa-García et al., 2001; Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016). Por otra parte, el barrenador de las ramas es un insecto especialista nativo de México, que hasta el momento sólo se han reportado afectando las diferentes variedades de la raza mexicana o criolla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) y las variedades cultivadas Hass y Fuerte (Lozano-Gutiérrez et al., 2015; Salazar-garcía & Bolio-garcía, 1992).

Debido a que el aguacate Hass es propagado principalmente por injertos, los árboles en las huertas son genéticamente cercanos al nivel de clones y por lo tanto las fuentes que producen variación fitoquímica son menores, y surge la interrogante de si la variación fitoquímica intraclonal es suficiente para afectar la preferencia o desempeño de un insecto especialista, ya que se considera que estos son poco afectados por la variación fitoquímica de su hospedero (Rothwell & Holeski, 2019), porque poseen mecanismos efectivos para evadir o anular la defensa química. Sin embargo, los estudios realizados han sido contradictorios, en algunos casos la variación química intraespecífica tiene un efecto en la preferencia o el desempeño pero otras veces no (Á. E. Bravo-Monzón et al., 2016; Bustos-Segura et al., 2015; Cheng et al., 2013; Kuzina et al., 2009; Wheeler, 2006). No obstante, para asegurar que los MS están bajo selección y son adaptativos, en una misma planta debemos encontrar compuestos (o combinaciones) que varían y afectan tanto la preferencia como el desempeño de insectos especialistas (Cheng et al., 2013), en armonía con la hipótesis multibarrera. Por el contrario, de acuerdo a la hipótesis de barrera única, unos pocos compuestos estarán relacionados con la resistencia, y la variación fitoquímica intraclonal no tendrá efecto negativo en la preferencia o desempeño del insecto especialista.

Para entender las causas de la variación y diversidad fitoquímica y sus posibles efectos sobre los insectos herbívoros con diferente amplitud de dieta (generalistas y especialistas) se realizó una revisión de literatura. En ella se contrastan las diversas hipótesis que relacionan la presencia de fitoquímicos y su efecto perjudicial o benéfico para los insectos generalistas y especialistas.



Posteriormente, en el segundo capítulo investigamos la relación de la variación fitoquímica entre clones de aguacate con la presencia del barrenador de las ramas en busca de evidencia correlativa sobre si parte de la variación fitoquímica prevaleciente entre clones es suficiente para observar un efecto defensivo (constitutivo o inducido) contra la infestación del insecto o bien como se trata de un insecto especialista identificar los compuestos que le permiten seleccionar a su hospedero. En el tercer capítulo investigamos el efecto de dos variedades de aguacate, agregando un orden mayor de variación fitoquímica, en la preferencia y desempeño del barrenador de las ramas, para determinar si hay una relación entre la variación fitoquímica y el efecto en la selección del hospedero y su desempeño. Como el aguacate criollo es el hospedero nativo del barrenador, este tendrá un mejor desempeño porque está adaptado a sus fitoquímicos de acuerdo a la hipótesis coevolutiva. La comparación entre los perfiles químicos de ambos hospederos permitirá postular si muchos o pocos compuestos tienen un papel defensivo o un papel informativo para la selección del hospedero. En el cuarto capítulo, se resumen algunos bioensayos realizados para probar el efecto de fitoquímicos como las butanólicas, terpenoides y fenoles del aguacate en la preferencia en los insectos adultos.

Con este estudio buscamos contribuir al entendimiento de la diversidad y variación fitoquímica y su función como rasgo defensivo, además de contribuir al descubrimiento de los compuestos que median la interacción entre el barrenador de las ramas y su hospedero el aguacate y que pueden ser de utilidad para generar estrategias para el control de este insecto plaga.

## Referencias

- Bravo-Monzón, Á. E., Ríos-Vásquez, E., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2016). Differential herbivory of the specialist beetle *Stolas punicea* on chemical phenotypes of its host *Mikania micrantha*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3), 419–425. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1118436>
- Bustos-Segura, C., Külheim, C., & Foley, W. (2015). Effects of Terpene Chemotypes of *Melaleuca alternifolia* on Two Specialist Leaf Beetles and Susceptibility to Myrtle Rust. *Journal of Chemical Ecology*, 41(10), 937–947. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0628-0>
- Cheng, D., Van der Meijden, E., Mulder, P. P. J., Vrieling, K., & Klinkhamer, P. G. L. (2013). Pyrrolizidine Alkaloid Composition Influences Cinnabar Moth Oviposition Preferences in *Jacobaea* Hybrids. *Journal of Chemical Ecology*, 39(3), 430–437. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0257-4>

- Cornell, H. V., & Hawkins, B. A. (2003). Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *The American Naturalist*, 161(4), 507–522. <https://doi.org/10.1086/368346>
- Espinosa-García, F. J., García-Rodríguez, Y. M., Chávez Zavala, A., & Delgado-Lamas, G. (2001). Implicaciones de la variación en los fenotipos químicos de las poblaciones de plantas en su susceptibilidad a las plagas y patógenos: el caso de *Persea americana* var. Hass. *Memorias Del 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano Del Aguacate*, 46–57.
- Firn, R. D., & Jones, C. G. (2003). Natural products - a simple model to explain chemical diversity. *Natural Product Reports*, 20(4), 382–391. <https://doi.org/10.1039/b208815k>
- García-Rodríguez, Yolanda M., Bravo-Monzón, A. E., Martínez-Díaz, Y., Torres-Gurrola, G., & Espinosa-García, F. J. (2012). Variación Fitoquímica Defensiva en Ecosistemas Terrestres. In J. Rojas & E. Malo (Eds.), *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos* (pp. 217–252). El Colegio de la Frontera Sur.
- García-Rodríguez, Yolanda Magdalena, Torres-Gurrola, G., Meléndez-González, C., & Espinosa-García, F. J. (2016). Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill cv Hass. *Chemistry & Biodiversity*, 13(12), 1767–1775. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600169>
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Jones, C. G., & Firn, R. (1991). On the evolution of plant secondary chemical diversity. In *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (Vol. 333, pp. 273–280). <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0077>
- Kuzina, V., Ekstrøm, C. T., Andersen, S. B., Nielsen, J. K., Olsen, C. E., & Bak, S. (2009). Identification of defense compounds in *Barbarea vulgaris* against the herbivore *Phyllotreta nemorum* by an ecometabolomic approach. *Plant Physiology*, 151(4), 1977–1990. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136952>
- Lozano-Gutiérrez, J., España-Luna, M. P., Balleza-Cadengo, J. J., & Liñan-Quiroz, B. M. (2015). Biodiversidad de coleópteros en árboles de aguacate de Aramberri, Nuevo León, México. *Entomología Mexicana*, 2, 392–396.
- Macel, M. (2011). Attract and deter: A dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant-insect interactions. *Phytochemistry Reviews*, 10(1), 75–82.

<https://doi.org/10.1007/s11101-010-9181-1>

- Manosathiyadevan, M., Bhuvaneshwari, V., & Latha, R. (2017). Impact of Insects and Pests in loss of Crop Production: A Review. In A. Dhanarajan (Ed.), *Sustainable Agriculture towards Food Security* (pp. 57–57). Springer Nature Singapore. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-6647-4\\_4](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-6647-4_4)
- Moore, B., Andrew, R., Külheim, C., & Foley, W. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201, 733–750. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12526/full>
- Nyman, T. (2010). To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plant-feeding insects. *Biological Reviews*, 85(2), 393–411. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00109.x>
- Raguso, R. A., Agrawal, A. A., Douglas, A. E., Jander, G., Kessler, A., Poveda, K., & Thaler, J. S. (2015). The raison d’etre of chemical ecology. *Ecology*, 96(3), 617–630.
- Richards, L. A., Glassmire, A. E., Ochsenrider, K. M., Smilanich, A. M., Dodson, C. D., Jeffrey, C. S., & Dyer, L. A. (2016). Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. *Phytochemistry Reviews*, 15(6), 1153–1166. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9479-8>
- Roepenack-Lahaye, E. Von, Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., Schmidt, J., Scheel, D., & Clemens, S. (2004). Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiology*, 134(2), 548–559. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032714.Ample>
- Rothwell, E. M., & Holeski, L. M. (2019). Phytochemical defences and performance of specialist and generalist herbivores: a meta-analysis. *Ecological Entomology*. <https://doi.org/10.1111/een.12809>
- Salazar-garcía, S., & Bolio-garcía, J. M. (1992). Damage Caused by Avocado Branch Weevil (*Copturus aguacate* Kiss.) in ‘Fuerte’ Avocado Trees in Atlixco, Puebla, Mexico. *Proceedings of the 2nd World Avocado Congress*, 269.
- Wheeler, G. S. (2006). Chemotype variation of the weed *Melaleuca quinquenervia* influences the biomass and fecundity of the biological control agent *Oxyops vitiosa*. *Biological Control*, 36(2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.10.005>

## **Capítulo 1**

### **Efecto de la variación fitoquímica en la amplitud de dieta de los insectos herbívoros**

Este capítulo fue publicado como:

Meléndez-González, C. & Espinosa-García, F. J. (2016). Efectos de la Variación Fitoquímica en la Amplitud de Dieta de los Insectos Herbívoros. En: A. L. Anaya, F. J. Espinosa-García, & M. J. Reigosa Roger (Eds.), *Ecología Química y Alelopatía: Avances y Perspectivas* (pp. 337-425). México: Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México-Plaza y Valdés (en prensa).

## Capítulo 8

### Efectos de la Variación Fitoquímica sobre la Amplitud de Dieta de los Insectos Herbívoros

Claudio Meléndez-González y Francisco J. Espinosa-García<sup>1\*</sup>

#### RESUMEN

**E**n la naturaleza hay una mayor abundancia de insectos herbívoros (fitófagos) especialistas que generalistas. Esta abundancia se ha tratado de explicar a través de las interacciones que se establecen entre los herbívoros y las plantas de las cuales se alimentan. Considerando que las plantas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios y que algunos de los insectos más voraces para los cultivos son generalistas, resulta relevante preguntarse: ¿Qué relación guarda la variación fitoquímica con la amplitud de dieta de los insectos herbívoros? Para realizar este ejercicio se revisaron las principales hipótesis que relacionan la química vegetal con la especialización de los insectos herbívoros, a saber, la hipótesis de coevolución fitoquímica (los fitoquímicos tóxicos limitan la dieta de los insectos herbívoros), la hipótesis de las limitaciones neurales (los fitoquímicos permiten reconocer y evaluar la calidad de una planta hospedera) y la hipótesis del espacio libre de enemigos (la especialización de los insectos permite escapar de la depredación). La línea de razonamiento que seguimos muestra que la carrera armamentista, esbozada por la hipótesis coevolutiva, no puede estar basada principalmente en compuestos antiherbívoro (tóxicos). Esto debido a las diferencias neurales entre

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Química y Agroecología. Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. \*Autor de correspondencia, email: [espinosa@cieco.unam.mx](mailto:espinosa@cieco.unam.mx)

insectos generalistas y especialistas, así como al efecto (benéfico o perjudicial) que tienen los metabolitos vegetales sobre los enemigos naturales de los herbívoros. Una carrera armamentista circunscrita por estos dos factores explica la diversificación de los fitoquímicos (metabolitos antiherbívoro e informativos) así como el mantenimiento de la abundancia de insectos fitófagos especializados.

### ABSTRACT

In nature specialist phytophagous insects are much more abundant than generalist phytophagous. These contrasting abundances have been explained through the interactions between herbivores and the plants on which they feed on. Considering that plants produce a plethora of secondary metabolites (SM) that interact with generalists and specialist phytophagous insects, we asked, ¿What is the relation between phytochemical variation and insect diet breadth? To answer this question we revised major hypotheses relating plant chemistry and herbivorous specialization: phytochemical coevolution hypothesis (toxic phytochemicals limit insect diet breadth); neural limitation hypothesis (phytochemicals allow recognition and assessment of host plant quality); and enemy-free space hypothesis (insect specialization on toxic plants allows escape from predation). The revised evidence indicates that the arms race, outlined by the coevolutionary hypothesis, cannot be based solely on anti-herbivore compounds (toxins). This is due both to neural differences between generalist and specialist insects that determine the detection of SM and the effect (beneficial or detrimental) of SM on natural enemies of herbivores. An arms race circumscribed by these factors explains phytochemical diversification (toxic and informative metabolites) and maintenance of the high abundance of specialized phytophagous insects.

### Diferentes escalas en la amplitud de dieta en los insectos fitófagos

Una idea que continúa intrigando a los científicos es el patrón de alimentación observado en los insectos herbívoros. En la mayoría de los órdenes de insectos fitófagos hay una mayor proporción que se alimenta de una sola familia de plantas (~80%) y cerca de un 20% que se alimentan de plantas de dos o más familias (Forister *et al.*, 2015). Sin embargo, cabe destacar que el orden Orthoptera, en el cual están incluidos los saltamontes, presenta una mayor proporción de especies polífagas (60%)

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

(Bernays & Chapman, 1994) ¿Por qué hay tantos insectos que se alimentan de unas pocas especies de plantas mientras que otros pocos insectos se alimentan de muchas?

La dieta de los insectos suele ser clasificada de acuerdo a la cantidad de especies de plantas de las que se alimentan, y cualquier insecto puede ser acomodado en este continuo. Clásicamente se han empleado de manera comparativa los extremos de este gradiente, generalista y especialista, para indicar que un insecto se alimenta de una mayor variedad de plantas que otro. Otra clasificación recurrente es establecer tres niveles, monófago (si se alimenta de un solo género), oligófago (si se alimenta de una familia), polífago (si se alimenta de más de una familia) (Bernays & Chapman, 1994). Aunque no se ha alcanzado un consenso y pueden encontrarse variaciones a esta clasificación. En esta revisión se usará la primera clasificación.

Para explicar la abundancia de insectos especialistas algunos autores proponen que debe haber una mayor ventaja para los insectos con una dieta estrecha. Esta hipótesis se conoce como el principio: “aprendiz de todo, maestro de nada”. Este principio propone la existencia de una disyuntiva ecológica en el desempeño. El desempeño óptimo de un insecto en un hospedero limita su desempeño en otros hospederos (Futuyma & Moreno, 1988; Jaenicke, 1990; Agrawal *et al.*, 2010). Este principio llevó a pensar que la especialización en un hospedero, a expensas de la capacidad de desarrollarse en otro hospedero, se convierte en un callejón sin salida evolutivo y que posiblemente los insectos especialistas derivan de generalistas (Thompson, 1994).

Bajo este contexto se asume que los insectos fitófagos especialistas tienen las ventajas de alcanzar un nivel de desempeño óptimo mayor, reducir la competencia interespecífica y adaptarse más fácilmente a los cambios en la defensa de su hospedero. En cambio, los insectos generalistas, tienen como ventajas tener un mayor número de hospederos, el acceso a una dieta mixta que puede mejorar su desarrollo, una disminución en la heterogeneidad de los recursos, una mayor capacidad de establecerse en nuevos ambientes y explotar nuevos hospederos. Por otra parte, las desventajas de la especialización son que la dependencia de pocos hospederos incrementa la heterogeneidad en cuanto a la disponibilidad de recursos, incrementa la competencia intraespecífica y reduce la capacidad de establecerse en nuevos ambientes, por lo que aumenta la posibilidad de extinción. Mientras que los generalistas tienen como desventajas un desempeño óptimo menor y que alimentarse de muchas plantas es metabólicamente costoso y menos eficiente (Barrett & Heil, 2012).

Sin embargo, las disyuntivas ecológicas en la especialización de los insectos han sido difíciles de probar (Joshi & Thompson, 1995). Parte del problema está en definir el concepto de especialización. Usualmente se considera como especialización al proceso de adaptación a un limitado espectro de recursos potenciales. Se asume que los insectos generalistas tienen desventajas adaptativas, aunque la evidencia actual

sugiere que las adaptaciones que requieren los generalistas son más complejas que las de los insectos especialistas.

Otra confusión común es la asociación directa del término especialización con especiación y que mientras más especializado es un insecto tiene mayor posibilidad de convertirse en una nueva especie. Esta idea supone que la evolución es un proceso direccional, que parte de un estado simple a uno más complejo de acuerdo a la ley de irreversibilidad de Dollo, la cual sostiene que los organismos tienden hacia un fino ajuste con su hábitat (ver Loxdale *et al.*, 2011), o en otras palabras, que los generalistas tienden hacia la especialización.

La amplitud de dieta es una característica que se manifiesta a diferentes niveles. El número de plantas que puede consumir un insecto es solo una fracción de su especificidad. La especialización puede variar a través de las diferentes etapas de desarrollo del insecto herbívoro o de su hospedero (hospedante). La amplitud de dieta de una larva puede ser diferente a la del insecto adulto (especificidad ontogénica). Mientras que algunos insectos se pueden alimentar de cualquier órgano vegetal, algunos se limitan a explotar órganos particulares (especificidad estructural). El número de especies vegetales de las que se alimenta un insecto puede relacionarse con la distancia filogenética entre plantas hospederas (especificidad filogenética) y con la distribución espacial tanto del insecto como de su hospedero (especificidad geográfica). Por lo cual se puede hablar de especificidad a nivel de individuos, poblaciones y especies (Barret & Heil, 2012). También hay que considerar la especificidad química, algunos insectos se alimentan de plantas filogenéticamente separadas pero químicamente similares, las cuales poseen compuestos comunes que funcionan como estimulantes de la alimentación (Menken *et al.*, 1992), estimulantes de la oviposición (Murphy & Feeny, 2006) o toxinas que los insectos pueden degradar (Braby & Trueman, 2006).

Los insectos generalistas en condiciones naturales presentan un comportamiento más bien especializado. De manera recurrente se concluye que la amplitud de dieta a nivel de especie es de tipo generalista, aunque en poblaciones locales se comportan como especialistas (Menken *et al.*, 1996; Loxdale *et al.*, 2011). Por ejemplo, el áfido *Aphis gossypii* ha sido reportado alimentándose en más de 300 especies de plantas pero hay algunas razas de este áfido especializadas en el algodón y otras en las cucurbitáceas, que no sobreviven si se les cambia de hospedero (Guldemond *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2013).

Si bien los insectos especialistas se alimentan de una o unas pocas especies de plantas, es posible que puedan modificar su amplitud de dieta, lo cual ha sido documentado en plantas invasoras que son introducidas en ambientes nuevos (Frazer & Lawton 1994; Novotny *et al.*, 2003; Bertheau *et al.*, 2010; Castells *et al.*, 2014). Las plantas nuevas son colonizadas en un inicio por insectos generalistas y



## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

posteriormente por especialistas (Bertheau *et al.*, 2010), lo cual desmiente que la especialización sea un callejón sin salida evolutivo (Nosil, 2002). De hecho algunos insectos generalistas como los escarabajos de la subtribu Diabroticina evolucionaron de un ancestro especialista (Eben *et al.*, 2008). Por ejemplo, García-Robledo y Horvitz (2011; 2012) no encontraron ventajas fisiológicas entre dos escarabajos generalistas y dos especialistas del género *Cephaloleia* criados en nuevos hospederos. Las cuatro especies de escarabajos sufrieron un tiempo de desarrollo más largo y supervivencia reducida en los nuevos hospederos. Algunos estudios demuestran que los insectos fitófagos especialistas y generalistas han reducido y aumentado su amplitud de dieta en el transcurso de su historia evolutiva (Kelley & Farrel, 1998, Termonia *et al.*, 2001; Nosil & Mooers, 2005).

Tanto los insectos generalistas como especialistas poseen cierta plasticidad para modificar su dieta. Para Loxdale y colaboradores (2011) el generalismo en los insectos fitófagos es un tipo de especialización de margen amplio, mientras que para Barrett y Heil (2012) los generalistas deben considerarse como especialistas multi-hospedero.

### Hipótesis sobre la Amplitud de Dieta

En el transcurso del siglo pasado se han propuesto diferentes hipótesis para tratar de explicar esta abundancia de insectos fitófagos especialistas (Tabla 1); por ejemplo, se propuso que la especialización en un hospedero permite escapar de la competencia interespecífica (hipótesis de la eficiencia fisiológica) o de los enemigos naturales (hipótesis del espacio libre de enemigos e hipótesis de lento crecimiento/alta mortalidad) y que facilita una explotación más eficiente de recursos; otras hipótesis afirman que la especialización es resultado de la selección por parte de las plantas más abundantes (las plantas más abundantes seleccionan a los insectos que pueden consumirlas) o de la selección recíproca entre plantas e insectos (coevolución) (Jermy, 1993; Menken, 1996), o por diferencias neurales en el procesamiento de información (Levins & MacArthur, 1969; Bernays, 2001).

Un común denominador en varias de estas hipótesis (a excepción de la hipótesis de las plantas más abundantes) es que la composición química del hospedero juega un papel predominante. Por ejemplo, un insecto que tiene la capacidad de detoxificar eficientemente los metabolitos de una planta tendrá un mejor desempeño que un insecto sin esta capacidad. De manera análoga, si el insecto es capaz de secuestrar metabolitos tóxicos de una planta y usarlos como defensa tendrá una tasa menor de depredación. O bien que los insectos cuando se alimentan de plantas de mejor calidad (ej. menor concentración de metabolitos tóxicos) tienen un crecimiento más rápido y

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

experimentan menor depredación. O que los compuestos vegetales que no son tóxicos (compuestos volátiles, disuasorios o fagoestimulantes) pueden ser usados por los insectos como señales para evaluar la calidad de un potencial hospedero. Además, es ampliamente aceptado que los compuestos volátiles emitidos por las plantas son usados como señales por parte de los enemigos naturales (insectos depredadores y parasitoides) para encontrar a sus presas (Paré & Tumlinson, 1999).

**Tabla 1. Principales Hipótesis que tratan de explicar la abundancia de Insectos fitófagos especialistas**

Hipótesis	Principal Proposición	Predicción	Papel de los fitoquímicos	Supuestos	Referencias
Plantas más abundantes	Las plantas más abundantes seleccionan a los insectos que ovipositan en ellas	El nuevo hospedero es más abundante y comparte una característica particular con el antiguo hospedero	Los insectos se adaptan a la química vegetal	Los insectos utilizan características particulares (imágenes de búsqueda) para encontrar a su hospedero	Futuyama, 1983
Limitaciones neurales/Procesamiento de la información	Los insectos especialistas procesan una menor cantidad de información	Los especialistas toman decisiones más rápidas y acertadas que los generalistas	Los insectos usan los fitoquímicos para evaluar la calidad* de su hospedera	Correlación entre la preferencia de oviposición y el desempeño de la progenie	Levins & MacArthur, 1969; Bernays, 2001
Eficiencia fisiológica	Los especialistas están mejor adaptados fisiológicamente para utilizar su planta hospedera como alimento	La variación en la calidad de la planta afecta más a los generalistas que a los especialistas	Plantas de baja calidad (p.ej. tóxicas) reducen el desempeño	Correlación entre la preferencia de oviposición y el desempeño de la progenie	Dethier, 1954 Coley <i>et al.</i> , 2006
Lento crecimiento/alta mortalidad	El desarrollo de un insecto en plantas de baja calidad es menor e incrementa el riesgo de depredación	Los insectos experimentan mayor depredación en plantas de baja calidad	Los fitoquímicos reducen la velocidad de crecimiento de los insectos	La depredación es la principal presión de selección para los insectos	Feeny, 1976 Moran and Hamilton, 1980
Espacio libre de enemigos	Los insectos especialistas están mejor adaptados a usar su planta hospedera como protección o defensa contra depredadores	Los especialistas experimentan menor depredación que los generalistas en un hospedero en común	Los insectos especialistas pueden secuestrar metabolitos y usarlos como defensa	La depredación es la principal presión de selección para los insectos	Bernays and Graham, 1988
Coevolución fitoquímica	Escalada de defensas y contradefensas entre plantas e insectos (selección recíproca)	Los especialistas son menos afectados por los fitoquímicos que los generalistas en un hospedero común	Los metabolitos tóxicos limitan la dieta de los insectos	La herbivoría es la principal presión de selección para la química vegetal	Ehrlich and Raven, 1964 Cornell and Hawkins, 2003

\*Componentes de la planta hospedera (p.ej. contenido de carbono, nitrógeno, elementos traza y metabolitos defensivos) que afectan de manera positiva o negativa el desempeño de los herbívoros (Awmack and Leather, 2002).

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

Por un lado tenemos a la hipótesis fitocéntrica (coevolución fitoquímica) que implica una alta dependencia de la química vegetal en la evolución de la especialización. Los especialistas tienen ventajas fisiológicas que les permiten evadir la defensa vegetal. En el otro extremo está la hipótesis entomocéntrica donde la química vegetal es circunstancial y solo sirve como indicador de la calidad del hospedero para el insecto; los especialistas pueden explotar con mayor eficiencia un recurso. Ambas hipótesis nos acercan a una posible explicación sobre el origen de la amplitud de dieta centrándose en las diferencias fisiológicas o neurológicas de los insectos generalistas y especialistas. Ambas hipótesis consideran que los fitoquímicos limitan la dieta de los insectos, ya sea porque éstos carecen de la capacidad para detoxificar metabolitos de potenciales hospederos o porque son incapaces de reconocerlos como hospederos. En un punto medio está la hipótesis del espacio libre de enemigos, que a diferencia de las dos hipótesis anteriores o de dos niveles tróficos, involucra al tercer nivel trófico en la comparación entre las ventajas y desventajas de la amplitud de dieta. De acuerdo a esta hipótesis la química vegetal puede ejercer un papel dual. Por un lado puede tener un efecto “Bottom-up” (ascendente) sobre los enemigos naturales, porque los compuestos antiherbívoros pueden reducir la adecuación de los enemigos naturales, sobre todo si el herbívoro los secuestra. Por el otro lado, un efecto “Top-down” (descendente) puede ocurrir si las emisiones de compuestos volátiles atraen a los enemigos naturales. Sin embargo, no está claro cuál de estas dos fuerzas es más importante en la determinación de la amplitud de dieta de los insectos fitófagos. A continuación se revisa cómo se comporta la química vegetal, el alimento de los insectos, y el tercer nivel trófico en los fitófagos especialistas y generalistas, y posteriormente se hace una síntesis de la evidencia empírica y teórica sobre estas tres hipótesis. Para realizar este ejercicio se desmenuzan sus principales predicciones respecto a la amplitud de dieta de los insectos fitófagos y se balancea la evidencia tanto a favor como en contra.

### **La variación fitoquímica como rasgo evolutivo. La isla de recursos**

La producción de MS por parte de las plantas es un rasgo que las ha acompañado desde su origen y a lo largo de su evolución (Pichersky & Gang, 2000; Theis & Lerchau, 2003). Los MS desempeñan múltiples funciones que pueden ser de defensa o resistencia contra factores bióticos (contra herbívoros, microorganismos patógenos y en la competencia contra otras plantas) y abióticos (contra sequía, temperatura y radiaciones), así como para atraer y/o mantener polinizadores, dispersores, y mutualistas (Hartmann, 2007).

ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

Desde el punto de vista de un insecto las plantas representan un recurso heterogéneo cuya variación se manifiesta de múltiples formas (entre tejidos, individuos, poblaciones y comunidades) como características morfológicas, formas de crecimiento, fenología, parasitoides y predadores asociados, distribución geográfica, hábitat, concentración de nutrientes y metabolitos secundarios (Nyman, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2012). Un linaje vegetal es visto como una isla de recursos (limitada en tiempo y espacio) y junto con las especies relacionadas forman un archipiélago de recursos del cual depende la evolución de los insectos en cuanto al uso de los recursos (Janzen, 1968).

Particularmente los metabolitos secundarios vegetales pueden manifestar diferentes actividades biológicas, como atrayentes o repelentes, antialimentarios y tóxicos, inhibidores o estimuladores (Bernays & Chapman, 1994). La variación fitoquímica ocurre, dentro de cada individuo (diversidad alfa), dentro de poblaciones (diversidad beta) y entre poblaciones (diversidad gama), en el espacio y en el tiempo (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2013). De tal forma que para un insecto, las plantas representan blancos evolutivos móviles, por lo que la variación fitoquímica representa por sí misma un rasgo defensivo (Nyman, 2010).

Toda la variación fitoquímica (fenotipo) se puede atribuir a los genes, al ambiente y a la interacción de ambos, pero la ontogenia (Barton & Koricheva, 2010), las diferencias entre tejidos (Courtois *et al.*, 2012), el ciclo anual y el circadiano, la edad de la planta (Coley, 1983; Bowers & Stamp, 1993; Liu *et al.*, 1998), el ambiente y la interacción con otros organismos explican tanto la variación fitoquímica cuantitativa como la cualitativa (Moore *et al.*, 2013). Por ejemplo, la cantidad de agua y el daño ejercido por áfidos tienen un efecto en la concentración de glucosinolatos y flavonoides en *Arabidopsis thaliana* (Mewis *et al.*, 2012; véase García-Rodríguez *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2013 para más ejemplos).

### Teoría de la coevolución fitoquímica

Una de las teorías que ha tenido mayor impacto en la investigación de las interacciones planta-insecto es la teoría de la coevolución fitoquímica (Ehrlich & Raven, 1964), la cual propone un modelo que explica tanto el patrón de especialización de los insectos herbívoros como el patrón de distribución de metabolitos secundarios tóxicos en plantas taxonómicamente relacionadas. Esta teoría propone que las interacciones de plantas e insectos son responsables de la diversificación de las plantas y los insectos herbívoros, y se basa en el hecho de que los grupos hermanos (linajes emparentados que tienen la misma edad evolutiva) de insectos no fitófagos están menos diversificados (Mitter *et al.*, 1988).

CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

El proceso propuesto por Ehrlich y Raven (1964) consta de cinco pasos:

1. Mediante mutación o recombinación, las plantas adquieren un compuesto químico novedoso, dicho compuesto reduce la idoneidad de la planta como alimento para los herbívoros.
2. Protegida de la herbivoría, la planta puede entrar en una nueva zona adaptativa y la diversificación puede tener lugar.
3. Mediante mutación o recombinación, un insecto fitófago adquiere la capacidad para anular o tolerar la toxicidad del compuesto y entonces puede utilizar la planta previamente protegida.
4. Este insecto entonces entra en una nueva zona adaptativa y puede experimentar diversificación coevolutiva.
5. La antigua toxina puede llegar a ser una pista para el reconocimiento del hospedero o un atrayente para los herbívoros adaptados.

El concepto de coevolución de Ehrlich y Raven (1964) no fue definido formalmente, pero se le conoce como “coevolución por escape y radiación”. Otra definición formal fue desarrollada por Janzen (1980), quien la define como: un cambio evolutivo en un rasgo en los individuos de una población en respuesta a un rasgo de los individuos de una segunda población, seguido por una respuesta evolutiva en la segunda población al cambio en la primera. De tal forma que la coevolución (agonista o antagonista) entre dos poblaciones requiere reciprocidad, especificidad y simultaneidad. Este tipo de coevolución es conocido como “coevolución por pares”, donde en ejemplos extremos puede ocurrir coevolución gen por gen, como en el caso de fitopatógenos y cultivos (Flor, 1971). Otro tipo de coevolución ocurre si se relaja el criterio de especificidad, denominado coevolución difusa (Fox, 1981), cuando dos o más especies de herbívoros tienen un hospedero en común y el patrón de selección ejercido por cada herbívoro es dependiente de la presencia de los otros herbívoros (Iwao & Rausher, 1997). En el extremo opuesto a la coevolución gen a gen está el proceso de evolución secuencial, en el cual se asume que la herbivoría no constituye una presión de selección sobre las plantas, y que éstas se diversifican debido a otros factores (climáticos, nutricionales y competencia). Cuando las plantas se diversifican y forman nuevas especies constituyen un recurso heterogéneo (tanto en su constitución física como química) sobre el cual los insectos se adaptan y más tarde diversifican en nuevas especies. De modo que la evolución de los insectos sigue a la evolución de las plantas y los fitoquímicos sirven como una señal para reconocer a su hospedero (Jermy, 1976).

La teoría de la coevolución fitoquímica, a nivel microevolutivo, involucra al proceso de coadaptación, es decir, el desarrollo de defensas y contra defensas (una

carrera armamentista química), mientras que a nivel macroevolutivo involucra al proceso de coespeciación, el incremento de las tasas de especiación de insectos y plantas debido a su interacción. En este punto es necesario hacer una acotación para diferenciar entre el modelo de coevolución por escape y radiación propuesto más tarde por Thompson (1989, 1998), y el de Ehrlich y Raven (1964). Este último es un caso especial de carrera armamentista química entre insectos fitófagos y plantas, mientras que el modelo de coevolución de Thompson es más general, menciona que ocurre en un mosaico geográfico de interacciones e involucra interacciones entre otras posibles parejas de organismos como: polinizadores-plantas con flores, bacterias-bacteriófagos, mamíferos-parásitos intestinales, por mencionar algunas. En estas interacciones también se puede desarrollar una carrera armamentista pero que no considera únicamente a las innovaciones químicas como motor de la diversificación.

La teoría coevolutiva considera que existe una disyuntiva ecológica o compromiso (trade-off) entre los insectos fitófagos generalistas y especialistas (Cornell & Hawkins, 2003). Los especialistas pagan el costo de la especialización perdiendo la capacidad para alimentarse de otras plantas, de acuerdo al principio “aprendiz de todo, maestro de nada”, también denominado “paradigma especialista-generalista”. De acuerdo a esta teoría, la especialización en la dieta es resultado del proceso coevolutivo con sus plantas hospederas. Sin embargo, la validez del paradigma ha sido fuertemente cuestionada, y recientemente se han mostrado sus limitaciones y debilidades (Ali & Agrawal, 2012). De forma análoga, una carrera armamentista en la cual las plantas producen compuestos más y más tóxicos es cuestionable, como se discutirá más adelante.

### **La Carrera Armamentista entre Plantas e Insectos Fitófagos**

De acuerdo al modelo de Ehrlich y Raven, como consecuencia de la coevolución y las radiaciones adaptativas, los metabolitos secundarios (MS) ampliamente distribuidos corresponden a vestigios de radiaciones ancestrales y por lo tanto son menos tóxicos para los insectos porque éstos han tenido tiempo para adaptarse. Los MS de distribución taxonómica restringida corresponden a huellas de radiaciones recientes y por lo tanto son tóxicos para la mayoría de los insectos excepto para algunos especialistas que se han adaptado. Los insectos fitófagos deben desempeñarse mejor en presencia de compuestos a los que se han adaptado y esta tendencia debe ser más fuerte para especialistas que para generalistas (Berenbaum, 1983; Cornell & Hawkins, 2003).

Para probar estas predicciones, Cornell y Hawkins (2003) realizaron un meta-análisis de la riqueza química y distribución en la flora y su efecto sobre la mortalidad

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

y disminución del crecimiento de insectos fitófagos generalistas y especialistas. Su análisis muestra que los MS de distribución taxonómica restringida son más tóxicos para insectos generalistas y en general apoyan la teoría de coevolución fitoquímica. Sin embargo, sus datos corresponden en un 80% a lepidópteros, y la remoción de los datos de este grupo hace que el análisis no sea significativo para otros órdenes de insectos. Por eso, su generalización al resto de los insectos fitófagos puede ser cuestionable. Además solo consideran a los compuestos antiherbívoros (tóxicos) como innovaciones químicas clave aunque otros compuestos (p. ej. disuasivos) también pueden disminuir la idoneidad de una planta como alimento.

### Diferencias entre Insectos Herbívoros Especialistas y Generalistas

Otras predicciones derivadas del modelo de Ehrlich y Raven (1964) es que los insectos adquieren mecanismos que les permiten anular o tolerar las toxinas vegetales mediante cambios bioquímicos. Si se considera este modelo como coevolución gen a gen, el resultado de la carrera armamentista sería una escalada de compuestos estructuralmente relacionados cada vez más tóxicos e insectos con mecanismos de detoxificación cada vez más específicos. Y los insectos generalistas tendrán mecanismos generales para anular a una gran variedad de compuestos (Cornell & Hawinks, 2003).

Deprés y colaboradores (2007) recopilaron los mecanismos de resistencia de los insectos a las toxinas vegetales, y muestran que tanto los cambios en el comportamiento (evasión) y en el metabolismo de los insectos (anulación), están involucrados en la resistencia a esta clase de compuestos. A nivel conductual, los insectos pueden evitar comer plantas tóxicas tan pronto como sean capaces de detectarlas a distancia (visualmente, o por medio del olfato) o por contacto (Chapman, 2003). Los mecanismos de evasión pueden ser aprendidos y en algunos casos pueden estar genéticamente determinados (Bernays, 1993). Los insectos pueden escapar de las toxinas vegetales alimentándose de órganos que no contienen la toxina o bien se alimentan de la planta en etapas de desarrollo donde no está presente la toxina o está en concentraciones bajas. Otros insectos desactivan las defensas vegetales cortando vasos que conducen las sustancias tóxicas y alimentándose posteriormente. Otro síndrome consiste en ingerir las toxinas vegetales, acumularlas y posteriormente excretarlas o perderlas durante las mudas. Otros insectos incluso son capaces de secuestrar los metabolitos vegetales y utilizarlos como defensa contra sus patógenos y depredadores.

ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

En cuanto a los mecanismos de anulación, algunos insectos poseen enzimas que biotransforman xenobióticos como las citocromo P450 monooxigenasas, glutatión S-transferasas y carboxilesterasas, entre otras (Deprés, 2007). Adicionalmente, los insectos pueden evitar la toxicidad de los fitoquímicos regulando su absorción en el intestino a través de bombas de flujo (Sorensen & Dearing, 2006). La resistencia a toxinas vegetales también puede ocurrir por mutaciones en los genes que codifican para las enzimas que son el sitio diana de las toxinas. Por ejemplo, las plantas de la familia *Apocynaceae* producen una clase de lactonas triterpénicas, llamadas cardenólidos, los cuales son muy tóxicos para insectos y mamíferos debido a que inhiben la subunidad alfa de la bomba intercambiadora de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), una enzima clave en los procesos de contracción muscular, función neural y otros procesos que requieren el transporte de cationes. Muchos insectos de al menos cuatro grupos (mariposas, áfidos, escarabajos y moscas), que se alimentan de plantas que contienen cardenólidos han experimentado mutaciones en el gen que codifica para la subunidad alfa de la ATPasa (ATP $\alpha$ ) que ha llevado a sustituciones de aminoácidos en el sitio de unión de los cardenólidos a esta enzima (Zhen *et al.* 2012; Dobler *et al.* 2012).

Como se ha mencionado, los insectos emplean mecanismos de anulación y evasión de los compuestos tóxicos de plantas, que pueden ser conductuales, estructurales (cambios en los blancos de los metabolitos secundarios) o bioquímicos (expresión constitutiva o inducida de enzimas detoxificadoras). La pregunta que surge es: ¿Existen diferencias entre los mecanismos de evasión y anulación de la defensa química vegetal entre generalistas y especialistas?

Por ejemplo, Johnson (1999) compara la capacidad de anulación de un insecto especialista y dos generalistas de la planta *Magnolia virginiana*, la cual contiene dos fenilpropanoides con actividad biológica sobre insectos (magnolol y bifenil éter). Estos compuestos tienen poco efecto tóxico en las orugas de *Callosamia securifera* (especialista de *M. virginiana*) mientras que son tóxicos para las orugas de dos especies de polillas estrechamente relacionadas, *C. angulifera* y *C. promethea*. Las orugas de las tres especies de polillas anulan estos compuestos a través de enzimas tipo citocromo P450, sin embargo la polilla especialista degrada tres veces más rápido los compuestos evaluados (Johnson, 1999).

La hierba de San Juan, *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) produce hipericina en sus hojas e inflorescencias. La hipericina es una toxina activada por la luz que produce oxígeno singulete (átomo de oxígeno en un estado excitado) que es altamente reactivo. Guillet y colaboradores (2000) evaluaron las adaptaciones bioquímicas y de comportamiento de insectos generalistas y especialistas que se alimentan de la hierba de San Juan. Los autores reportan que los insectos generalistas prefirieron alimentarse de las partes de las hojas que no tienen la fototoxina, mientras que los



## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

especialistas no discriminaron entre distintas partes de las hojas, pero se alimentaron de las hojas no expuestas al sol (fototaxis negativa) lo cual quizá previene la activación de la hipericina. Los autores además midieron la actividad (constitutiva e inducida) de dos enzimas consideradas como adaptaciones bioquímicas para reducir el estrés oxidativo, a saber, la glutatión-reductasa y la glutatión S-transferasa. Los insectos especialistas tuvieron menor actividad constitutiva de estas dos enzimas con respecto a los generalistas. Pero en los insectos especialistas la actividad de la glutatión S-transferasa fue inducida por la aplicación de hipericina mientras que en los insectos generalistas esto no ocurrió (Guillet *et al.*, 2000).

En una revisión reciente, Pentzold y colaboradores (2013) comparan los diferentes mecanismos de evasión y anulación entre generalistas y especialistas contra las defensas químicas de toxinas activadas por  $\beta$ -glucosidasas. Este tipo de defensas consisten en que las toxinas como glucosinolatos, benzoxazinoides, glucósidos cianogénicos, glucósidos iridoides, salicinoides y glucósidos de alcaloides, se encuentran inactivos y separados de las enzimas activadoras en compartimentos o células diferentes dentro de los tejidos vegetales. Como consecuencia de la alimentación del insecto herbívoro, ocurre la ruptura de las células y las enzimas  $\beta$ -glucosidasas entran en contacto con su sustrato y liberan la toxina.

Los mecanismos de anulación de esta clase de defensas de dos componentes pueden ocurrir mediante: a) inhibición de las  $\beta$ -glucosidasas vegetales (p. ej. cambios de pH en el intestino); b) reducción de la actividad de  $\beta$ -glucosidasas endógenas; c) modificación del sustrato, el cual ya no es reconocido por su enzima (p. ej., desulfuración); d) excreción; o e) secuestro. Algunos de estos mecanismos son exclusivos de especialistas, mientras que otros son compartidos por generalistas y especialistas. Por ejemplo, las plantas crucíferas poseen el sistema de defensa mirosinasa-glucosinolato. Los glucosinolatos están conformados por una molécula de  $\beta$ -tioglucosa unida a una oxima sulfonada con una cadena lateral variable; cuando los herbívoros se alimentan de estas plantas, la enzima mirosinasa degrada los glucosinolatos y libera sustancias tóxicas como isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos. La polilla *Plutella xylostella* es una especialista de plantas crucíferas que posee en el intestino una enzima desulfatasa constitutiva, que evita la degradación de los glucosinolatos. Esta enzima elimina el grupo sulfato de los glucosinolatos impidiendo que sean reconocidos y por lo tanto activados por la mirosinasa (Ratzka *et al.* 2002). Sin embargo, este mecanismo también ha sido reportado en insectos generalistas como la langosta *Schistocerca gregaria* (Falk & Gershenson, 2007), con la diferencia de que en este insecto la expresión de la enzima desulfatasa es inducible.

Lo más sobresaliente de la revisión de Pentzold *et al.* (2013) es que en los insectos especialistas los mecanismos de adaptación a metabolitos vegetales son constitutivos

y en los generalistas son inducidos. De los 43 estudios analizados, solo uno reporta un mecanismo de anulación de toxina inducible en el intestino de un insecto especialista, en contraste con 6 estudios que reportan la inducción de tres distintas enzimas de anulación en 8 insectos generalistas.

Los mecanismos de anulación inducidos en insectos generalistas incluyen la reducción de la actividad  $\beta$ -glucosidasa endógena, por ejemplo, en la desactivación de glicósidos de alcaloides (Desroches *et al.*, 1995, 1997), glucósidos cianogénicos (Azevedo *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 1997), glucosinolatos (Mainguet *et al.*, 2000), glicósidos iridoides (Pankoke *et al.*, 2010, 2012) y salicinoides (Hemming & Lindroth, 2000). También en insectos generalistas, la actividad de la enzima glutatión S-transferasa es inducible, por ejemplo en la metabolización de glucosinolatos (Francis *et al.*, 2005), y de salicinoides (Hemming & Lindroth, 2000).

Los autores señalan que tanto generalistas como especialistas pueden superar la toxicidad de sus hospederos, pero los generalistas lo hacen reduciendo la cantidad de toxinas ingeridas, alimentándose un corto tiempo de diferentes hospederos, mientras que los especialistas prefieren a las plantas con niveles intermedios o altos de compuestos defensivos (Pentzold *et al.* 2013).

Pero ¿cómo reconoce un insecto generalista cuándo dejar de comer para no morir intoxicado? Investigaciones recientes han dilucidado parcialmente este enigma; se ha demostrado que la sensilas mandibulares de las larvas de la polilla polífaga *Pyrrharctia isabella* son muy sensibles a la presencia de ciertos aleloquímicos como alcaloides pirrolizidínicos o glicósidos iridoides en los tejidos vegetales. Estos compuestos inicialmente estimulan la alimentación de las larvas, pero tan pronto como las larvas acumulan estas toxinas llegan a ser menos receptivos hasta el punto de reconocerlas como inhibidores. Esto lleva a la larva a un cambio de dieta hacia plantas con otro tipo de MS (Bernays & Singer, 2005; Singer *et al.*, 2009), aunque cabe señalar que este mecanismo solo es válido para larvas que tienen el hábito de forrajeo (que pueden moverse entre plantas en busca de alimento). Mientras que en los insectos cuyas larvas no pueden reubicarse por sí mismas en otras plantas (como las larvas que barrenan ramas y troncos o las que forman agallas) la selección del mejor hospedero depende de la elección del sitio de oviposición por la hembra y de cómo ésta evalúa la calidad nutricional y la toxicidad del hospedero (Dicke, 2000).

Entonces, los insectos generalistas tienen la capacidad de expresar selectivamente las enzimas anuladoras de toxicidad y digestivas *ad hoc* para la planta de la cual se alimentan. Hay algunos estudios que le dan fuerte sustento a esta afirmación. Por ejemplo, las enzimas de la familia citocromo P450 están involucradas en la anulación de la toxicidad de xenobióticos tanto en insectos como en mamíferos. Así, es de esperarse que los insectos generalistas posean un arsenal mucho más variado de

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

citocromos P450 que los insectos especialistas, pues los citocromos de los hospederos incrementan su actividad o se expresan selectivamente ante variados metabolitos o diferentes hospederos. La mariposa *Papilio polyxenes* es un insecto especialista que se alimenta exclusivamente de plantas que contienen furanocumarinas y posee dos genes (CYP6B1 y CYP6B3) que codifican la producción de enzimas tipo citocromo P450 que anulan eficientemente a estas toxinas. En contraste, la polilla generalista *Helicoverpa zea*, la cual puede alimentarse de cientos de plantas, tiene cuatro genes relacionados (de la familia CYP6B) que son inducibles en respuesta a una gran variedad de metabolitos comunes en muchas plantas (Li *et al.*, 2004 y referencias allí). El citocromo CYP6B1 de *P. polyxenes* depura 30 veces más rápido la xantotoxina (una furanocumarina) con respecto al CYP6B8 de *H. zea*. Pero a diferencia del CYP6B1 que es específico para furanocumarinas, el CYP6B8 detoxifica un amplio espectro de metabolitos, tanto fitoquímicos (xantotoxina, quercetina, flavona, ácido clorogénico, indol-3-carbinol y rutina), como insecticidas (diazinón, cipermetrina y aldrín) (Li *et al.*, 2004).

Así, los insectos generalistas al cambiar de hospedero deben experimentar una extraordinaria remodelación fisiológica de su intestino. Una estrategia muy eficiente para visualizar de forma completa cómo se transforma el intestino de los insectos es estudiando el transcriptoma (totalidad de genes que son transcritos en un momento y etapa del ciclo celular) o el proteoma (totalidad de proteínas expresadas en un momento y etapa del ciclo celular). Este tipo de estudios permiten identificar cambios en el metabolismo del insecto cuando se alimenta de diferentes plantas, ya sea monitoreando el cambio en la transcripción de genes asociados con la resistencia a xenobióticos y genes asociados con la asimilación de nutrientes, o bien el cambio en la expresión de enzimas digestivas o de resistencia. Por ejemplo, las proteasas tripsina y quimiotripsina de *Helicoverpa armigera*, una polilla generalista, experimentan cambios cualitativos y cuantitativos en su expresión dependiendo de los inhibidores de proteasas producidos por la especie de planta en la cual se alimenta. La expresión de algunas proteasas es específica del tipo de planta en que se alimenta, por lo que estas enzimas pueden estar implicadas en la adaptación de su metabolismo (Chikate *et al.*, 2013).

En otro estudio, la polilla generalista *Trichoplusia ni* cuando se alimenta de una planta defendida por glucosinolatos (*A. thaliana*) induce la transcripción de genes que codifican para enzimas que anulan toxicidad de MS. Pero cuando esta polilla se alimenta de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) se incrementa la expresión de enzimas digestivas y se reduce la expresión de enzimas anuladoras (Herde & Howe, 2014).

Celorio-Mancera y colaboradores (2013) proponen que la plasticidad transcripcional de los insectos generalistas ocurre a través de la regulación de tres principales grupos de genes relacionados a la dieta: genes ribosomales, digestivos y anuladores de toxinas.

Ellos analizan el transcriptoma completo (RNA seq) de dos diferentes instares (etapas de transformación) de las larvas de la mariposa *Polygonia c-album* alimentándose ya sea de *Urtica dioica* o *Ribes uva-crispa*. Esta mariposa pertenece a la tribu Nymphalini, la cual tiene una asociación ancestral con las plantas de la familia Urticaceae. Muchas de estas mariposas se alimentan exclusivamente de plantas de la familia Urticaceae (orden Rosales), mientras que pocas de ellas han expandido su espectro de hospederos a otras familias de Rosales y de otros órdenes como Apiales, Fagales, Malpighiales y Saxifragales, como es el caso de *P. c-album* (NIC.FUNET.FI, 2015). Los resultados muestran que los genes ribosomales de *P. c-album* experimentaron regulación a la alta cuando se crió en *U. dioica*, mientras algunos genes que codifican para proteínas transportadoras y de unión a membranas (digestivas) tuvieron este comportamiento pero cuando las larvas fueron criadas en *R. uva-crispa*. Por otra parte, los genes relacionados a la anulación de toxicidad mostraron una regulación diferencial que fue hospedero e instar específica. Esta dinámica en la regulación de genes nos habla de la enorme plasticidad de respuesta adaptativa de este insecto generalista.

Sin embargo, si se comparan los cambios transcripcionales de un insecto herbívoro especialista y uno generalista en respuesta a la variación de la defensa dentro de un mismo hospedero, el panorama cambia drásticamente. Por ejemplo, Govind y colaboradores (2010) comparan los cambios globales en la expresión de genes de un insecto especialista (*Manduca sexta*) y un generalista (*Heliothis virescens*), provocados por la defensa inducida en *Nicotiana attenuata* debido a la herbivoría de cada especie de larva. A través de microarreglos de cDNA los autores obtienen la respuesta transcripcional de larvas neonatas alimentándose 24 h en plantas de *N. attenuata* silvestre previamente tratada con jasmonato de metilo. Posteriormente comparan la respuesta transcripcional de larvas neonatas alimentándose de plantas transgénicas con diferentes niveles de supresión de la defensa (sin producción de nicotina, sin producción de nicotina e inhibidores de proteasa y con la ruta del ácido jasmónico suprimida). En general, las larvas de *M. sexta* regulan a la baja sus genes en los diferentes tratamientos, mientras que *H. virescens* regula tanto a la baja como a la alta genes de la misma categoría funcional. Además, *M. sexta* regula sus genes dependiendo de su dieta específica, mientras que *H. virescens* regula transcritos similares a través de todos los tipos de dieta. Por ejemplo cuando *M. sexta* se alimenta de plantas con inhibidores de proteasa silenciados regula a la baja las serin-proteasas, mientras que *H. virescens* incrementa la producción de todas sus proteasas, como una respuesta generalizada, cuando se alimenta de plantas con cualquiera de los niveles de defensa silenciados. Estos resultados están en concordancia con la expectativa de que los insectos especialistas están más adaptados que los generalistas a las defensas de su hospedera.

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

Entonces los insectos fitófagos generalistas muestran una plasticidad fisiológica entre hospederos (horizontal) lo cual empata muy bien con el concepto de especialistas multihospedero propuesto por Barrett y Heil (2012). En cambio, los insectos fitófagos especialistas muestran una plasticidad fisiológica intra-hospedero, al menos en cuanto a su respuesta a la defensa inducida. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios como para adelantar conclusiones.

En resumen, la diferencia entre los mecanismos de anulación de toxicidad o tolerancia de los metabolitos tóxicos vegetales entre insectos fitófagos generalistas y especialistas, no apoya las predicciones de la coevolución fitoquímica entre las plantas y sus herbívoros. Los mecanismos de evasión por cambios conductuales tienen un papel tan importante como los mecanismos bioquímicos de anulación de toxicidad. Esto implica que la adaptación de los insectos a sus plantas hospederas no siempre sucede por coevolución en cualquiera de sus modalidades, y por lo tanto, la selección de sustancias (metabolitos o proteínas) que afectan la preferencia, la alimentación y el desempeño de los insectos es uno de los posibles resultados de una carrera armamentista. Además, las ventajas fisiológicas de los insectos especialistas para explotar más eficientemente un recurso, pueden ser aparentes si consideramos la capacidad de los insectos generalistas para inducir cambios hospedero específicos en su sistema digestivo. Y por lo tanto, la adopción de una nueva planta hospedera, de diferente género en los insectos especialistas; o de diferente orden en los generalistas, depende de una gran parte de la información almacenada en el genoma de los insectos y no solo de novedades genéticas producidas por coevolución.

### **Respuesta Inducida de Defensa Directa e Indirecta de las Plantas por Herbívoros Generalistas y Especialistas**

Otra posibilidad de analizar las consecuencias de la carrera armamentista entre plantas e insectos herbívoros es estudiando la respuesta inducida en las plantas tras el ataque de los herbívoros (desde el punto de vista de la planta), o bien la forma en que los insectos manipulan a la planta. La defensa inducida puede ser directa, a través de la producción de metabolitos y cambios fisiológicos que afectan el desempeño del herbívoro, o indirecta mediante la liberación de compuestos volátiles que atraen enemigos naturales de los herbívoros (Kahl *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que la respuesta vegetal inducida debe ser específica para cada insecto especialista, mientras que para los generalistas, la planta debe desencadenar

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

una respuesta tan fuerte como le sea posible, o bien, con un agente defensivo de amplio espectro. Desde el punto de vista del insecto, los generalistas deben suprimir la respuesta inducida de las plantas debido a que son más sensibles a las toxinas vegetales; en tanto que los especialistas deben minimizar la inducción de altos niveles de defensa siempre y cuando el insecto no secuestre compuestos (Ali & Agrawal, 2012).

En cuanto a la defensa indirecta, se ha documentado ampliamente que las emisiones de compuestos volátiles inducidos por herbivoría (ECVIH) atraen a los enemigos naturales (EN) de los herbívoros (Dicke, 1999; Hare, 2011). Sin embargo, no se ha demostrado con similar número de estudios que la atracción de EN proporcione un beneficio a la adecuación de la planta emisora (Dicke & Baldwin, 2009; Schuman *et al.*, 2012). En cuanto a la selectividad, se esperaría que las plantas liberaran ECVIH específicos que permitieran a los EN reconocer a su presa, sin embargo, los resultados han sido mixtos (Dicke 1999; Hare, 2011; pero ver McCormick *et al.*, 2012 y referencias allí). Mientras que sí se ha observado un patrón en las ECVIH debido a la edad de las larvas y al gremio de alimentación. Los insectos masticadores activan la ruta de señalización del ácido jasmónico, mientras que los succionadores inducen la señalización dependiente del ácido salicílico (McCormick *et al.*, 2012).

Con respecto a la defensa inducida directa, Ali y Agrawal (2012) exploran la validez de estas predicciones recopilando los experimentos que han sido realizados recientemente en este sentido. Los autores señalan que estas investigaciones se han llevado a cabo comparando las respuestas fenotípicas o transcripcionales desencadenadas tras la herbivoría o posteriores a la aplicación de regurgitados de insectos, pero los trabajos con el rigor suficiente para probar las predicciones anteriores son escasos. Algunos estudios comparan un insecto generalista contra un insecto especialista, en el mejor de los casos, estrechamente relacionados; o en el peor de los casos con modos de alimentación diferentes, lo que hace imposible llegar a conclusiones claras. De 17 estudios analizados sólo 6 son consistentes con las predicciones planteadas pero evalúan únicamente pares de especies de insectos.

Uno de los mejores estudios es el realizado por Bidart-Bouzat y Kliebenstein (2011), el cual establece el modelo metodológico para evaluar con rigor la diferencia en la respuesta vegetal inducida por insectos herbívoros de diferente amplitud de dieta y gremio de alimentación. Los autores evalúan en *Arabidopsis thaliana* la variación fenotípica en producción de glucosinolatos y transcripcional sobre las rutas bioquímicas de defensa [la ruta del ácido jasmónico (AJ), la del ácido salicílico (AS) y la ruta del etileno (ET)] en respuesta a la herbivoría de tres especialistas (*Plutella xylostella*, *Pieris rapae* y *Brevicoryne brassicae*) y tres generalistas (*Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* y *Myzus persicae*). Sus resultados muestran que no hay diferencias en las respuestas transcripcionales debido a la especialización pero sí hay una diferencia

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

entre lepidópteros que son masticadores y áfidos que succionan la savia. Los genes que regulan la ruta del ácido jasmónico incrementaron su expresión por el ataque de los lepidópteros y disminuyeron su expresión por el ataque de los áfidos. Siguiendo un patrón similar, los glucosinolatos alifáticos incrementaron en concentración debido a la herbivoría de los lepidópteros, y no se modificó su concentración debido a los áfidos. Estos resultados, muestran que el gremio de alimentación del insecto (chupadores *versus* masticadores) tiene un efecto más importante que la especialización en la respuesta inducida en la planta, posiblemente por el tipo de daño que ocasiona cada gremio de insecto (Pentzold, 2013).

La respuesta vegetal inducida se debe al reconocimiento de inductores propios de los herbívoros que activan las diferentes vías metabólicas de defensa vegetal. Algunos inductores pueden ser enzimas como glucosa oxidasa o  $\beta$ -glucosidasa, aminoácidos N-alquilados con lípidos (p. ej. volicitina), ácidos grasos que contienen azufre (caeliferinas), fragmentos de pared celular (pectinas y oligogalacturónidos) y las inceptinas, que son péptidos unidos por puentes disulfuro liberados tras la digestión de las proteínas vegetales (Bonaventure *et al.*, 2011). La enzima glucosa oxidasa, por ejemplo, es secretada en la saliva de las orugas (lepidópteros) y está involucrada en la evasión de la defensa vegetal. La glucosa oxidasa se encuentra en mayor abundancia en lepidópteros polívoros que oligófagos, sugiriendo que este mecanismo de desarme es generalizado. Sin embargo, la actividad de la glucosa oxidasa en el generalista *Manduca sexta* varía dependiendo de la planta hospedera de la cual se alimenta (Eichenseer *et al.*, 2010). Un estudio reciente ha encontrado que esta misma enzima es capaz de activar la defensa del tomate. La aplicación de glucosa oxidasa induce la formación de tricomas y la expresión de una proteína defensiva (inhibidor de proteasa) en comparación con el daño mecánico (Tian *et al.*, 2012).

Las plantas responden de manera diferente a la variación en la composición de inductores tipo volicitina activando diferentes vías metabólicas (Voelckel & Baldwin, 2004). Los compuestos tipo volicitina varían en composición y proporción de una especie de lepidóptero a otra, mientras que en otras especies están ausentes. Por lo tanto, las plantas pueden ser capaces de reconocer a sus herbívoros específicamente y montar respuestas específicas (Yoshigada *et al.*, 2010).

Los estudios realizados hasta la fecha no apoyan la predicción de que la respuesta vegetal inducida depende del grado de especialización del insecto. Al parecer, las plantas son capaces de responder específicamente a diferentes herbívoros sean generalistas o especialistas. La respuesta vegetal depende de la historia evolutiva de cada insecto con su planta hospedera (Bonaventure *et al.*, 2011; Ali & Agrawal, 2012).

Estos resultados no prueban que la coevolución fitoquímica no ocurre, sino que una carrera armamentista por coevolución por pares no explica el patrón de especialización

de los insectos fitófagos. Sin embargo, existen algunos estudios que muestran que la coevolución fitoquímica por pares es posible entre insectos herbívoros y plantas aunque resulta muy complicado probarla formalmente (Berembaum *et al.*, 1996; Bacteria, 2003; Wheat *et al.*, 2007).

### El Papel de la Herbivoría en el Mantenimiento de la Diversidad Fitoquímica

Existe evidencia empírica sólida de que los insectos ejercen selección diversificadora sobre las plantas. Los herbívoros seleccionan a plantas con una composición química particular (Simms & Rausher, 1989; Mauricio & Rausher, 1997; Agrawal, 2005, 2012; Züst *et al.*, 2012). Dos investigaciones recientes realizadas de manera independiente le dan fuerte sustento a esta aseveración. Por una parte, Agrawal (2012) realizó un experimento de selección en campo utilizando como modelo la planta *Oenothera biennis*. Se emplearon 18 genotipos de esta planta que fueron sembrados en 16 parcelas con 30 individuos cada uno. A la mitad de las parcelas se les aplicó insecticida dos veces por semana durante 4 años. Al final del experimento, en las parcelas sin supresión de insectos los genotipos de plantas que producen más trimeros de elagitaninos (taninos implicados en la defensa química) fueron más abundantes, mientras que en las parcelas libres de insectos los genotipos más abundantes fueron aquellos que crecen más rápido y son más competitivos con otras hierbas.

Por otra parte, Züst *et al.* (2012) estudiaron poblaciones naturales de *Arabidopsis thaliana* en Europa y encontraron una correlación en la distribución geográfica de quimiotipos de *A. thaliana* que poseen el locus GS-ELONG (regula el tamaño de la cadena lateral de los glucosinolatos) y la distribución de dos áfidos que se alimentan de esta planta, *Brevicoryne brassicae* y *Lipaphis erysimi*. Los autores postulan que la herbivoría por parte de estos áfidos es responsable del patrón de distribución de los quimiotipos de *A. thaliana*. Para demostrar la causalidad, los autores realizaron un experimento de 5 generaciones ensamblando 30 poblaciones con los diferentes genotipos de *A. thaliana* (que producen diferentes combinaciones de glucosinolatos) que fueron expuestas a los áfidos. Al término del experimento, cada áfido seleccionó plantas de genotipos con glucosinolatos idénticos a aquellos localizados geográficamente donde cada especie de áfido predomina.

Los insectos especialistas y generalistas ejercen una presión de selección en sentido opuesto sobre la química vegetal. Si una planta incrementa la producción



## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

de compuestos tóxicos que le permiten liberarse de sus herbívoros generalistas, puede no ser muy favorable si esos mismos compuestos son preferidos por insectos especialistas, especialmente si los secuestran (van der Meijden, 1996; Lankau, 2007; Macel, 2011). De manera análoga, las emisiones volátiles pueden ser percibidas como atrayentes para unos insectos y repelentes para otros. Por lo tanto una comunidad de insectos herbívoros puede afectar la frecuencia de ciertos fenotipos químicos en una población vegetal (Linhart *et al.*, 2005; Klein & Müller 2011; Iason *et al.*, 2011). Esta visión empata muy bien con la hipótesis de la defensa óptima, la cual propone que los diferentes tejidos vegetales son defendidos de acuerdo a su valor para la planta, al costo de la defensa y al riesgo de ataque por herbívoros y patógenos (Rhoades & Cates, 1976). Esto resulta en una diversificación de fenotipos químicos agrupados en mosaicos geográficos (Züst *et al.* (2012), esto es, zonas que difieren entre sí en el conjunto de plantas con fenotipos químicos específicos y una comunidad específica de herbívoros. En estos mosaicos geográficos se pueden encontrar configuraciones específicas de plantas y herbívoros que pueden estar coevolucionando activamente, los llamados “hotspots” (puntos calientes), o “coldspots” (puntos fríos), donde no ocurre selección recíproca entre la especie de planta y una especie de consumidor (Thompson, 1994), o bien coevolución difusa, entre el conjunto de consumidores y la especie de planta.

### La hipótesis del procesamiento de la información

En los insectos herbívoros la selección de un hospedero adecuado (para alimentarse, aparearse u ovipositar) depende de varios factores como la abundancia de las plantas, la calidad nutricional y la abundancia de enemigos naturales (Bernays & Chapman, 1994; Cunningham, 2012). El proceso de selección del hospedero implica la evaluación de una gran cantidad de información antes de hacer la elección (Bruce *et al.*, 2005; Bruyne & Baker, 2008) y las señales químicas (sabor u olor), más que la forma o la textura son un factor fundamental en el rechazo o aceptación de una planta por un insecto herbívoro (Bernays & Chapman, 1978; Cunningham, 2012). Estas señales químicas pueden ser percibidas a distancia por el olfato, como los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las plantas, o pueden ser detectados al contacto por quimiorrecepción mediante el gusto como las ceras de la cutícula vegetal. La evolución debe favorecer a los insectos que interpretan adecuadamente la información química a fin de maximizar su éxito reproductivo (Dicke, 2000).

Los olores son detectados por las sensilas (receptores táctiles en las antenas) y envían una señal a los glomérulos del lóbulo antenal donde son procesados. Se

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

ha observado que los insectos generalistas tienen más sensilas y glomérulos que los insectos especialistas (Bernays & Chapman, 1994; Chapman, 1998). Estas observaciones permitieron proponer la hipótesis del procesamiento de la información en los insectos fitófagos (HPI) o de las limitaciones neurales (Levins & MacArthur, 1969; Bernays, 2001).

Esta hipótesis propone que para los insectos la calidad nutricional del hospedero es un buen indicador de la supervivencia de su progenie, pero el comportamiento de selección es limitado por la capacidad de procesamiento de la información, y los fitoquímicos sirven únicamente como indicadores de la calidad del hospedero. Por lo tanto, existe una disyuntiva ecológica en los insectos fitófagos generalistas y especialistas. Los generalistas al tener una mayor cantidad de información que procesar, cometen más errores que los especialistas porque estos últimos procesan una menor cantidad de información. Como consecuencia de las limitaciones neurales, los insectos especializados desarrollan reglas de decisión más estrictas y evalúan eficientemente la composición de sus limitados hospederos mientras, que los generalistas desarrollan reglas de decisión más laxas y evalúan más superficialmente a múltiples hospederos (Cunningham, 2012). Algunas investigaciones han dado apoyo empírico a esta hipótesis (Janz & Nylin, 1997; Bernays & Funk, 1999; Janz, 2003; Egan & Funk, 2006; Liu *et al.*, 2012).

Janz y Nylin (1997) evaluaron la capacidad para diferenciar entre plantas de buena calidad (hojas frescas y verdes) y mala calidad (hojas amarillentas-cafés) de *Urtica dioica* en cuatro mariposas hembras especialistas (*Polygonia satyrus*, *Vanessa indica* e *Inachis io*) y dos generalistas (*Polygonia c-album* y *Cynthia cardui*). Todas las mariposas especialistas seleccionaron a las plantas de mejor calidad para ovipositar, mientras que las mariposas generalistas dejaron igual cantidad de huevos en las plantas de buena y mala calidad. Además, no se encontraron diferencias en la mortalidad y ganancia de peso de las larvas al alimentarse en plantas de buena y mala calidad.

Bruce *et al.*, (2005) señalaron que el reconocimiento del hospedero por parte de los insectos fitófagos ocurre por reconocimiento de mezclas de compuestos volátiles (comunes en muchas plantas) en ciertas proporciones más que por el reconocimiento de compuestos específicos de cada planta hospedera. Esto nos lleva al siguiente corolario de la HPI; los insectos especialistas deben ser más sensibles a los cambios cualitativos en la concentración de metabolitos secundarios (concentración relativa) de su hospedero, mientras que los generalistas deben ser más sensibles a los cambios cuantitativos en la concentración de MS (concentración absoluta) de múltiples hospederos (Carlsson *et al.*, 2011; Cunningham, 2012).

No hay estudios específicos que hayan intentado probar esta propuesta con insectos fitófagos. Sin embargo, hay evidencia empírica, por ejemplo en la respuesta de

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

parasitoides a las emisiones volátiles de plantas atacadas por insectos: Ngumbi *et al.* (2009) realizaron un experimento con parasitoides de orugas del algodón, el generalista *Cotesia marginiventris* (parasitoide de orugas del género *Heliothis* spp. y *Spodoptera* spp.) y el especialista *Microplitis croceipes* (parasitoide de *Heliothis* spp.). Los autores midieron la respuesta electroantenográfica de los parasitoides a las emisiones de volátiles del algodón (*Gossypium hirsutum*) producidos en respuesta al ataque de orugas del género *Heliothis* spp. o *Spodoptera* spp. El perfil de volátiles emitidos por las plantas de algodón fue diferente para cada género del herbívoro. El parasitoide especialista presentó respuestas electroantenográficas más fuertes con los volátiles emitidos por la planta en que se alimentaba su oruga hospedera (*H. virescens*), a pesar de que los volátiles de la planta en que se alimentaba *S. exigua* solo difirieron en concentración y proporción de los mismos compuestos. En contraste, el parasitoide generalista no mostró diferencias obvias en su respuesta a los volátiles inducidos por las diferentes orugas, más bien respondió a los volátiles relacionados al daño (volátiles verdes).

Janz (2003) propone que mientras más hospederos deben ser evaluados, mayor será el costo por parte de un insecto. Dicho costo puede ser pagado de dos formas, en el tiempo invertido para tomar una decisión o en la exactitud de la decisión. Es de esperarse que algunos insectos fitófagos generalistas tomen decisiones más rápidas y en consecuencia cometan más errores, mientras que los insectos especialistas toman decisiones más tardías pero más acertadas (Bernays & Funk, 1999). Esta predicción tiene algo de sustento empírico y teórico por los estudios realizados por Tosh y colaboradores (2003; 2009).

Por otra parte, la hipótesis de preferencia-desempeño (HPD) establece que en los insectos cuyas larvas no pueden reubicarse por sí mismas para buscar alimento, las hembras seleccionan al hospedero que maximiza la supervivencia de su progenie (Jaenike, 1978). La generalización de este principio ha estado largos años en debate y se ha acumulado evidencia tanto a favor como en contra (Thompson, 1988; Mayhew, 2001). De acuerdo a las limitaciones neurales, la hipótesis de preferencia-desempeño debe cumplirse más frecuentemente en insectos especialistas que en generalistas, porque los especialistas cometen menos errores en la selección del mejor hospedero. Gripenberg *et al.* (2010) hicieron un meta-análisis para analizar la evidencia a favor y en contra de la HPD. Los resultados de su análisis no solo apoyan fuertemente esta hipótesis, además muestran un patrón respecto a la amplitud de dieta. Las hembras de insectos especialistas tienen una preferencia más fuerte por plantas de mayor calidad (donde tiene mejor desarrollo su progenie) respecto a sus congéneres generalistas.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

La HPI no aclara cómo los insectos divergieron evolutivamente en su amplitud de dieta, ni cómo es que los generalistas poseen más glomérulos y tienen más neuronas sensibles a compuestos específicos. Una posibilidad es que los genes que gobiernan el olor o sabor hayan experimentado duplicaciones. Un estudio sobre la evolución de los genes del olfato en *Drosophila* muestra que los genes que codifican para las proteínas quimiosensitivas y las proteínas de reconocimiento de olores surgieron por duplicaciones en tándem (mutaciones cromosómicas: cambios numéricos o estructurales), que posteriormente divergieron en secuencia y función, y que pudieron perderse por eliminación de genes (“deleciones”) o pseudo-genización (cuando un gen se encuentra duplicado y una de las copias pierde capacidad funcional debido a mutaciones). El tamaño actual de estas familias de genes son resultado de eventos de ganancia y pérdida aleatoria de genes (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009).

La abundancia de insectos fitófagos especializados se explica de acuerdo a la HPI en que los mecanismos más finos de selección proveen mayores ventajas de selección de un hospedero que incrementa el éxito de la progenie. Los insectos generalistas, aunque tienen una mayor capacidad de procesar información, son limitados en su capacidad de responder a variaciones en mezclas de compuestos y por lo tanto, no evalúan eficientemente la calidad de sus hospederos.

Una predicción que se alcanza a entrever es que si un grupo de insectos estrechamente relacionados y que se pueden ordenar en un gradiente de amplitud de dieta (monófago, oligófago, polífago) tendrán respuestas electrofisiológicas diferentes a la variación en proporciones de mezclas de compuestos volátiles y compuestos individuales de sus hospederos, y tendrán un gradiente en proporciones de neuronas sensibles a mezclas y sensibles a compuestos individuales. Es importante el desarrollo de la investigación que se encamine a evaluar esta predicción derivada de la HPI, en diferentes órdenes de insectos, a fin de demostrar la generalidad de esta hipótesis.

En resumen, el modelo de coevolución establecido por Ehrlich y Raven (1964) propone que los insectos escapan de la defensa química vegetal anulando o tolerando las toxinas vegetales por cambios bioquímicos o conductuales. Históricamente se ha dado mayor importancia a la evolución de las defensas químicas antiherbívoro (metabolitos tóxicos), sin embargo, las contradefensas en insectos especialistas y generalistas no son muy diferentes. La posible explicación es que los mecanismos de evasión son tan importantes como los de anulación. El efecto de los metabolitos vegetales en el comportamiento de los insectos son determinantes en la selección del hospedero y por lo tanto en la amplitud de dieta, como lo predice la hipótesis del procesamiento de la información.

### Respuesta de los insectos a la variación fitoquímica

La variación fitoquímica ejerce una presión de selección sobre los insectos por lo que la evolución debe favorecer mecanismos que permiten interpretar la información química adecuadamente para incrementar el éxito reproductivo (Dicke, 2000). Por ejemplo, el reconocimiento y evaluación del mejor hospedero se efectúa inicialmente mediante el procesamiento de la información contenida en las emisiones volátiles de compuestos orgánicos vegetales. Estas emisiones no se comportan como una mezcla homogénea y continua a través del espacio, sino que se dispersa y se diluye con otros cientos de compuestos volátiles (Dicke, 2000). Dado que los componentes de las emisiones volátiles son comunes entre la mayoría de plantas, los insectos han evolucionado mecanismos que les permiten discernir entre proporciones de mezclas de compuestos, evitando confusión con mezclas emitidas por otras plantas (Bruce *et al.*, 2005). Generalmente las mezclas tienen un efecto mayor que la suma del efecto de sus componentes individuales, existe redundancia en las señales, y algunos compuestos dentro de una mezcla pueden ser sustituidos por otros (Bruce & Pickett, 2011). Las emisiones volátiles vegetales varían dentro y entre individuos de la misma especie, por lo que esta variación en el emisor debe tener correspondencia con la capacidad de los insectos al procesar la información. Najar-Rodríguez *et al.* (2010) demuestran que la variación en los constituyentes de una mezcla bajo cierto umbral, mantiene la actividad atrayente hacia la polilla de la manzana, *Cydia (Grapholita) molesta*. En otro estudio, se muestra que las hembras grávidas de la polilla especialista, *Manduca sexta* son capaces de discriminar entre hospederos de diferente especie y calidad (defensa inducida por jasmonato de metilo) de acuerdo al perfil de emisión de compuestos volátiles (Spatě *et al.*, 2012).

Por otra parte, el sistema olfativo de los insectos puede separarse en dos subsistemas, uno que reconoce mezclas de compuestos y otro que reconoce compuestos específicos (Lei *et al.*, 2001; Christensen & Hildebrand, 2002). La variación en las proporciones de estos tipos de neuronas podría estar implicada en la amplitud de dieta. Los insectos especialistas deben tener una mayor proporción de neuronas sensibles a mezclas al contrario de los generalistas, en armonía con la hipótesis del procesamiento de la información. Por ejemplo, la polilla generalista *Agrotis segetum* presenta un 15% de neuronas sensibles a mezclas y un 45% sensibles a compuestos individuales (Lei & Hansson, 2001).

La amplitud de dieta en algunos insectos depende tanto del gusto como del olfato. Por ejemplo, en el gusano de seda (*Bombyx mori*), un especialista de la morera (*Morus* sp.), la extirpación de las sensilas permite que las larvas se puedan alimentar de una

ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

amplia variedad de plantas y de dieta artificial (Kanda, 1992). Posteriormente Lizuka, *et al.* (2012) demostraron que la preferencia en el comportamiento de alimentación está determinado por un grupo de genes recesivos en un loci llamado *p<sub>ph</sub>* (polifagia) responsable de percibir a la salicina como disuasivo de la alimentación en estas orugas. Es probable que los genes implicados en la quimiorrecepción estén involucrados en la adaptación local y el aislamiento reproductivo. Por ejemplo, Smadja *et al.* (2012) identificaron un loci de genes quimiorreceptivos que varían en dos razas del pulgón *Acyrtosiphon pisum* con diferentes hospederos. Sin embargo, para que un cambio de hospedero pueda ocurrir se requieren tanto el desarrollo de mecanismos de anulación o evasión y cambios en el sistema del gusto y el olfato, una pérdida de atracción por el anterior hospedero y mayor atracción por el nuevo hospedero. *B. mori* posee una interesante estrategia para desarmar a su hospedero. El látex de la morera contiene altas concentraciones de carbohidratos nitrogenados que actúan como inhibidores de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas y que son altamente tóxicos para otras orugas, pero inofensivos para el gusano de la seda. *B. mori* posee una enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa que le permite alimentarse de la morera ya que esta enzima no es inhibida por los compuestos presentes en el látex (Daimon *et al.*, 2008).

Un ejemplo en el que se ilustra un salto de hospedero y reducción de la dieta es el de la mosca *Drosophila sechellia*, especialista en los frutos de *Morinda citrifolia*; esta *Drosophila* está estrechamente relacionada a la generalista *D. melanogaster*. *M. citrifolia* es tóxica para las larvas de otras especies de *Drosophila*. El sistema olfativo de *D. sechellia* está especializado en la detección de los volátiles de *Morinda*, específicamente ésteres de ácido hexanoico y 2-heptanona. Lo cual coincide con un incremento de 200% en la expresión de sensilas que reconocen estos compuestos en comparación a *D. melanogaster*. Adicionalmente *D. sechellia* debió experimentar mutaciones que le permitieron perder la repulsión innata (presente en otras especies de *Drosophila*) a los ácidos hexanoico y octanoico de los frutos de *M. citrifolia* y además algún mecanismo de resistencia a su toxicidad (Clifford & Riffell, 2013).

El sistema nervioso de los insectos está capacitado para aprender, lo cual tiene consecuencias en la forma en que responden a señales químicas. La respuesta a mezclas volátiles de plantas es más plástica que la respuesta a mezclas de feromonas y siempre hay un orden de jerarquía sobre compuestos que son aprendidos mejor que otros, quizá porque los insectos están programados de forma innata a reconocer algunos compuestos (Bruce & Pickett, 2011). El aprendizaje en los insectos explica porqué la experiencia puede cambiar la fidelidad a un hospedero (Shang & Liu, 2006; Coley *et al.*, 2011). La experiencia puede hacer que las señales que inicialmente se

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

reconocían como repelentes se vuelvan atractivos y viceversa (Liu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010).

Esta plasticidad en la respuesta de los insectos ante la química de las plantas impone una presión de selección aún mayor sobre las plantas la cual puede ser equilibrada con la producción de mezclas de MS dentro de los diferentes tejidos vegetales. Las plantas en su ambiente natural están bajo el ataque de múltiples herbívoros y patógenos por lo que las mezclas de metabolitos deben constituir una ventaja si los diferentes compuestos actúan sobre diferentes enemigos (Gershenson *et al.*, 2012). La redundancia en la actividad biológica de los MS, los efectos aditivos y sinérgicos hacen que las mezclas de compuestos sean más efectivas que los compuestos individuales (Berenbaum & Zangerl, 1993; Dyer *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2010; Becerra, 2015). Otra ventaja de las mezclas de compuestos es que dificultan el desarrollo de resistencia por parte de los insectos (Feng & Isman, 1995).

Los fitoquímicos no volátiles también afectan el comportamiento de los insectos herbívoros y pueden interferir tanto en la alimentación, la oviposición, la preferencia y el desempeño. Por ejemplo, la planta *Iberis amara* contiene glucosinolatos que estimulan la oviposición de *Pteris rapae* y cucurbitacinas que inhiben la oviposición de *Pieris napi oleracea* (Huang *et al.*, 1993). Algunos alcaloides pirrolizidínicos de plantas del género *Senecio* son atractivos y estimulan la alimentación mientras que otros son estimuladores de la oviposición en insectos adaptados. Para los insectos generalistas no adaptados estos alcaloides son disuasivos de la alimentación pero algunos son menos preferidos que otros, lo cual les permite evitar los tejidos más tóxicos (ver Macel, 2011). Algunas revisiones recientes ejemplifican ampliamente las diversas formas en que los fitoquímicos afectan a los insectos herbívoros (Alotaiba y Elsayed, 2007; García-Rodríguez *et al.*, 2012; Mithöfer & Boland, 2012; O'Reilly-Wapstra *et al.*, 2012; Neilson *et al.*, 2013).

### Hipótesis de espacio libre de enemigos (ELE) o de las interacciones tritróficas

La especialización puede ser considerada como una consecuencia ya sea del efecto "Top-down" (de arriba hacia abajo o descendente) de los enemigos naturales o bien del efecto "Bottom-up" (de abajo hacia arriba o ascendente) de la química de las plantas. El efecto ascendente asume que la defensa vegetal (metabolitos anti-herbívoro) es más importante en determinar la amplitud de dieta, mientras que el efecto descendente supone que los herbívoros emplean las características vegetales (físicas y químicas)

como defensa contra sus enemigos naturales (Dyer & Floyd 1993). Entonces ¿Los insectos especialistas son más abundantes porque escapan de sus enemigos naturales? o ¿Porque la química y disponibilidad de su hospedero limita su abundancia?

La reducción en el impacto de tercer nivel trófico sobre los herbívoros se conoce como el espacio libre de enemigos, el cual se define como una forma de vivir que reduce o elimina la vulnerabilidad de una especie por una o más especies de enemigos naturales (Jeffries & Lawton, 1984). La química de las plantas es una de las posibles formas que pueden conferir un espacio libre de enemigos a los insectos herbívoros (Stamp, 2001).

Las plantas pueden influir en un control descendente atrayendo enemigos naturales de los insectos herbívoros a través de la emisión de compuestos volátiles, o un control descendente sobre los insectos herbívoros produciendo compuestos que afecten su alimentación, preferencia o desempeño. Estos compuestos también pueden afectar a las poblaciones de enemigos naturales reduciendo su adecuación (afectando la supervivencia, tamaño, fecundidad), lo que puede ocurrir de forma directa, si el enemigo natural debe lidiar contra una toxina vegetal que se encuentra en la hemolinfa o en los tejidos del herbívoro, o de forma indirecta como consecuencia de la reducción en la calidad o tamaño del herbívoro hospedero (Ode, 2006).

Si la depredación y parasitismo ejercen una presión de selección importante para restringir la amplitud de dieta de los insectos herbívoros, entonces el espacio libre de enemigos debe ser más factible para los insectos especialistas quienes deben ser menos preferidos por los depredadores. Esta última predicción es apoyada por el trabajo de Dyer & Floyd (1993) en el que comparan la preferencia de la hormiga generalista (*Paraponera clavata*) hacia orugas generalistas (8 especies) y especialistas (28 especies). Los autores reportan que las orugas especialistas son menos preferidas sobre todo si son de las últimas etapas de desarrollo (instares), posiblemente porque han acumulado una mayor concentración de compuestos que disuaden a las hormigas. Esta conclusión es reforzada al corroborar que los extractos de orugas especialistas o de sus hospederas son menos preferidos por las hormigas.

Berdegue *et al.*, (1996) proponen tres criterios (a manera de predicciones) que se deben cumplir para asegurar que el espacio libre de enemigos opere en la naturaleza: 1) La adecuación de la presa es menor en presencia de enemigos; 2) La adecuación de la presa con un hábitat alternativo (el espacio libre de enemigos) en presencia de sus enemigos es mayor que en el hábitat original con sus enemigos; y 3) La adecuación de la presa en el hábitat alternativo sin enemigos, es menor que en el hábitat original sin enemigos. De esta forma se asegura que la depredación es una fuerza importante y que el ELE tiene un costo. Berdegue *et al.*, (1996) y más tarde Stamp (2001) revisaron los trabajos realizados sobre el efecto de ELE y el cumplimiento de estos tres criterios,



## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

encontrando que solo dos estudios los cumplen cabalmente. En los siguientes años unos cuantos estudios han cubierto estos criterios (p. ej. Mulatu *et al.*, 2004, Murphy, 2004; Diamond & Kingsolver, 2010, Gasmman *et al.*, 2010). Los cuales muestran que el uso de un hospedero de menor calidad (donde el desempeño del herbívoro es reducido) funciona como un ELE tanto para generalistas como especialistas. De hecho, el ELE puede ser un factor importante favoreciendo los cambios de hospedero tanto en generalistas (Gasmman *et al.*, 2010) como en especialistas (Murphy, 2004).

Si bien el secuestro de fitoquímicos por los insectos especialistas puede funcionar como defensa contra sus enemigos naturales (y por lo tanto como un ELE), en los insectos generalistas una dieta mixta también puede lograr un ELE mejorando su sistema inmune y por lo tanto aumentando la resistencia al parasitismo (Muller *et al.*, 2015) o disuadiendo depredadores (Mason *et al.*, 2014). Entonces, ¿dónde están las supuestas ventajas de los insectos fitófagos especialistas sobre los generalistas en cuanto al ELE? Mooney *et al.* (2012) evaluaron simultáneamente el efecto de la calidad del hospedero, la amplitud de dieta y la presencia de enemigos naturales en el desempeño de dos áfidos que se alimentan de *Baccharis salicifolia*. Evaluaron de manera integral las predicciones de hipótesis ditróficas (la eficiencia fisiológica, lento crecimiento/alta mortalidad) y el espacio libre de enemigos. Utilizaron como modelo a dos áfidos, uno especialista en *B. salicifolia*, *Uroleucon macolai* y uno generalista, *Aphis gossypii*, evaluando su fecundidad (crecimiento *per capita*) bajo diferentes tratamientos: en plantas de diferente calidad con y sin enemigos naturales. Los hallazgos más sobresalientes son que la fecundidad del áfido generalista fue menor en una planta de menor calidad (con mayor concentración de terpenoides) y el efecto es más acentuado en presencia de enemigos naturales. Sin embargo, el áfido especialista tuvo una menor fecundidad en una planta de menor calidad (más defendida) y en presencia de enemigos naturales. Este último resultado parecía contradictorio, pues se esperaría que el especialista estuviera mejor protegido en su planta hospedera en comparación con el generalista. La posible explicación es que *A. gossypii* es cuidado por hormigas lo que le provee una ventaja extra respecto al áfido especialista. Este estudio pone en evidencia la importancia de considerar interacciones multitróficas al analizar las ventajas y desventajas entre los insectos generalistas y los especialistas.

Aún no se ha alcanzado consenso sobre cuál de las cascadas tróficas (ascendente o descendente) es la más importante. Si el efecto descendente es más importante, la hipótesis del espacio libre de enemigos y la explotación eficiente de recursos sería más apoyada, mientras que si el efecto ascendente es más importante, la hipótesis de coevolución fitoquímica sería favorecida. Un meta-análisis reciente sobre relación entre la variación latitudinal de las condiciones ambientales (temperatura y precipitación) con las interacciones tritróficas, encontró que las cascadas tróficas descendentes son

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

más importantes en los bosques tropicales y las zonas secas y frías, mientras que las cascadas ascendentes son más fuertes en ecosistemas secos donde la depredación y la competencia entre plantas son menores (Rodríguez-Castañeda, 2013). Los argumentos esgrimidos por Rodríguez-Castañeda señalan que en los ecosistemas con mayor producción primaria hay más depredación. Sin embargo, hay un sesgo en cuanto al tipo de insectos estudiados, pues la mitad de los trabajos que apoyan al control descendente están basados en interacciones con hormigas, de hecho los estudios que más fuertemente apoyan las cascadas descendentes en zonas frías y secas analizaron interacciones planta-hormiga, por lo que hacen falta más estudios para confirmar estas tendencias

La evidencia empírica indica que ambas fuerzas (ascendentes y descendentes) actúan en concierto, bajo ciertas condiciones geográficas, ambientales, temporales y con diferentes protagonistas; un modelo puede ser preponderante sobre otro dependiendo de las condiciones (Denno *et al.*, 2005; Gripenberg & Roslin, 2007; Mooney *et al.*, 2012; Bruggisser *et al.*, 2012). Dentro de una misma población, un fenotipo puede ser más atrayente para los enemigos naturales y otro fenotipo puede defenderse mejor contra sus herbívoros, como lo muestra el estudio de Santolamazza y colaboradores (2014). Ellos evaluaron el efecto de los glucosinolatos en la preferencia y desempeño de los herbívoros de *Brassica oleracea* y el efecto indirecto a los enemigos naturales. Midió la abundancia y daño en las hojas de 6 genotipos con diferentes concentraciones de sinigrina, glucoiberina y glucobrasicina. Las plantas fueron crecidas en invernadero y trasplantadas al campo con un arreglo aleatorio y el experimento fue repetido dos años consecutivos. Los principales herbívoros que afectaron a esta crucífera fueron lepidópteros (*Mamestra brassicae*, *Plutella xylostella*, *Pieris rapae*) y hemípteros (*Brevicoryne brassicae*, *Aleyrodes brassicae* y *Eurydema ornatum*). El daño ocasionado por los herbívoros fue menor en las plantas del genotipo con alto contenido de sinigrina (GSin). Los adultos de *E. ornatum* no mostraron preferencia por ningún genotipo pero hubo una mayor abundancia de huevos en las plantas GSin y sufrieron una menor tasa de parasitismo en los genotipos con mayor concentración de glucobrasicina donde sus masas de huevos fueron menores. Esto sugiere que las plantas GSin proveen un espacio libre de enemigos para este hemíptero. Por otra parte, las larvas de *M. brassicae* fueron más abundantes en plantas con menor concentración de glucoiberina pero fueron más parasitadas en plantas con mayor contenido de glucobrasicina aunque sus poblaciones no fueron altas en esas plantas. La glucobrasicina es un glucosinolato que tras su degradación produce compuestos derivados del indol los cuales están implicados en la atracción de parasitoides (Conti *et al.*, 2008). *P. rapae* no se vio afectado por ninguno de los genotipos y *P. xylostella* aunque se ha reportado que es atraída por la sinigrina (Spencer *et al.*, 1999) y que

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

posee una enzima desulfatasa para anular los glucosinolatos no fue más abundante en las plantas GSin.

Adicionalmente los autores reportan importantes diferencias en la fecha de muestreo, por ejemplo, los huevos de *E. ornatum* fueron parasitados en el primer año pero no el segundo. En el primer año la tasa de parasitismo no estuvo correlacionada ni con la abundancia de herbívoros ni con el genotipo de las plantas, pero en el segundo año, la tasa de parasitismo estuvo negativamente correlacionada con la tasa de daño foliar. Por lo que aparentemente la combinación de varios factores determinan los efectos observados en el campo, como el fenotipo químico de la planta, el tiempo de colecta, la identidad del herbívoro y el parasitoide.

El espacio libre de enemigos intermediado por EN especialistas (en hospedero o en hábitat) es probable que impongan selección natural divergente en los herbívoros permitiendo colonizar otros nichos, mientras que los EN generalistas (en hospedero o en hábitat) probablemente promueven la especificidad en un hospedero (Bernays & Graham, 1988; Singer & Stireman, 2005). Por ejemplo, Gratton & Welter (1999) evaluaron la importancia de los enemigos naturales en el cambio de hospedero de las larvas minadoras de *Liriomyza helianthi*, una mosca especializada en *Helianthus annuus* (Asteraceae). Los autores crearon un espacio libre de enemigos transfiriendo manualmente las larvas de *L. helianthi* a otras plantas hospederas pertenecientes a la familia asterácea. Posteriormente las plantas fueron expuestas a parasitoides en condiciones de campo. El experimento se repitió tres años consecutivos. Sus resultados están de acuerdo con los criterios expuestos por Berdegue *et al.*, (1996) en dos de los tres años, cuando los endoparasitoides (más especializados) dominaron el ensamblaje de enemigos naturales. Los endoparasitoides causaron una menor mortalidad en el nuevo hospedero en comparación con el hospedero normal. Mientras que en ausencia de enemigos, las larvas tuvieron una mayor sobrevivencia en el hospedero original (porque constituye un alimento de mayor calidad). Sin embargo, en uno de los tres años, cuando los ectoparasitoides (generalistas) fueron más abundantes, la mortalidad entre el hospedero normal y los nuevos fue similar.

Este patrón se explica porque los EN especialistas pueden reconocer cambios específicos en las emisiones de volátiles de la planta atacada debidos a un herbívoro particular para así localizar a su presa (Ngumbi *et al.* 2009). Este mecanismo no funciona si la nueva planta hospedera no responde selectivamente al herbívoro emitiendo una mezcla de volátiles que sea reconocida como “grito de ayuda”. Mientras que los EN generalistas utilizan señales “generales” para localizar a su presa (volátiles relacionados al daño mecánico) y logran encontrar a su presa aunque cambie de planta hospedera. Esto favorece en los insectos herbívoros un menor número de plantas hospederas y por lo tanto la especialización.

### Consideraciones finales

Las hipótesis revisadas tratan de ajustarse a los patrones generales observados en la naturaleza: una mayor proporción de insectos especialistas, el incremento de la diversidad de plantas e insectos hacia el Ecuador, y que las familias vegetales más diversificadas son depredadas por insectos más especializados (Forister *et al.*, 2015). La teoría coevolutiva explica este patrón a través de una carrera armamentista y diversificación coevolutiva, mientras que otras teorías abogan por la especialización como una forma de escapar de la competencia y la depredación. Estos patrones condujeron a postular, y más tarde a asumir, que la herbivoría es más intensa a bajas latitudes y por lo tanto las plantas deben estar más defendidas en el Ecuador (Coley & Aide, 1991), o bien que el control de los herbívoros por sus enemigos naturales es más fuerte en los trópicos (Hairston *et al.*, 1960), y la química vegetal tiene un papel meramente informativo y que la coevolución ha sido sobredimensionada (Bernays & Graham, 1988).

Un meta-análisis realizado por Moles *et al.*, (2011a) no encontró evidencia sobre una mayor tasa de herbivoría a bajas latitudes y tampoco que las plantas estén más defendidas a bajas latitudes. Sin embargo, sí encontró una relación con los alcaloides y la palatabilidad de las hojas. La concentración de alcaloides incrementa a menores latitudes así como la preferencia por hojas de mayores latitudes. En un estudio posterior, Moles y colaboradores (2011b) reanalizan esta tendencia evaluando la concentración de taninos, fenoles, lípidos, ceras y resinas en hojas de plantas de diferentes latitudes en toda América. El hecho de que las defensas químicas de las plantas aumenten hacia los polos mientras que la palatabilidad disminuye, puede ser indicativo de la presencia de otros tipos de defensa en las hojas de plantas de bajas latitudes como proteínas antidigestivas (las cuales no fueron consideradas en sus estudios) y por lo tanto no excluye a la diversificación coevolutiva como posible explicación. Otra posibilidad es que el incremento en la concentración absoluta de defensas químicas no sea tan importante como el incremento en la diversidad de metabolitos. Al respecto, Becerra (2015) muestra una tendencia en las plantas de menores latitudes, de ser más diversas en su contenido de metabolitos secundarios. Sin embargo, esta tendencia fue observada solo en algunas familias de plantas mientras que en otras no hay tendencia o existe una tendencia inversa, como en las plantas de la familia Apocinácea que contienen cardenólidos (Rasman & Agrawal, 2011). Así, la diversificación en algunas familias de plantas es acompañada por un incremento en la diversidad de metabolitos secundarios y está asociada con un incremento en la diversidad de herbívoros especializados que puede ser resultado

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

de la interacción entre plantas e insectos y que posiblemente se debe a coevolución (Becerra, 2015).

La hipótesis de las interacciones tritróficas también ofrece una posible explicación al incremento en la diversidad de metabolitos secundarios en algunas familia vegetales reportado por Becerra (2015), que se puede ejemplificar con los insectos que secuestran toxinas vegetales. De acuerdo a la perspectiva bitrónica los insectos almacenan las toxinas para evitar su toxicidad; entonces, como consecuencia de la carrera armamentista las plantas que producen mayor diversidad de toxinas serían depredadas por unos pocos insectos especializados porque dichas toxinas actuarían como una barrera enorme que impediría la colonización de los herbívoros no adaptados. En cambio, si los insectos almacenan las toxinas vegetales para usarla como defensa y para escapar de sus enemigos (de acuerdo a la visión tritrófica) las plantas con mayor diversidad de metabolitos pueden funcionar como un ELE para muchos insectos tanto generalistas como especialistas (Singer & Stireman, 2005). Pero no solo las defensas químicas pueden experimentar diversificación, en general las interacciones tritróficas favorecen la diversificación de la defensa vegetal. El aumento en la complejidad y funcionalidad de la defensa y estructura de la plantas favorece la coexistencia de múltiples herbívoros y sus enemigos naturales (ver Singer & Stireman, 2005).

De manera similar, la variación en cantidad, fuerza y dirección de las emisiones de compuestos volátiles inducidos por la herbivoría (ECVIH) se puede explicar por la hipótesis de las interacciones tritróficas. Suponiendo que las ECVIH solo tienen un papel informativo para los insectos, de acuerdo a la hipótesis del forrajeo óptimo (Charnov, 1976). Generalmente las ECVIH incrementan de acuerdo al nivel de herbivoría, lo cual haría a las plantas más aparentes para los herbívoros y depredadores. Por lo tanto, se esperaría que las ECVIH de plantas de mayor calidad fueran más atractivas para los herbívoros y para sus enemigos naturales. Sin embargo, se ha observado que las ECVIH tienen múltiples funciones tanto como atrayentes (Heil, 2004; Yoneya *et al.*, 2009) y repelentes (De Moraes *et al.*, 2001; Horiuchi *et al.* 2003) de herbívoros; y atrayentes (Horiuchi *et al.* 2003) y repelentes (De Boer & Dicke, 2004; Snoeren *et al.*, 2010) de parasitoides.

Esta multifuncionalidad se puede explicar a través de la hipótesis de las interacciones tritróficas por que las ECVIH tienen una función tanto informativa (para los insectos y parasitoides) como defensiva (indirectamente para las plantas), sirven a los insectos herbívoros para evaluar la calidad de hospedero y el riesgo de depredación. Esta multifuncionalidad se entiende como una combinación de estrategias evolutivas estables de los herbívoros y sus enemigos naturales. Estas aseveraciones tienen algo de sustento con los estudios teóricos realizados por Yoneya y Miki (2015). De hecho,

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

los autores realizan una revisión en la literatura en busca de sistemas naturales que cumplen con las predicciones de su modelo y encuentran que esta diversidad de estrategias ha sido reportada en sistemas vegetales contrastantes como sauces, frijol de lima y tabaco silvestre (Yoneya & Miki, 2015).

Hemos visto cómo la ocurrencia de coevolución fitoquímica por pares está limitada tanto por las interacciones tritróficas como por las limitaciones neurales de los insectos fitófagos. Además, encontramos consistentemente que la carrera armamentista entre plantas e insectos herbívoros conduce hacia la diversificación de la defensa química y probablemente de otros tipos de defensa (defensa física, inducida y tolerancia), aunque nosotros solo nos enfocamos en la defensa química constitutiva. Y debido a limitaciones propias de cada linaje vegetal, la diversificación puede enfocarse en algunas clases de metabolitos secundarios o en otros rasgos defensivos.

La defensa química constitutiva en las plantas debe ser reconsiderada como un rasgo dinámico en tiempo y espacio, en el que la variación en diversidad de MS juega un papel preponderante en las interacciones planta-insecto. Los insectos responden a esta variación con innovaciones bioquímicas de tolerancia y detoxificación, además de modificaciones en el comportamiento para evadir sustancias tóxicas, reducir el riesgo de depredación, y con la capacidad de inducir respuestas fisiológicas específicas al sustrato del que se alimentan. El modelo clásico de Ehrlich y Raven (1964) no contempla las estrategias de evasión por cambios en el comportamiento, sin embargo, la hipótesis del procesamiento de la información sugiere que estas estrategias son muy importantes para determinar el patrón de especialización. La carrera armamentista entre insectos herbívoros y plantas implica una escalada de defensas y contra-defensas, pero a diferencia del modelo clásico (gen a gen) la defensa vegetal consiste en la producción de mezclas de MS (que varían en tiempo y espacio) que afectan la alimentación, la preferencia y el desempeño de los insectos, mientras que las contradefensas en los insectos están representadas por cambios bioquímicos (tolerancia o anulación de toxicidad de aleloquímicos) y conductuales. Dicha escalada difiere entre insectos especialistas y generalistas porque los insectos no adaptados a las toxinas vegetales compensan su incapacidad de anulación con su plasticidad para modificar su comportamiento (evasión) y encender o apagar sus mecanismos de anulación. Esta plasticidad en los insectos fitófagos generalistas depende de su mayor capacidad para procesar información y su respuesta a compuestos individuales a diferencia de los fitófagos especialistas.

La amplitud de dieta de los insectos fitófagos depende de múltiples factores bióticos y abióticos. Pero los tres que hemos revisado resultan ser muy importantes: 1) la química vegetal que afecta la alimentación y la conducta de los insectos; 2) la

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

fisiología de los insectos herbívoros y su capacidad para procesar información; y 3) sus interacciones con el tercer nivel trófico. La evidencia actual no permite concluir cuál de estos factores es preponderante, sin embargo, como se ha visto, las cascadas tróficas descendentes y ascendentes contribuyen a la diversificación de la química vegetal y a la especialización de los insectos fitófagos. Ambos fenómenos actúan en concierto manteniendo la abundancia de insectos especialistas, aunque bajo ciertas condiciones particulares (bióticas, espaciales y temporales) una cascada trófica podría ser preponderante sobre la otra.

### Referencias

- AGRAWAL AA (2005). Natural selection on common milkweed (*Asclepias syriaca*) by a community of specialized insect herbivores, *Evolutionary Ecology Research* 7, 651–667.
- AGRAWAL AA, CONNER JK, AND RASMANN S (2010). Tradeoffs and negative correlations in evolutionary ecology. In: *Evolution After Darwin: the First 150 Years*, Bell MA, Eanes WF, Futuyma DJ, and Levinton JS Eds. pp.243–268. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- ALI JG, AND AGRAWAL AA (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense, *Trends in Plant Science*, 17(5), 293–302.
- ALOTAIBA S, ELSAYED G (2007). Recent knowledge about the relation between allelochemicals in plants and the insects, *World Journal of Zoology* 2(1), 01–08.
- AWMACK CS, AND LEATHER SR (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects, *Annual review of entomology* 47(1), 817–844.
- AZEVEDO TR, TERRA WR AND FERREIRA C (2003). Purification and characterization of three  $\beta$ -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33(1), 81–92.
- BARRETT LG, AND HEIL M (2012). Unifying concepts and mechanisms in the specificity of plant–enemy interactions, *Trends in Plant Science* 17(5), 282–292.
- BARTON KE, AND KORICHEVA J (2010). The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis, *The American Naturalist* 175(4), 481–493.
- BECERRA J X (2003). Synchronous coadaptation in an ancient case of herbivory, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(22), 12804–12807.
- BECERRA JX (2015). Macroevolutionary and geographical intensification of chemical defense in plants driven by insect herbivore selection pressure, *Current Opinion in Insect Science* 8, 15–21.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- BERDEGUE M, TRUMBLE JT, HARE JD, AND REDAK RA (1996). Is it enemy free space? The evidence for terrestrial insects and freshwater arthropods, *Ecological Entomology* 21(3), 203–217.
- BERENBAUM M (1983). Coumarins and caterpillars: a case for coevolution, *Evolution* 37(1), 163–179.
- BERENBAUM MR, AND ZANGERL AR (1993). Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance, *Oecologia* 95(3), 370–375.
- BERNAYS EA, AND GRAHAM M (1988). On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods, *Ecology* 69(4), 886–892.
- BERNAYS EA (1993). Aversion learning and feeding. In: *Insect learning. Ecological and Evolutionary Perspectives*, Papaj D Ed. pp.1–17, Springer. US.
- BERNAYS EA (2001). Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation, *Annual Review of Entomology* 46(1), 703–727.
- BERNAYS EA, AND CHAPMAN RF (1978). Plant chemistry and acridoid feeding behavior. In: *Coevolution of Plants and Animals*, Harborne J Ed. pp.99–141. Academic Press, New York.
- BERNAYS EA, AND CHAPMAN RF (1994). Host-plant selection by phytophagous insects, *Contemporary Topics in Entomology II*, Chapman and Hall, New York.
- BERNAYS EA, AND FUNK DJ (1999). Specialists make faster decisions than generalists: experiments with aphids, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 266(1415), 151–156.
- BERNAYS EA, AND GRAHAM M. (1988). On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods, *Ecology* 69, 886–892.
- BERNAYS EA, AND MINKENBERG OPJM (1997). Insect herbivores: different reasons for being a generalist, *Ecology* 78(4), 1157–1169.
- BERNAYS EA, AND SINGER MS (2005). Taste alteration and endoparasites, *Nature* 436, 476–476.
- BERTHEAU C, BROCKERHOFF EG, ROUX-MORABITO G, LIEUTIER F, AND JACTEL H (2010). Novel insect-tree associations resulting from accidental and intentional biological invasions: a meta-analysis of effects on insect fitness, *Ecology letters* 13(4), 506–515
- BIDART-BOUZAT MG, KLIEBENSTEIN D (2011). An ecological genomic approach challenging the paradigm of differential plant responses to specialist versus generalist insect herbivores, *Oecologia* 167(3), 677–689.
- BONAVENTURE G, VANDOORN A, AND BALDWIN IT (2011). Herbivore-associated elicitors: FAC signaling and metabolism, *Trends in Plant Science* 16(6), 294–299.



## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- BOWERS MD, AND STAMP NE (1993). Effects of plant age, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry, *Ecology* 74(6), 1778–1791.
- BRABY MF, AND TRUEMAN JWH (2006). Evolution of larval host plant associations and adaptive radiation in pierid butterflies, *Journal of Evolutionary Biology* 19(5), 1677–1690.
- BRUCE TJA, AND PICKETT JA (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix, *Phytochemistry* 72, 1605–1611.
- BRUCE TJA, WADHAMS LJ, AND WOODCOCK CM (2005). Insect host location: a volatile situation, *Trends in Plant Science* 10(6), 269–274.
- BRUGGISSER OT, SANDAU N, BLANDENIER G, FABIAN Y, KEHRLI P, AEBI A, NAISBIT RE, AND BERSIER LF (2012). Direct and indirect bottom-up and top-down forces shape the abundance of the orb-web spider *Argiope bruennichi*, *Basic and Applied Ecology* 13(8), 706–714.
- CARLSSON MA, BISCH-KNADEN S, SCHÄPERS A, MOZURAITIS R, HANSSON BS, AND JANZ N (2011). Odour maps in the brain of butterflies with divergent host-plant preferences, *PloS one* 6(8), e24025.
- CASTELLS E, MORANTE M, GOULA M, PÉREZ N, DANTART J, AND ESCOLÀ A (2014). Herbivores on native and exotic *Senecio* plants: is host switching related to plant novelty and insect diet breadth under field conditions? *Insect Conservation and Diversity* 7(5), 420–431.
- CHAPMAN RF (1998). *The Insects: Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge.
- CHAPMAN RF (2003). Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects, *Annual Review of Entomology* 48, 455–484.
- CHARNOV EL (1976). Optimal foraging, the marginal value theorem, *Theoretical Population Biology* 9(2), 129–136.
- CHIKATE YR, TAMHANE VA, JOSHI RS, GUPTA VS, AND GIRI AP (2013). Differential protease activity augments polyphagy in *Helicoverpa armigera*, *Insect Molecular Biology* 22(3), 258–272.
- CHRISTENSEN TA, AND HILDEBRAND JG (2002). Pheromonal and host-odor processing in the insect antennal lobe: how different? *Current Opinion in Neurobiology*, 12(4), 393–399.
- CLIFFORD MR, AND RIFFELL JA (2013). Mixture and odorant processing in the olfactory systems of insects: a comparative perspective, *Journal of Comparative Physiology A* 199(11), 911–928.
- COLEY PD (1983). Intraspecific variation in herbivory on two tropical tree species, *Ecology* 64(3), 426–433.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- COLEY PD AND AIDE TM (1991). Comparison of herbivory and plant defences in temperate and tropical broad-leaved forests. In: *Plant–animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*, Price TML, Fernandes GW, and BENSON WW Eds. pp.25–49. John Wiley and Sons, New York.
- CONTI E, ZANDRA C, SALERNO G, LEONBRUNI B, VOLPE D, FRATI FMC, AND BIN F (2008). Changes in the volatile profile of *Brassica oleracea* due to feeding and oviposition by *Murgantia histrionica* (heteroptera:Pentatomidae), *European Journal of Entomology* 105, 839–847
- CORNELL HV, AND HAWKINS BA (2003). Herbivore responses to plant secondary compounds: A test of phytochemical coevolution theory, *The American Naturalist* 161(4), 507–522.
- COURTOIS EA, BARALOTO C, PAINE CET, PETRONELLI P, BLANDINIÈRES PA, HÖUEL E, BESSIÈRE JM, AND CHAVE J (2012). Differences in volatile terpene composition between the bark and leaves of tropical tree species, *Phytochemistry* 82, 81–88.
- COLEY PD, BATEMAN ML, KURSAR TA (2006). The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies, *Oikos* 115, 219–228.
- COYLE DR, CLARK KE, RAFFA KF, AND JOHNSON SN (2011). Prior host feeding experience influences ovipositional but not feeding preference in a polyphagous insect herbivore, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 138(2), 137–145.
- CUNNINGHAM JP (2012). Can mechanism help explain insect host choice? *Journal of Evolutionary Biology* 25(2), 244–251.
- DAIMON T, TAGUCHI T, MENG Y, KATSUMA S, MITA K, AND SHIMADA T (2008).  $\beta$ -Fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex, *Journal of Biological Chemistry* 283(22), 15271–15279.
- DE BOER JG, AND DICKE M (2004). The role of methyl salicylate in prey searching behavior of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*, *Journal of Chemical Ecology* 30, 255–271.
- DE BRUYNE M, AND BAKER TC (2008). Odor detection in insects: volatile codes, *Journal of Chemical Ecology* 34(7), 882–897.
- DE MORAES CM, LEWIS WJ, PARE PW, ALBORN HT, AND HUMLINSON JH (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids, *Nature* 393, 570–573.
- DENNO RF, LEWIS D, AND GRATTON C (2005). Spatial variation in the relative strength of top-down and bottom-up forces: causes and consequences for phytophagous insect populations, *Annales Zoologici Fennici* 42, 295–311
- DESPRÉS L, DAVID JP, GALLET C (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals, *Trends in Ecology and Evolution* 22(6), 298–307.

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- DESROCHES P, EL SHAZLY E, MANDON N, DUC G, AND HUIGNARD J (1995). Development of *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in seeds of *Vicia faba* L. differing in their tannin, vicine and convicine contents, *Journal of Stored Products Research* 31(1), 83–89.
- DESROCHES P, MANDON N, BAEHR JC, AND HUIGNARD J (1997). Mediation of host-plant use by a glucoside in *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae), *Journal of Insect Physiology* 43(5), 439–446.
- DETHIER VG (1954). Evolution of feeding preference in phytophagous insects, *Evolution* 8, 33–54.
- DIAMOND SE, AND KINGSOLVER JG (2010). Fitness consequences of host plant choice: a field experiment, *Oikos* 119(3), 542–550.
- DICKE M (1999). Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92, 131–142.
- DICKE M (2000). Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective, *Biochemical Systematics and Ecology* 28(7), 601–617.
- DICKE M, AND BALDWIN IT (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’, *Trends in Plant Science* 15(3), 167–175.
- DOBLER S, DALLA S, WAGSCHAL V, AND AGRAWAL AA (2012). Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na, K-ATPase, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(32), 13040–13045.
- DYER LA, AND FLOYD T (1993). Determinants of predation on phytophagous insects: the importance of diet breadth, *Oecologia* 96(4), 575–582.
- DYER LA, DODSON CD, STIREMAN III JO, TOBLER MA, SMILANICH AM, FINCHER RM, AND LETOURNEAU DK (2003). Synergistic effects of three Piper amides on generalist and specialist herbivores, *Journal of Chemical Ecology* 29(11), 2499–2514.
- EBEN A, ESPINOSA DE LOS MONTEROS A (2008). Specialization is not a dead end: further evidence from Diabroticina beetles. In: *Research on Chrysomelidae*, Jolivet P, Santiago-Blay JA, and Schmitt M. Eds. pp.40–58. Ed Brill. Leiden, The Netherlands.
- EGAN SP, AND FUNK DJ (2006). Individual advantages to ecological specialization: insights on cognitive constraints from three conspecific taxa, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273(1588), 843–848.
- EHRlich PR, AND RAVEN PH (1964). Butterflies and plants: A study in coevolution, *Evolution* 18(4), 586–608.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- EICHENSEER H, MATHEWS MC, POWELL SLJ, AND FELTON GW (2010). Survey of a salivary effector in caterpillars: Glucose oxidase variation and correlation with host range, *Journal Chemical Ecology* 36(8), 885–897.
- FALK KL, AND GERSHENZON J (2007). The desert locust, *Schistocerca gregaria*, detoxifies the glucosinolates of *Schouwia purpurea* by desulfation, *Journal of Chemical Ecology* 33(8), 1542–1555.
- FEENY PP (1976). Plant apparency and chemical defense, *Recent Advances in Phytochemistry* 10, 1–40.
- FENG R, AND ISMAN MB (1995). Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid, *Myzus persicae*, *Experientia* 51(8), 831–833.
- FERREIRA C, PARRA JP, AND TERRA WR (1997). The effect of dietary plant glycosides on larval midgut  $\beta$ -glucosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27(1), 55–59.
- FLOR HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology* 9(1), 275–296.
- FOX L (1981). Defense and Dynamics in Plant-Herbivore Systems, *The American Zoologist* 21, 853–864.
- FORISTER ML, NOVOTNY V, PANORSKA AK, BAJE L, BASSET Y, BUTTERILL PT, CIZEK L, COLEYG PD, DEM F, DINIZ IR, DROZD P, FOX M, ET AL., AND DYER LA (2015). The global distribution of diet breadth in insect herbivores, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(2), 442–447.
- FRANCIS F, VANHAELEN N, AND HAUBRUGE E (2005). Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58(3), 166–174.
- FRASER SM, AND LAWTON JH (1994). Host range expansion by British moths onto introduced conifers, *Ecological Entomology* 19, 127–137.
- FUTUYMA DJ (1983). Selective factors in the evolution of host choice by phytophagous insects. In: *Herbivorous Insects: Host Seeking Behavior and Mechanisms*. Ahmad S. Ed. pp. 227–244. Academic Press, New York.
- FUTUYMA DJ, AND MORENO G (1988). The evolution of ecological specialization, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 19, 207–233.
- GARCÍA-ROBLEDO C, AND HORVITZ CC (2011). Experimental demography and the vital rates of generalist and specialist insect herbivores on native and novel host plants, *Journal of Animal Ecology* 80, 976–989.
- GARCÍA-ROBLEDO C, AND HORVITZ CC (2012). Jack of all trades masters novel host plants: positive genetic correlations in specialist and generalist insect herbivores expanding their diets to novel hosts, *Journal of Evolutionary Biology* 25, 38–53.

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- GARCÍA-RODRÍGUEZ Y, BRAVO-MONZÓN A, MARTÍNEZ-DÍAZ Y, TORRES-GURROLA G, Y ESPINOSA-GARCÍA FJ (2013). Variación Fitoquímica Defensiva en Ecosistemas Terrestres. En: *Temas selectos en ecología química de insectos*. E MALO, y J ROJAS Eds. pp.217–252. Colegio de la Frontera Sur. Chiapas, México.
- GASSMANN AJ, STOCK SP, TABASHNIK BE, AND SINGER MS (2010). Tritrophic effects of host plants on an herbivore-pathogen interaction, *Annals of the Entomological Society of America* 103(3), 371–378.
- GERSHENZON J, FONTANA A, BUROW M, WITTSTOCK U, AND DEGENHARDT J (2012). Mixtures of plant secondary metabolites: metabolic origins and ecological benefits. In: *The ecology of plant secondary metabolites: from genes to global processes*, Iason GR, Dicke M, and Hartley S, Eds. pp.56–77. Cambridge University Press, Cambridge.
- GOVIND G, MITTAPALLI O, GRIEBEL T, ALLMANN S, Böcker S, AND BALDWIN IT (2010). Unbiased transcriptional comparisons of generalist and specialist herbivores feeding on progressively defenseless *Nicotiana attenuata* plants, *PLoS One* 5(1), e8735.
- GRATTON C, AND WELTER SC (1999). Does “enemy-free space” exist? Experimental host shifts of an herbivorous fly, *Ecology* 80(3), 773–785.
- GRIPENBERG S, AND ROSLIN T (2007). Up or down in space? Uniting the bottom-up versus top-down paradigm and spatial ecology, *Oikos* 116(2), 181–188.
- GRIPENBERG S, MAYHEW PJ, PARNELL M, AND ROSLIN T (2010). A meta-analysis of preference–performance relationships in phytophagous insects, *Ecology Letters* 13(3), 383–393.
- GUILLET G, PODESZFINSKI C, REGNAULT-ROGER C, ARNASON JT, AND PHILOGÈNE BJR (2000). Behavioral and biochemical adaptations of generalist and specialist herbivorous insects feeding on *Hypericum perforatum* (Guttiferae), *Environmental Entomology* 29(2), 135–139.
- GULDEMOND JA, TIGGES WT, DE VRIJER WF (1994). Host races of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) on cucumber and chrysanthemum, *Environmental Entomology* 23(5), 1235–1240.
- HAIRSTON NG, SMITH FE, AND SLOBODKIN LB (1960). Community structure, population control and competition, *The American Naturalist* 94, 421–425.
- HARE JD (2011). Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects, *Annual Review of Entomology* 56, 161–180.
- HARTMANN T (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism, *Phytochemistry* 68(22), 2831–2846.
- HEIL M (2004). Direct defense or ecological costs: responses of herbivorous beetles to volatiles released by wild Lima bean (*Phaseolus lunatus*), *Journal of Chemical Ecology* 30, 1289–1295.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- HEMMING JD, AND LINDROTH RL (2000). Effects of phenolic glycosides and protein on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxification activities, *Environmental Entomology* 29(6), 1108–1115.
- HERDE M AND HOWE GA (2014). Host plant-specific remodeling of midgut physiology in the generalist insect herbivore *Trichoplusia ni*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 50, 58–67.
- HORIUCHI J, ARIMURA G, OZAWA R, SHIMODA T, TAKABAYASHI J, AND NISHIOKA T (2003). A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from Lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), *Applied Entomology and Zoology* 38, 109–116.
- HUANG X, RENWICK JAA, AND SACHDEV-GUPTA K (1993). Oviposition stimulants and deterrents regulating differential acceptance of *Pieris rapae* and *P. napi oleracea*, *Journal of Chemical Ecology* 19(8), 1645–1663.
- IASON GR, O'REILLY-WAPSTRA JM, BREWER MJ, SUMMERS RW, AND MOORE BD (2011). Do multiple herbivores maintain chemical diversity of Scots pine monoterpenes? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366(1569), 1337–1345.
- IWAO K, AND RAUSHER MD (1997). Evolution of plant resistance to multiple herbivores: quantifying diffuse coevolution, *The American Naturalist* 149(2), 316–335.
- JAENIKE J (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects, *Theoretical Population Biology* 14, 350–356.
- JAENIKE J (1990). Host specialization in phytophagous insects, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 21, 243–273.
- JANZ N (2003). The cost of polyphagy: oviposition decision time vs error rate in a butterfly, *Oikos* 100(3), 493–496.
- JANZ N, AND NYLIN S (1997). The role of female search behaviour in determining host plant range in plant feeding insects: a test of the information processing hypothesis, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 264(1382), 701–707.
- JANZEN DH (1968). Host plants as islands in evolutionary and contemporary time, *The American Naturalist* 102, 592–595.
- JANZEN DH (1980). When is it coevolution? *Evolution* 34(3), 611–612.
- JEFFRIES MJ, AND LAWTON JH (1984). Enemy free space and the structure of ecological communities, *Biological Journal of the Linnean Society* 23(4), 269–286.
- JERMY T (1976). Insect—Host-plant Relationship—Co-evolution or Sequential Evolution? *Symposium on Biology, Hungary* 16, 109–113.

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- JERMY T (1993). Evolution of insect-plant relationships-a devil's advocate approach, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 66(1) 3–12.
- JOHNSON KS (1999). Comparative detoxification of plant (*Magnolis virginiana*) allelochemicals by generalist and specialist saturniid silkmoths, *Journal of Chemical Ecology* 25(2), 253–269.
- JOSHI A AND THOMPSON JN (1995). Trade-offs and the evolution of host specialization, *Evolutionary Ecology* 9, 82–92.
- KANDA T (1992). Genetical study of feeding habits of the silkworm, *Bombyx mori*, to new-low cost diet designed by linear programming method and application to the breeding, *Bulletin of the National Institute of Sericultural and Entomological Science* 5, 1–89.
- KELLEY ST, AND FARRELL BD (1998). Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* bark beetles (Scolytidae), *Evolution* 52(6), 1731–1743.
- KAHL J, SIEMENS DH, AERTS RJ, GABLER R, KUHNEMANN F, PRESTON CA, AND BALDWIN IT (2000). Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore, *Planta* 210, 336–342.
- KLEINE S, AND MÜLLER C (2011). Intraspecific plant chemical diversity and its relation to herbivory, *Oecologia* 166, 175–186.
- LANKAU RA (2007). Specialist and generalist herbivores exert opposing selection on a chemical defense, *New Phytologist* 175, 176–184.
- LEI H, ANTON S, AND HANSSON BS (2001). Olfactory protocerebral pathways processing sex pheromone and plant odor information in the male moth *Agrotis segetum*, *Journal of Comparative Neurology* 432(3), 356–370.
- LEVINS R, AND MACARTHUR R (1969). An hypothesis to explain the incidence of monophagy, *Ecology* 50(5), 910–911.
- LI X, BAUDRY J, BERENBAUM MR, AND SCHULER MA (2004). Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9), 2939–2944.
- LINHART YB, KEEFOVER-RING Y, MOONEY KA, BRELAND B, AND THOMPSON JD (2005). A Chemical Polymorphism in a Multitrophic Setting: Thyme Monoterpene Composition and Food Web Structure, *The American Naturalist* 166(4), 517–529.
- LIU SS, LI YH, LIU YQ, AND ZALUCKI MP (2005). Experience-induced preference for oviposition repellents derived from a non-host plant by a specialist herbivore, *Ecology Letters* 8(7), 722–729.
- LIU Z, CARPENTER SB, BOURGEOIS WJ, YU Y, CONSTANTIN RJ, FALCON MJ, AND ADAMS JC (1998). Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*, *Tree Physiology* 18(4), 265–270.
- LIU Z, SCHEIRS J, AND HECKEL, DG (2012). Trade-offs of host use between generalist and specialist *Helicoverpa* sibling species: adult oviposition and larval performance, *Oecologia* 168, 459–469.
- LIZUKA T, TAMURA T, SEZUTSU H, MASE K, OKADA E, AND ASAOKA K (2012). Genetic analysis of the electrophysiological response to salicin, a bitter substance, in a polyphagous strain of the silkworm *Bombyx mori*, *PLoS ONE* 7(5), e37549.
- LOXDALE HD, LUSHAI G, HARVEY JA (2011). The evolutionary improbability of 'generalism' in nature, with special reference to insects, *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 1–18.
- MACEL M (2011). Attract and deter: a dual role for pyrrolizidine alkaloids in plant–insect interactions, *Phytochemistry Reviews* 10(1), 75–82.
- MAINGUET AM, LOUVEAUX A, SAYED G, AND ROLLIN P (2000). Ability of a generalist insect, *Schistocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: tolerance or adaptation? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94(3), 309–317.
- MASON PA, BERNARDO MA, AND SINGER MS (2014). A mixed diet of toxic plants enables increased feeding and anti-predator defense by an insect herbivore, *Oecologia* 176(2), 477–486.
- MAURICIO R, AND RAUSHER MD (1997). Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defence, *Evolution* 51, 1435–1444.
- MAYHEW PJ (2001). Herbivore host choice and optimal bad motherhood, *Trends in Ecology and Evolution* 16(4), 165–167.
- MCCORMICK AC, UNSICKER SB, AND GERSHENZON J (2012). The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies, *Trends in plant science* 17(5), 303–310.
- MENKEN SBJ (1996). Pattern and Process in the evolution of insect-plant associations: Yponomeuta as an example, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80, 297–305.
- MENKEN SBJ, HERREBOUT WM, AND WIEBES JT (1992). Small ermine moths (Yponomeuta): Their host relations and evolution, *Annual Review of Entomology* 37, 41–88.
- MEWIS I, KHAN MAM, GLAWISCHNIG E, SCHREINER M, AND ULRICHS C (2012). Water Stress and Aphid Feeding Differentially Influence Metabolite Composition in *Arabidopsis thaliana* (L.), *PLoS ONE* 7(11), e48661.
- MITHÖFER A, AND BOLAND W (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects, *Annual Review of Plant Biology* 63, 431–450.



## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- MITTER C, FARRELL B, AND WIEGMANN B (1988). The phylogenetic study of adaptive zones: has phytophagy promoted insect diversification? *The American Naturalist* 132(1), 107–128.
- MOLES AT, BONSER SP, POORE AG, WALLIS IR, AND FOLEY WJ (2011a). Assessing the evidence for latitudinal gradients in plant defence and herbivory, *Functional Ecology* 25(2), 380–388.
- MOLES AT, WALLIS IR, FOLEY WJ, WARTON DI, STEGEN JC, BISIGATO AJ, CELLA-PIZARRO L, CLARK CJ, COHEN PS, CORNWELL WK, EDWARDS W, EJRNE S, GONZÁLEZ-OJEDA T, GRAAE BJ, HAY G, LUMBWE FC, MAGAÑA-RODRÍGUEZ B, MOORE BD, PERI PL, POULSEN JR, VELDTMAN R, ZEIPPEL H, ANDREW NR, BOULTER SL, BORER ET, FERNANDÉZ-CAMPÓN F, COLL M, FARJI-BRENER AJ, DE GABRIEL J, KYHN LA, LOW B, MULDER CPH, *ET AL*, AND PRIOR LD (2011b). Putting plant resistance traits on the map: a test of the idea that plants are better defended at lower latitudes, *New Phytologist* 191(3), 777–788.
- MOONEY KA, PRATT RT, AND SINGER MS (2012). The tri-trophic interactions hypothesis: interactive effects of host plant quality, diet breadth and natural enemies on herbivores, *PLoS one* 7(4), e34403.
- MOORE BD, ANDREW RL, KÜILHEIM C, AND FOLEY WJ (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context, *New Phytologist* 201(3), 733–750.
- MORAN N, HAMILTON WD (1980). Low nutritive quality as defense against herbivores, *Journal of Theoretical Biology* 86, 247–254.
- MULATU B, APPLEBAUM SW, AND COLL M (2004). A recently acquired host plant provides an oligophagous insect herbivore with enemy free space, *Oikos* 107(2), 231–238.
- MULLER K, VOGELWEITH F, THIÉRY D, MORET Y, AND MOREAU J (2014). Immune benefits from alternative host plants could maintain polyphagy in a phytophagous insect, *Oecologia* 177(2), 467–475
- MURPHY S M (2004). Enemy-free space maintains swallowtail butterfly host shift, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(52), 18048–18052.
- MURPHY SN AND FEENY P (2006). Chemical facilitation of a naturally occurring host shift by *Papilio machaon* butterflies (papilionidae), *Ecological Monographs* 76, 399–414.
- NAJAR-RODRIGUEZ AJ, GALIZIA CG, STIERLE J, AND DORN S (2010). Behavioral and neurophysiological responses of an insect to changing ratios of constituents in host plant-derived volatile mixtures, *The Journal of Experimental Biology* 213, 3388–3397.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- NEILSON EH, GOODGER JQ, WOODROW IE, AND Møller BL (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends in plant science* 18(5), 250–258.
- NGUMBI E, CHEN L, AND FADAMIRO HY (2009). Comparative GC-EAD Responses of A Specialist (*Microplitis croceipes*) and A Generalist (*Cotesia marginiventris*) Parasitoid to Cotton Volatiles Induced by Two Caterpillar Species, *Journal of Chemical Ecology* 35, 1009–1020.
- NIC-FUNET-FI (2015). Nymphalis. In: <http://www.nic.funet.fi/pub/sci/bio/life/insecta/lepidoptera/ditrysia/papilionoidea/nymphalidae/nymphalinae/nymphalis/index.html>. Revisado en Marzo de 2015.
- NOSIL P (2002). Transition rates between specialization and generalization in phytophagous insects, *Evolution* 56, 1701–1706.
- NOSIL P, AND MOOERS AQ (2005). Testing hypotheses about ecological specialization using phylogenetic trees, *Evolution* 59(10), 2256–2263.
- NOVOTNY V, MILLER S, CIZEK L, LEPS I, JANDA M, BASSET Y, WEIBLEN GD, AND DAROW K (2003). Colonising aliens: caterpillars (Lepidoptera) feeding on *Piper aduncum* and *P. umbellatum* in rainforests of Papua New Guinea, *Ecological Entomology* 28, 704–716.
- NYMAN T (2010). To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plant-feeding insects, *Biological Reviews* 85(2), 393–411.
- ODE PJ (2006). Plant chemistry and natural enemy fitness: effects on herbivore and natural enemy interactions, *Annual Reviews of Entomology* 51, 163–185.
- O'REILLY-WAPSTRA JM, POTTS BM, AND MCARTHUR C (2012). Natural selection for anti-herbivore plant secondary metabolites: a Eucalyptus system. In: *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: From Genes to Global Processes*, Iason GR, Dicke M, Hartley SE, eds. 1st ed. Cambridge University Press Cambridge.
- PANKOKE H, BOWERS MD, AND DOBLER S (2010). Influence of iridoid glycoside containing host plants on midgut  $\beta$ -glucosidase activity in a polyphagous caterpillar, *Spilosoma virginica* Fabricius (Arctiidae), *Journal of insect physiology* 56(12), 1907–1912.
- PANKOKE H, BOWERS MD, AND DOBLER S (2012). The interplay between toxin-releasing  $\beta$ -glucosidase and plant iridoid glycosides impairs larval development in a generalist caterpillar, *Grammia incorrupta* (Arctiidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42(6), 426–434.
- PENTZOLD S, ZAGROBELNY M, ROOK F, AND BAK S (2013). How insects overcome two-component plant chemical defence: plant  $\beta$ -glucosidases as the main target for herbivore adaptation, *Biological Reviews* 89(3), 531–551.

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- PICHERSKY E, AND GANG DR (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective, *Trends in Plant Science* 5(10), 439–445.
- RASMANN S, AND AGRAWAL AA (2011). Evolution of specialization: a phylogenetic study of host range in the red milkweed beetle (*Tetraopes tetraophthalmus*), *The American Naturalist* 177(6), 728–737.
- RATZKA A, VOGEL H, KLIEBENSTEIN DJ, MITCHELL-OLDS T, AND KROYMANN J (2002). Disarming the mustard oil bomb, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(17), 11223–11228.
- RHOADES DF, AND CATES RG (1976). Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry, *Recent Advances in Phytochemistry* 10, 168–213.
- RICHARDS LA, DYER LA, SMILANICH AM, AND DODSON CD (2010). Synergistic effects of amides from two Piper species on generalist and specialist herbivores, *Journal of Chemical Ecology* 36(10), 1105–1113.
- RODRÍGUEZ-CASTAÑEDA G (2013). The world and its shades of green: a meta analysis on trophic cascades across temperature and precipitation gradients, *Global Ecology and Biogeography* 22(1), 118–130.
- SANCHEZ-GRACIA A, VIEIRA FG, AND ROZAS J (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects, *Heredity* 103(3), 208–216.
- SANTOLAMAZZA-CARBONE S, VELASCO P, SOENGAS P, AND CARTEA ME (2014). Bottom-up and top-down herbivore regulation mediated by glucosinolates in *Brassica oleracea* var. acephala, *Oecologia* 174(3), 893–907.
- SCHUMAN MC, BARTHEL K, AND BALDWIN IT (2012). Herbivory-induced volatiles function as defenses increasing fitness of the native plant *Nicotiana attenuata* in nature, *ELife* 1, e00007.
- SIMMS EI, AND RAUSHER, MD (1989). The evolution of resistance to herbivory in *Ipomoea purpurea*. II. Natural selection by insects and cost of resistance, *Evolution* 43, 573–585.
- SINGER MS, AND STIREMAN JO (2005). The tri-trophic niche concept and adaptive radiation of phytophagous insects, *Ecology Letters* 8(12), 1247–1255.
- SINGER MS, MACE KC, AND BERNAYS EA (2009). Self-medication as adaptive plasticity: increased ingestion of plant toxins by parasitized caterpillars, *PLoS ONE* 4(3), e4796.
- SMADJA CM, CANBÄCK B, VITALIS R, GAUTIER M, FERRARI J, ZHOU JJ, AND BUTLIN RK (2012). Large-scale candidate gene scan reveals the role of chemoreceptor genes in host plant specialization and speciation in the pea aphid, *Evolution* 66(9), 2723–2738.

## ECOLOGÍA QUÍMICA Y ALELOPATÍA: AVANCES Y PERSPECTIVAS

- SNOEREN TAL, MUMM R, POELMAN EH, YANG Y, PICHERSKY E, AND DICKE M (2010). The herbivore-induced plant volatiles methyl salicylate negatively affects attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum*, *Journal of Chemical Ecology* 36, 479–489.
- SORENSEN JS, AND DEARING MD (2006). Efflux transporters as a novel herbivore countermechanism to plant chemical defenses, *Journal of chemical ecology* 32(6), 1181–1196.
- SPÄTHE A, REINECKE A, OLSSON SB, KESAVAN S, KNADEN M, AND HANSSON BS (2012). Plant species-and status-specific odorant blends guide oviposition choice in the moth *Manduca sexta*, *Chemical senses* 38, 147–159
- SPENCER JL, PILLAI S, AND BERNAYS EA (1999). Synergism in the oviposition behavior of *Plutella xylostella*: sinigrin and wax compounds, *Journal of Insect Behavior* 12(4), 483–500.
- STAMP N (2001). Enemy-free space Via host plant chemistry and dispersion: assessing the influence of tri-trophic interactions, *Oecologia* 128(2), 153–163.
- TERMONIA A, HSIAO TH, PASTEELS JM, AND MILINKOVITCH MC (2001). Feeding specialization and host-derived chemical defense in *Chrysomeline* leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(7), 3909–3914.
- THEIS N, AND LERDAU M (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites, *International Journal of Plant Sciences* 164(S3), S93–S102.
- THOMPSON JN (1988). Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 47, 3–14.
- THOMPSON JN (1994). *The Coevolutionary Process*, University of Chicago Press.
- THOMPSON JN (1998). The population biology of coevolution, *Researches on Population Ecology* 40(1), 159–166.
- TIAN D, PEIFFER M, SHOEMAKER E, TOOKER J, HAUBRUGE E, FRANCIS F, LUTHE DS, FELTON GW (2012). Salivary Glucose Oxidase from Caterpillars Mediates the Induction of Rapid and Delayed-Induced Defenses in the Tomato Plant, *PLoS ONE* 7, e36168.
- TOSH CR, KRAUSE J, RUXTON GD (2009). Theoretical predictions strongly support decision accuracy as a major driver of ecological specialization, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(14), 5698–5702.
- TOSH CR, POWELL G, HARDIE J (2003). Decision making by generalist and specialist aphids with the same genotype, *Journal of Insect Physiology* 49(7), 659–669.
- VAN DER MEIJDEN E (1996). Plant defence, an evolutionary dilemma: contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80(1), 307–310.

## CAPÍTULO 8. EFECTOS DE LA VARIACIÓN FITOQUÍMICA SOBRE LA AMPLITUD DE DIETA DE LOS INSECTOS

- VOELCKEL C, AND BALDWIN IT (2004). Generalist and specialist lepidopteran larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles, *Ecology Letters* 7, 770–775.
- WHEAT CW, VOGEL H, WITTSTOCK U, BRABY MF, UNDERWOOD D, AND MITCHELL-OLDS T (2007). The genetic basis of a plant–insect coevolutionary key innovation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(51), 20427–20431.
- WU W, LIANG XL, ZHAO HY, XU TT, AND LIU XD (2013). Special plant species determines diet breadth of phytophagous insects: a study on host plant expansion of the host-specialized *Aphis gossypii* glover, *PLoS ONE* 8(4), e60832.
- YONEYA K, KUGIMIYA S, AND TAKABAYASHI J (2009). Can herbivore-induced plant volatiles inform predatory insect about the most suitable stage of its prey? *Physiological Entomology* 34, 379–386.
- YONEYA K, AND MIKI T (2015). Co-evolution of foraging behaviour in herbivores and their natural enemies predicts multifunctionality of herbivore-induced plant volatiles, *Functional Ecology* 29(4), 451–461.
- YOSHINAGA N, ALBORN HT, NAKANISHI T, SUCKLING DM, NISHIDA R, TUMLINSON JH, AND MORI N (2010). Fatty Acid-amino Acid Conjugates Diversification in Lepidopteran Caterpillars, *Journal of Chemical Ecology* 36, 319–325.
- ZHANG PJ AND LIU SS (2006). Experience induces a phytophagous insect to lay eggs on a nonhost plant, *Journal of Chemical Ecology* 32(4), 745–753.
- ZHEN Y, AARDEMA ML, MEDINA EM, SCHUMER M, AND ANDOLFATTO P (2012). Parallel molecular evolution in an herbivore community, *Science* 337(6102), 1634–1637.
- ZHOU D, VAN LOON JJ, AND WANG CZ (2010). Experience-based behavioral and chemosensory changes in the generalist insect herbivore *Helicoverpa armigera* exposed to two deterrent plant chemicals, *Journal of Comparative Physiology A*, 196(11), 791–799.
- ZÜST T, HEICHINGER C, GROSSNIKLAUS U, HARRINGTON R, KLIEBENSTEIN DJ, AND TURNBULL LA (2012). Natural enemies drive geographic variation in plant defenses, *Science* 338(6103), 116–119.

## Capítulo 2

### Los perfiles metabólicos de *Persea americana* cv Hass revelan cambios estacionales asociados al barrenador de las ramas, *Copturus aguacatae*

Este capítulo fue publicado como:

**Meléndez-González, C.;** Espinosa-García, F.J. (2018) Metabolic profiling of *Persea americana* cv. Hass branch volatiles reveal seasonal chemical changes associated to the avocado branch borer, *Copturus aguacatae*. *Scientia Horticulturae*, 240:116-124.



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scihorti](http://www.elsevier.com/locate/scihorti)



## Metabolic profiling of *Persea americana* cv. Hass branch volatiles reveals seasonal chemical changes associated to the avocado branch borer, *Copturus aguacatae*

Claudio Meléndez-González<sup>a,b</sup>, Francisco Javier Espinosa-García<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, CP 58190, Morelia, Michoacán, México

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, México



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Metabolomics  
Avocado tree  
Induced response  
Terpenoids

### ABSTRACT

Plants produce a plethora of variable metabolites that could be involved in constitutive and induced defense against herbivorous insects. Recently, metabolomics have showed to be a complementary approach in chemical ecology to screen dozens of plant metabolites, and identify those related with plant resistance or susceptibility to herbivorous insects. We compared GC–MS metabolic profiles of cambial tissue from *Persea americana* cv. Hass trees infested and non-infested by the avocado branch borer (ABB), *Copturus aguacatae*, and between undamaged and ABB damaged branches from the same tree. Using several multivariate techniques we discriminated between several overlaid dimensions of branches phytochemical variation (intraclonal, seasonal and induced response). Specifically, we found a set of sixteen highly correlated terpenoids, showing increasing proportions in borer trees as response to ABB larvae. In addition, low proportions of isobutyl lactone A and  $\alpha$ -humulene were found in non-bored trees. The implications of dimensions of avocado phytochemical variation, and diversity as defensive traits in the interaction with *Copturus aguacatae* are discussed.

### 1. Introduction

Plants produce complex mixtures of plant secondary metabolites (PSM), which exhibit a striking variation. This variation is manifested at different scales in space and time, within and among individuals and populations (García-Rodríguez et al., 2012; Moore et al., 2014). Several PSM in those mixtures could be involved in plant-insect interactions as constitutive or induced defenses (Mithöfer and Boland, 2012). Furthermore, phytochemical variation can differentially determine host plant acceptance for herbivores (Schultz, 1983; Zangerl and Berenbaum, 1993). In fact, phytochemical spatiotemporal variation and diversity might be considered defensive traits for themselves (Iason et al., 2011; Nyman, 2010).

Determining the ecological role of mixtures or specific phytochemicals in plant defense is challenging due to their diversity and variation (Iason et al., 2011). Metabolomics is an unbiased technique in which metabolic profiling comparisons allow to preselect candidate compounds involved in an ecological interaction (Prince and Pohnert,

2010), therefore, reducing the number of bioassays to be done in comparison with the traditional bioassay-guided fractionation. With this metabolomic approach many plant constitutive or induced compounds related with herbivore resistance or susceptibility have been identified (Eloh et al., 2016; Jansen et al., 2009; Marti et al., 2013). However, little is known about defenses of angiosperm trees to wood-boring insects, and metabolic profiling studies about these interactions are scarce (Villari et al., 2016). The aspects of chemical ecology of wood-borers are relevant because some of them are invasive pests which cause high economic losses in comparison with sap or foliage feeders (Aukema et al., 2011).

The interaction between *Persea americana* cv. Hass with the branch borer *Copturus aguacatae* is a pertinent model to study phytochemical variation and its role in plant defense. Hass avocado is a hybrid between *P. americana* var. *drymifolia* and *P. americana* var. *guatemalensis*, which is propagated mainly by cloning (Rincón-Hernández and Espinosa-García, 2008). Thus, low phytochemical variation among clones would be expected. However, remarkable variation in foliar terpenoids have

Abbreviations: GC–MS, gas chromatography-mass spectrometry; PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; ABB, avocado branch borer; B, bored; NB, non-bored; NwD, new damage; Old, old damage; UnD, undamaged; AUROC, area under the receiver operating characteristic; VIP, variable importance in the projection

\* Corresponding author.

E-mail address: [espinosa@iies.unam.mx](mailto:espinosa@iies.unam.mx) (F.J. Espinosa-García).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.003>

Received 21 December 2017; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 3 June 2018  
0304-4238/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

been reported in orchards from the “Avocado Belt” in Michoacán, México, where 3 to 13 chemotypes can be found in a single orchard; some of those chemotypes were associated differentially with several avocado pests (Espinosa-García et al., 2001; García-Rodríguez et al., 2016). Many phytochemicals from *Persea americana* have shown anti-herbivore activity such as terpenoids, phenylpropanoids, acetogenins and avocadofurans (Torres-Gurrola et al., 2016).

The avocado branch borer (ABB), *Copturus aguacatae* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae), is a Mexican endemic specialist insect on avocado trees, particularly in all varieties of *Persea americana*. It is one of the five worst quarantine pests of Hass avocado in México because it causes fruiting branches breakage and its presence prevents fruit exportation (SENASICA, 2010). Adult insects feed on shoots and leaves while larvae bore galleries in branches. In areas above 1800 masl, there is only one generation per year (Coria et al., 2007) where adults are present during the rainy season (from beginning of June to end of September) and larvae are present during the dry season (October to May). The aspects related to chemical ecology and host choice of the ABB had not been studied, and there are no identified pheromones for this weevil. Research in this field is important to develop management strategies of this potentially invasive pest (Luna et al., 2017). In orchards from the “Avocado Belt” in Michoacán, México, we have observed differential infestation of ABB, that is, while some trees are severely infested, other neighboring trees remain non-infested. Indeed, avocado rare chemotypes showed higher ABB incidence than common chemotypes (Espinosa-García et al., 2001). These observations suggest a relationship between avocado chemistry and some kind of resistance (antibiosis or antixenosis) to ABB. Thus, we hypothesized that variation within the Hass cultivar in leaf and branch secondary compound profiles explain differential infestation by *C. aguacatae*. We sampled 130 trees of ABB infested trees and their neighboring non-infested trees in seven orchards, and we analyzed leaf and branch volatile lipophilic compounds by GC–MS to determine whether infested and non-infested individuals were chemically different.

In order to distinguish between constitutive and induced compounds, in a second field study, we compared chemical profiles of borer infested and non-infested branches from the same tree. Additionally, we contrasted the chemical profiles from infested branches containing ABB larvae and branches with empty galleries as a proxy to induced response or mechanical damage, respectively. We compared the metabolic profiles by multivariate analysis to determine which compounds (constitutive or induced), alone or in mixtures, were related to ABB presence or absence. Non-infested trees were visited two years later to determine if they remained uninfested.

## 2. Materials and methods

### 2.1. First field study and sampling

In a first study, seven orchards of Hass avocado in Villa-Madero and Tingambato municipalities were visited within the Michoacán “Avocado Belt” in México (Table 1). These municipalities are under an official campaign to eradicate avocado branch borer; phytosanitary brigades actively saw-prune ABB infested branches within affected orchards, but sometimes neighboring orchards that may be infested are not treated unless the owners authorize the treatment. Twenty trees per orchard were sampled (except in two orchards in which non-infested trees were scarce), ten infested with *C. aguacatae* larvae and ten neighboring trees with no evidence of infestation. Borer-infested branches exude periseitol that dries into a powdery white dust outside of the bore left by the larvae (SENASICA, 2010). Also, saw-pruned trees were recognized as susceptible to the branch borer. Two or three branches of 1–3 cm width and 40 cm long were cut, stored in plastic bags, and maintained at 5 °C until analysis. Samples were taken from tertiary branches (1–3 cm) in the middle tree canopy (2–4 m) where the major weevil infestation occurs (Coria et al., 2007). Additionally,

**Table 1**  
Sampled Hass avocado orchards.

No	Orchard name	Municipality	Coordinates	Altitude (masl)	Sampling month
1	Derrumbadero	Villa Madero	N 19°23'38.3"; W 101°18'00.1"	2284	June
2	Terencio	Villa Madero	N 19°21'59.9"; W 101°16'02.2"	2252	June
3	El chirimo	Villa Madero	N 19°22'26.9"; W 101°15'53.1"	2055	September
4	Ojo de agua	Tingambato	N 19°29'44.8"; W 101°52'18.1"	1898	December
5	La fábrica	Tingambato	N 19°30'19.9"; W 101°50'55.0"	2012	December
6	El serrato	Tingambato	N 19°30'13.9"; W 101°50'44.5"	2023	March
7	El tanque	Tingambato	N 19°29'22.6"; W 101°50'27.4"	2022	March

mature leaves from sampled branches were taken and stored in plastic bags for tree chemotype determination. The samples were taken regardless branch orientation as the incidence of infested branches was the same towards any cardinal point (Coria et al., 2007). Sampled trees were labeled and two years later they were visited again to determine if some trees are immune (remain non-infested), have some kind of resistance (slow ABB colonization or suppressed infestation) or susceptible (finally infested and severely infested). Another set of infested branches was collected and maintained in plastic bags until adult insect emergence. Adults were identified as *Copturus aguacatae* Kissinger (Muñiz and Barrera, 1958). Two orchards (2 and 4) were resampled (ten trees for each one), one for each municipality to get a complete view of phytochemical variation.

### 2.2. Second field study

In order to determine if compounds showing differences between bored and non-bored trees in the first field study were constitutive or induced, a second field study was conducted. Three types of branches were sampled from ABB infested trees: undamaged branches (UdB), with recent ABB damage (containing active larvae and showing the characteristic white exudate, NwD) and with ABB old damage (only empty galleries, Old). Tree branches of each type from six trees from orchard 1 were sampled, and lipophilic volatile profiles were obtained in the same way that in the first field study.

### 2.3. Sample processing

The cambium tissue was removed from each branch, avoiding necrotic tissue, with a knife and separated in two parts; leaves were cut on the middle vein. One half of each tissue (leaf or branch) was dried at 80 °C to obtain dry weight. The other half was cut in small fragments with scissors and put in a 75 mL amber flask with 40 mL of analytical grade hexanes and 1.0 mg of n-tetradecane as an internal standard. Samples were stored at 4 °C for a week. Then, cambium (~5 g FW) or leaf (~2 g FW) tissue of each tree was ground with neutral sand and hexanes. Grinding with periodical hexanes removal and fresh hexanes addition was repeated until the hexanes extract was clear. The collected extract was filtered, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under a N<sub>2</sub> current until 1.0 mL. For each tree a leaf and a branch extract were obtained from composite samples of three leaves or three branches.

### 2.4. GC–MS analysis

Each extract was homogenized in a vortex for 15 s and then 1 µL was injected into an Agilent HP6890 gas chromatograph equipped with a



HP-5 capillary column (length: 30 m, inner diameter: 0.25 mm; 5% phenyl siloxane-95% polymethyl siloxane) coupled with a selective mass detector (Agilent 5973 N). The heating program and MS conditions were the same as those published previously (García-Rodríguez et al., 2016). Chemical identity was assigned according to the NIST 2011 library matching and Kovat's retention index calculation and pure compounds injection when standards were available. When reference mass spectra or standards were unavailable, tentative identity was assigned according mass spectra fragmentation pattern analysis from hexane extracts without or with trimethylsilyl (TMS) derivatization.

#### 2.4.1. Sample TMS derivatization

Samples where compounds of interest were majoritarian, were pooled (3–5), concentrated to dryness, and then 5 mg were separated and resuspended in 50  $\mu$ L of pyridine. Later, 75  $\mu$ L of N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) were added, and the mixture was heated at 60 °C for 20 min (with occasional agitation) and immediately injected to GC-MS.

#### 2.5. Data analysis

Each peak area was standardized in units of  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  of dry weight, relative to the internal standard. Chromatographic profiles were compared in terms of peak retention time relative to n-tetradecane. Peaks with a low signal-noise ratio, and compounds with near zero variance detected in less than 80% of the samples (Kuhn, 2008) were excluded.

Non-parametric statistical analyses were selected because half of variables were not normally distributed even with transformation. Hierarchical clustering analysis (HCA) was developed using percent concentrations (PC) with Bray-Curtis dissimilarity (BCD) and Ward's agglomeration method. The *Mann-Whitney U* test was used for pair-wise comparisons (between clusters, B-NB or dry-rainy). A heatmap was built (R package: gplots ver. 2.17.0) with PC of the main compounds grouping trees according to HCA. Volcano plots were used to see differences between B and NB trees using log fold change of concentration ( $\log(\text{B}/\text{NB})$ ) in the X-axis and  $-\log$  of false discovery rate (FDR) ( $(-1) \cdot \log(\text{FDR})$ ) on the Y-axis, either with relative or absolute concentrations (R package: fdrtool ver. 1.2.15). Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was selected to explore differences between B and NB trees, either sampled in dry or rainy season (R package: MixOmics ver. 5.2.0). Chemical profiles from the second field study were analyzed by a PLS-DA and *Kruskal-Wallis* test. Discriminant variables were selected by calculating the variable importance in the projection score ( $\text{VIP} > 1$ ). PLS-DA models were validated calculating the Area Under the Receiver Operating Characteristic (AUROC) because it is more powerful detecting very small differences between groups than  $Q^2$  or  $DQ^2$  parameters, especially when sample size is small (Szymańska et al., 2012). Statistical significances of AUROC parameters were calculated from null models using 5000 permutations. Another heatmap was modeled using correlations among compounds from NB trees using Euclidean distances and Ward's method. All analyses were made in R ver. 3.2.3 (R Core Team, 2015).

### 3. Results

#### 3.1. Leaf volatiles and chemotype determination

The list of identified foliar volatile compounds (Table A1) coincide with that obtained for other Hass orchards (García-Rodríguez et al., 2016) but with the addition of three phenolics and one carotenoid derivative (Table A1). Thus, we compared the terpenoid/phenylpropanoid chemotypes of our sampled trees with those previously published (García-Rodríguez et al., 2016). Most sampled trees belong to one of the most common avocado chemotype according to proportions of estragole (~10%),  $\beta$ -caryophyllene (~25%) and germacrene D (~25%). We found also two trees from a rare chemotype which the most

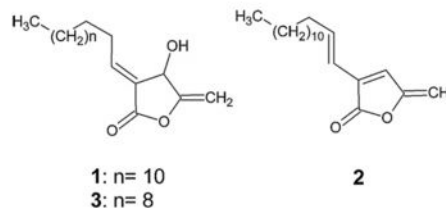


Fig. 1. Proposed structure of butanolides 1–3 detected on Hass avocado branches.

abundant compound was estragole (> 60%), these trees were excluded from the subsequent analyses (García-Rodríguez et al., 2016).

#### 3.2. Branch volatile chemical composition

The volatile hexanic fraction of *P. americana* cv. Hass branches consisted of 34 major compounds (accounting for 95% of the total concentration) out of 210 chromatographic peaks: 10 monoterpenes, 14 sesquiterpenes, 2 acetogenins, 3 butanolides, 1 avocadofuran, 2 alkanes, 2 fatty acids, 1 alcohol (phytol), 1 triterpene ( $\beta$ -sitosterol), and 2 aldehydes. Some pairs of compounds coeluted in many samples and were reported together: limonene and  $\beta$ -E-ocimene ( $R_t = 4.0$ ); eudesmene and dodecanal ( $R_t = 7.36$ ); cadinene and cubenol ( $R_t = 7.53$ ); caryophyllene oxide and tridecanal ( $R_t = 7.98$ ). A detailed explanation of butanolides, acetogenins and avocadofuran tentative identification is found in Appendix A (Supplementary files).

The majoritarian compounds were butanolide 3 (tentatively identified as isobutylactone A, Fig. 1) and nonacosane constituting almost 40% of total. Other abundant compounds were butanolide 2 (tentatively 3-(1-Tetradecenyl)-5-methylenedihydro-2(5H)-furanone, Fig. 1), heptacosane and  $\beta$ -sitosterol constituting ~20%. Germacrene D and  $\beta$ -caryophyllene were the most abundant sesquiterpenes, while the most abundant monoterpene was  $\alpha$ -phellandrene (2.7, 3.9 and 0.82% respectively) (See Table 2).

#### 3.3. Infestation status

In order to test if some avocado trees were resistant or immune to *Copturus aguacatae*, infestation status (bored or non-bored) of avocado trees was checked two years after the first sampling in three orchards. Most of the non-infested trees in the first visit were infested in the second one, except a few that were growing isolated at the orchards limits; the infested trees in the first sampling date remained equally or severely infested two years later (data not shown).

#### 3.4. Metabolomic comparison between bored and non-bored trees

Hierarchical clustering analysis (HCA) was applied to leaves or branches metabolomes, clustering trees according to sampling season or municipality but not to infestation status. Then, a PLS-DA was applied for trees sampled in the rainy or the dry season. Statistically significant differences were found only with branch chemical composition (Table 1) but not for leaves (data not shown), thus only branch results are described. Finally, the correlation among branch compounds was analyzed to visualize covariation among compounds associated with infestation status (B or NB).

##### 3.4.1. Seasonal variation

Hierarchical clustering analysis classified branch avocado chemical profiles in two clusters (Fig. 2). *Mann-Whitney U* test showed 21 compounds with statistically significant differences between clusters A and B (Table 1). The same pattern was observed using absolute

Table 2

Major volatile constituents of avocado branches identified from bored and non-bored trees. Concentration is expressed as mg g<sup>-1</sup> of dry weight.

RT (min)	RI	Compound name	Previous Report (Y/N) <sup>b</sup>	Rainy season		Dry season	
				Bored trees	Non-bored trees	Bored trees	Non-bored trees
				mean ± SE	mean ± SE <sup>c</sup>	mean ± SE	mean ± SE <sup>d</sup>
3.30	942	α-Pinene <sup>4</sup>	Y	<b>0.056 ± 0.004</b>	<b>0.091 ± 0.010</b>	<b>0.046 ± 0.003</b>	<b>0.038 ± 0.003</b>
3.43	959	Camphene <sup>5</sup>	Y	<b>0.015 ± 0.001</b>	<b>0.024 ± 0.003</b>	<b>0.015 ± 0.001</b>	<b>0.013 ± 0.001</b>
3.59	981	β-Phellandrene	Y	<b>0.005 ± 0.000</b>	<b>0.009 ± 0.001</b>	<b>0.003 ± 0.000</b>	<b>0.003 ± 0.000</b>
3.64	988	β-Pinene	Y	<b>0.027 ± 0.002</b>	<b>0.045 ± 0.005</b>	<b>0.019 ± 0.001</b>	<b>0.017 ± 0.001</b>
3.68	993	β-Myrcene <sup>6</sup>	Y	0.032 ± 0.003	0.044 ± 0.004	<b>0.028 ± 0.002</b>	<b>0.022 ± 0.002</b>
3.83	1013	α-Phellandrene <sup>5</sup>	Y	<b>0.066 ± 0.005</b>	<b>0.087 ± 0.007</b>	<b>0.064 ± 0.005</b>	<b>0.041 ± 0.004</b>
3.98	1033	p-Cymene <sup>4</sup>	Y	0.021 ± 0.002	0.037 ± 0.005	<b>0.021 ± 0.002</b>	<b>0.016 ± 0.001</b>
4.02	—	Limonene <sup>1,10</sup>	Y	<b>0.033 ± 0.002</b>	<b>0.052 ± 0.005</b>	<b>0.027 ± 0.002</b>	<b>0.020 ± 0.001</b>
4.12	1051	β-(Z)-Ocimene	Y	<b>0.015 ± 0.001</b>	<b>0.022 ± 0.002</b>	<b>0.009 ± 0.001</b>	<b>0.007 ± 0.001</b>
6.38	1364	α-Cubebene <sup>6</sup>	Y	<b>0.060 ± 0.003</b>	<b>0.080 ± 0.007</b>	<b>0.037 ± 0.002</b>	<b>0.033 ± 0.002</b>
6.57	1392	Vlangene	Y	0.049 ± 0.005	0.052 ± 0.004	<b>0.034 ± 0.002</b>	<b>0.034 ± 0.003</b>
6.67	1407	β-Cubebene	Y	<b>0.060 ± 0.003</b>	<b>0.078 ± 0.005</b>	0.042 ± 0.004	0.035 ± 0.003
6.91	1445	β-Caryophyllene <sup>4</sup>	Y	0.316 ± 0.020	0.377 ± 0.028	<b>0.151 ± 0.010</b>	<b>0.122 ± 0.009</b>
7.14	1482	α-Humulene <sup>6</sup>	Y	0.035 ± 0.002	0.041 ± 0.003	<b>0.019 ± 0.001</b>	<b>0.022 ± 0.006</b>
7.25	1500	Unk sesquiterpene	N	0.044 ± 0.003	0.050 ± 0.003	0.020 ± 0.001	0.021 ± 0.001
7.30	1508	Germacrene D	Y	<b>0.418 ± 0.025</b>	<b>0.550 ± 0.036</b>	<b>0.218 ± 0.017</b>	<b>0.191 ± 0.017</b>
7.36	—	Eudesmane <sup>2</sup>	N	<b>0.079 ± 0.005</b>	<b>0.098 ± 0.005</b>	0.069 ± 0.003	0.078 ± 0.005
7.40	1524	γ-Elementene	N	<b>0.067 ± 0.004</b>	<b>0.084 ± 0.005</b>	0.051 ± 0.004	0.038 ± 0.003
7.53	1545	δ-Cadinene <sup>3</sup>	Y	<b>0.088 ± 0.007</b>	<b>0.115 ± 0.009</b>	0.052 ± 0.003	0.044 ± 0.003
7.90	1606	Germacrene-D-4-ol	Y	0.031 ± 0.004	0.039 ± 0.004	0.030 ± 0.003	0.024 ± 0.003
7.93	1611	Spathulenol	Y	0.029 ± 0.004	0.030 ± 0.003	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.002
7.98	—	Caryophyllene oxide <sup>4,8</sup>	Y	<b>0.269 ± 0.021</b>	<b>0.351 ± 0.027</b>	0.327 ± 0.017	0.367 ± 0.025
10.06	1969	n-Hexadecanoic acid	Y	<b>0.195 ± 0.011</b>	<b>0.281 ± 0.026</b>	0.324 ± 0.034	0.325 ± 0.029
10.94	2123	Phytol	Y	0.099 ± 0.006	0.103 ± 0.005	0.105 ± 0.009	0.124 ± 0.010
11.15	2160	Linoleic acid	Y	0.232 ± 0.018	0.289 ± 0.025	0.413 ± 0.064	0.406 ± 0.071
11.33	2192	Avocadofuran <sup>9</sup>	Y	<b>0.243 ± 0.018</b>	<b>0.364 ± 0.034</b>	0.294 ± 0.025	0.395 ± 0.039
11.81	2278	Butanolide1 <sup>6</sup>	N	0.234 ± 0.024	0.220 ± 0.018	0.048 ± 0.008	0.077 ± 0.017
12.25	2360	Butanolide2 <sup>7</sup>	N	0.582 ± 0.162	0.778 ± 0.151	0.256 ± 0.020	0.331 ± 0.045
12.94	2492	Butanolide3 <sup>8</sup>	Y	2.811 ± 0.247	2.819 ± 0.232	<b>0.611 ± 0.075</b>	<b>1.255 ± 0.203</b>
13.61	2628	Acetogenin1 <sup>9</sup>	N	0.499 ± 0.039	0.578 ± 0.051	0.202 ± 0.027	0.259 ± 0.038
13.90	2691	Acetogenin2 <sup>10</sup>	Y	0.159 ± 0.014	0.185 ± 0.022	0.099 ± 0.016	0.115 ± 0.020
13.95	2700	Heptacosane <sup>4</sup>	Y	<b>0.648 ± 0.048</b>	<b>1.224 ± 0.148</b>	0.803 ± 0.082	1.064 ± 0.199
14.21	2758	β-sitosterol	Y	0.505 ± 0.070	0.672 ± 0.082	0.396 ± 0.072	0.527 ± 0.094
14.95	2900	Nonacosane <sup>4</sup>	Y	<b>1.344 ± 0.106</b>	<b>2.207 ± 0.218</b>	1.427 ± 0.115	1.953 ± 0.279

<sup>4</sup>Between bored and non-bored trees in rainy season (absolute conc.).<sup>2</sup>Eudesmane mixture with dodecanal.<sup>1</sup>Limonene mixture with β-(E)-ocimene.<sup>3</sup>δ-Cadinene mixture with cubenol.<sup>4</sup>Caryophyllene oxide mixture with tridecanal. Tentative identification.<sup>5</sup>2-Heptadecadienyl-furan.<sup>6</sup>4-Hydroxy-5-methylene-3-dodecylidene-2(3H)-furanone probably isolitsseallicolide C.<sup>7</sup>3-(1-Tetradecenyl)-5-methylenedihydro-2(5H)-furanone.<sup>8</sup>4-Hydroxy-5-methylene-3-tetradecylidene-2(3H)-furanone probably Isobutusilactone.<sup>9</sup>1,2-dihydroxy-heneicosadien-4-one.<sup>10</sup>1-acetyl-2-dihydroxy-heneicosadien-4-one probably persin.<sup>a</sup>Identification confirmed by pure standard injection.<sup>b</sup>References on supplementary information section. Numbers in bold indicate statistically significant differences,  $p < 0.05$ , in Mann-Whitney U test.<sup>c</sup>between bored and non-bored trees in rainy season (absolute conc.).<sup>d</sup>Between bored and non-bored trees in dry season (percentage conc.).<sup>e</sup>Between trees sampled on rainy or dry season (percentage conc.).

concentration but it was more evident with relative concentration (data not shown).

In the cluster A (right), the most abundant compound was butanolide 3 reaching a mean value of 26%, while nonacosane had a mean of 16%. In the cluster B (left), the pattern is reversed: nonacosane was the most abundant compound with a mean of 22%, and butanolide 3 with a mean 11%. The same pattern was observed for butanolide 1 and heptacosane. A heatmap showed that trees were grouped due to differences in proportions of majoritarian compounds: heavy alkanes and butanolides (Fig. 2a). However, our sampling strategy did not allow to determine if those differences were due to sampling season, locality or both. Thus, we resampled 10 additional non-bored trees from two

orchards, one from each region. The result revealed a cyclic pattern of variation of branch alkanes and butanolides. The relative concentration (RC) of alkanes (heptacosane and nonacosane) was low with respect to butanolides (1–3) in rainy season, while the pattern was reversed in dry season; the RC of butanolides was higher than alkanes (Fig. 3).

### 3.4.2. Bored and non-bored trees comparison

Chemical differences between B and NB trees in the rainy and dry seasons were explored through volcano plots of either absolute (quantitative) or relative concentration (qualitative) (Appendix A). On the rainy season chemical differences were more evident with absolute concentration (there were seven significant compounds with higher

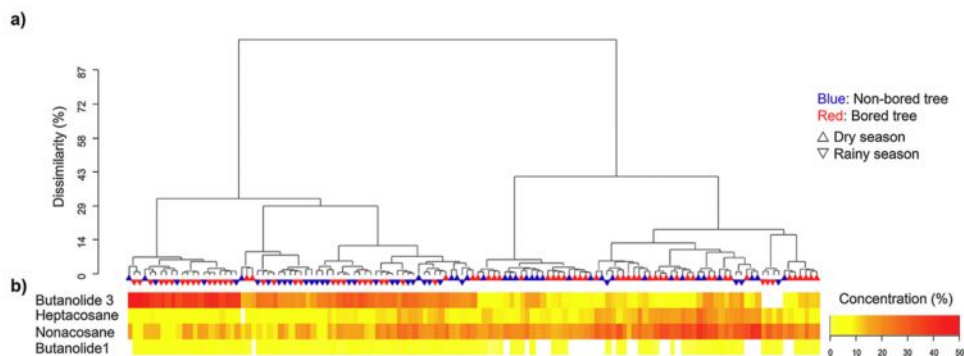


Fig. 2. a) Dendrogram based on Bray-Curtis dissimilarity and Ward's clustering method for relative concentration (%) from branches chemical composition of 130 Hass avocado trees. The main two clusters correspond to trees sampled in the rainy season (left) and trees sampled in the dry season (right); b) Heatmap of relative concentrations of the main compounds clustering trees according to sampling season. White color indicates a zero percent concentration.

fold change and only one using relative concentration); on the contrary, in dry season chemical changes were mainly qualitative (Figure A2). Thus, a PLS-DA for trees from rainy season based on standardized concentrations (z-scores), and PLS-DA for the dry season based on relative concentrations were made. For samples from the rainy season, the PLS-DA model explained 49% of the variance, because there was high variation among NB trees chemical profiles, but discrimination between B and NB was obtained with an AUROC value of 0.698 ( $p = 0.0186$ ) (Fig. 4a). For samples from the dry season, the PLS-DA model explained 47% of variance between B and NB branches (Fig. 4b), and the AUROC value was high and significant (0.704;  $p = 0.0042$ ).

For the rainy season, a *Mann-Whitney U* test showed differences for 19 compounds with low concentration in B trees (Table 2). According to PLS-DA, the most discriminant compounds (VIP score > 1) were  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -phellandrene,  $\beta$ -pinene, limonene +  $\beta$ -Z-ocimene,  $\beta$ -cubebene, germacrene D, avocadofuran, palmitic acid, heptacosane, and nonacosane.

In the dry season a *Mann-Whitney U* test showed differences in RC of 19 compounds of which 17 had a high RC, and 2 had a low RC in B trees (Table 2). According to PLS-DA the most discriminant compounds (VIP score > 1) were:  $\alpha$ -pinene, camphene,  $\alpha$ -phellandrene, p-cymene, limonene +  $\beta$ -E-ocimene,  $\beta$ -Z-ocimene,  $\alpha$ -cubebene,  $\beta$ -caryophyllene, germacrene D,  $\tau$ -elemene, cadinene + cubenol, germacrene D-4-ol, and butanolide 3.

The chemical differences between B and NB trees in both seasons could be due to both seasonal variation and the type of sampled branches. During the rainy season, the sampled branches had empty

galleries and sometimes pupae. This kind of branches corresponds to weevil infestations from last year and could give information about tree response to mechanical damage. On the other hand, branches sampled during the dry season did contain active ABB larvae and had the typical powdery-white exudate; these branches could give information about tree induced response to ABB larvae activity. In order to discard the possible effect of season, branches with empty galleries (old damage, OLD), undamaged (UnD) and with new damage containing active ABB larvae (NwD) were sampled from six trees during the dry season and their GC-MS profile obtained. Branches OLD had higher thickness than NwD, because those branches were older ( $KW-H_{(2,50)} = 16.895$ ;  $p = 0.0002$ ). Thus, compounds that were positive and strongly correlated with thickness ( $r^2 > 0.2$ ) were discarded from the analysis (data not shown). A *Kruskal-Wallis* test showed significant differences in 12 compounds. In general sesquiterpenes and alkanes concentrations (both absolute and relative) increased in chemical profiles of NwD and decreased in those of OLD branches compared to UnD branches (Fig. 5).

### 3.5. Correlations among compounds

In order to understand patterns of variation between compounds, a heatmap was modeled with the correlation matrix of all detected compounds. Euclidean distances and Ward's method for agglomeration were used. Three clusters of compounds were detected: the first one is composed by  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, camphene, p-cymene, germacrene D,  $\alpha$ - and  $\beta$ -cubebene,  $\beta$ -caryophyllene,  $\tau$ -elemene, limonene +  $\beta$ -E-ocimene,  $\beta$ -phellandrene,  $\beta$ -Z-ocimene, spathulenol, unknown

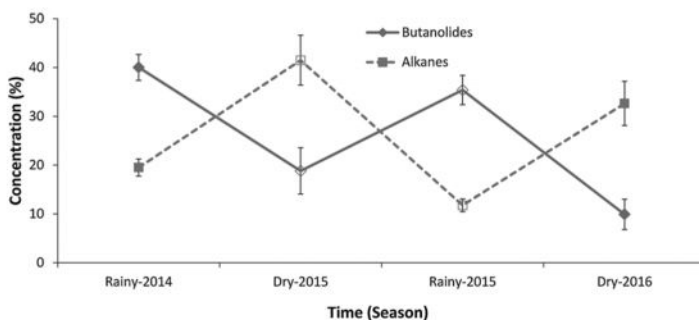


Fig. 3. Relative concentration of heavy alkanes (sum of heptacosane and nonacosane) and butanolides (sum of compounds 1–3) calculated with the sum of all identified compounds from NB trees. Error bars correspond to mean  $\pm$  SE ( $n = 10$ ). Hass avocado trees belonged to two orchards, one for each site sampled in both seasons, but sampled trees were not all the same because some of them were infested by the avocado branch borer (ABB) the following years.

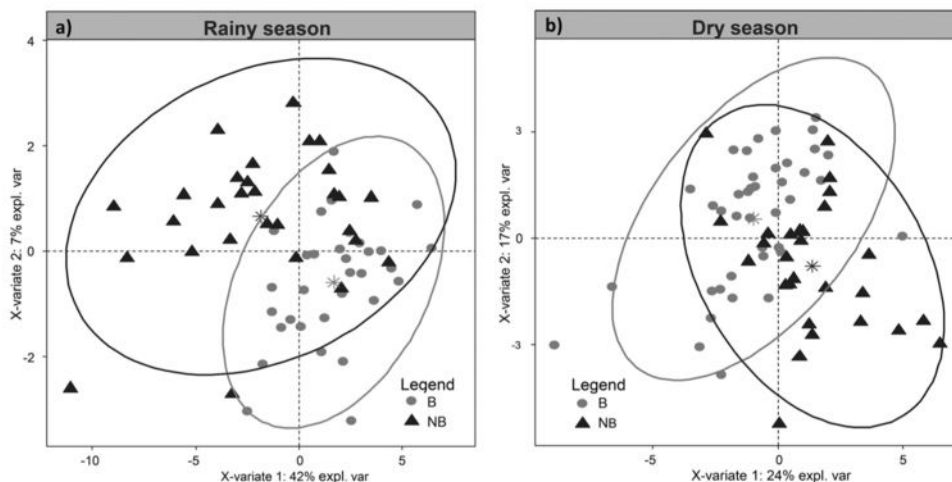


Fig. 4. PLS-DA for branches chemical composition between bored (B) and non-bored (NB) trees. a) Trees sampled in rainy season, B trees had branches with avocado branch borer (ABB) old damage (empty galleries). (AUROC = 0.698,  $p = 0.0186$ ). Statistical analysis was developed using standardized concentrations. b) trees sampled in dry season, B trees had branches with ABB active larvae (AUROC = 0.704;  $p = 0.0042$ ). The analysis was developed using relative (%) concentrations. Triangles are non-bored trees (NB), and circles are bored trees (B). Asterisks denote centroid position.

sesquiterpene and cadinene + cubenol. The second cluster is composed of phytol, palmitic and linoleic acids, avocadofuran,  $\beta$ -sitosterol, nonacosane, butenolide 2 and heptacosane. Cluster 3 is composed by  $\alpha$ -humulene,  $\alpha$ -phellandrene, germacrene-D-4-ol, acetogenins 1 and 2, eudesmane + dodecanal, caryophyllene oxide + tridecanal, and butanolides 1 and 3. Compounds from cluster one are positive and strongly correlated among themselves and negatively correlated with cluster two and positive and weakly correlated with cluster three (Fig. 6a).

#### 4. Discussion

Terpenoid and phenylpropanoid proportions are genetically determined in *Persea americana* (Niogret et al., 2013), these compounds have been employed to distinguish between avocado races, varieties or chemotypes (García-Rodríguez et al., 2016). Indeed, terpenoid and phenylpropanoid profiles had been related with pest incidence (Espinosa-García et al., 2001; Torres-Gurrola et al., 2011). However, most of our sampled trees belonged to one of the most common avocado chemotypes (C1) and only a couple of trees showed a rare chemotype

(R1). Previous work showed that a sample of 20 orchards had three to thirteen terpenoid chemotypes (Espinosa-García et al., 2001; García-Rodríguez et al., 2016). Hass orchards are planted with cloned saplings obtained from one or two orchards available to a local nursery owner (personal observation). Thus, it is likely that the source nurseries for our sample region were few, or perhaps one, with a reduced number of scion-provider orchards.

Thus, our sampled trees are genetically close to the level of clones, and the phytochemical variation between trees is probably due to epigenetic sources and/or gene-environment interactions (Smith et al., 2011; Vogt, 2015). Therefore, our study fails to identify constitutive chemical markers associated with avocado resistance to *C. aguacatae*. However, this genetically homogeneous sample of avocado trees allowed us to get information about seasonal, intraclonal and ABB induced phytochemical variation.

We did not find chemical differences on foliar chemical profiles between B and NB trees. Instead, we detected seasonal variation in many branch compounds. By controlling that variation, we found chemical differences between B and NB trees on both seasons, when

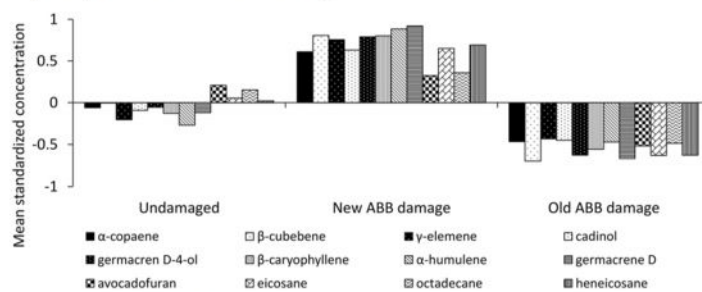
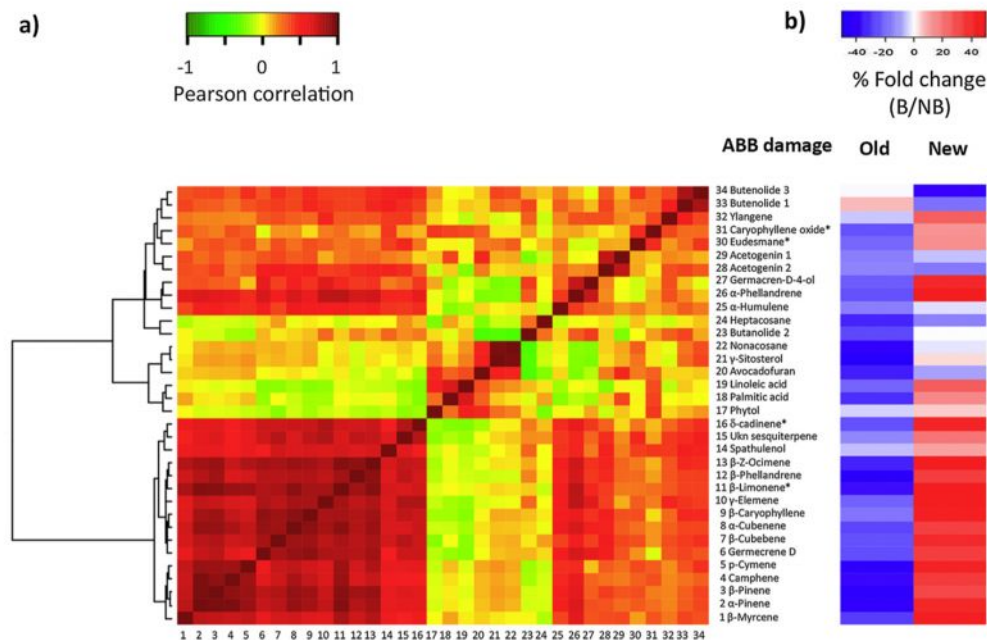


Fig. 5. Mean standardized concentration of compounds showing significant differences (Kruskal-Wallis test) between avocado branches with new, old and without avocado branch borer (ABB) damage within the same tree.



**Fig. 6.** a) Heatmap for correlations between 34 volatile compounds of non-bored Hass avocado trees ( $n = 67$ ). Correlations color code: High positive ( $r > 0.7$ , dark red), weak positive ( $0.1 < r < 0.7$ , red), no correlation ( $-0.1 < r < 0.1$ , yellow), weak negative ( $-0.7 < r < -0.1$ , green), high negative ( $r < -0.7$ , dark green). Numbers on X-axis correspond to compound names on Y-axis. b) Percentage of fold change (B/NB) for trees sampled on rainy (absolute concentration, branches with ABB old damaged) or dry season (conc. in percentage, branches with new ABB damage and active larvae). \*Compounds that coeluted in mixtures; see Table 1 (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

bored branches had active larvae (dry season) and when bored branches had empty galleries. Therefore, the comparison between B and NB trees chemical profiles (from branches) could give us an idea of which compounds are related with ABB induced response or with intracolonial differences. In order to distinguish between these possibilities, in a second field study we compared chemical profiles from branches with new, old and without ABB damage from the same trees.

From the first field study, we found that the most abundant compounds (butanolides and alkanes) vary with the season. Phytochemical seasonal variation within tree clones has been reported few times (Liimatainen et al., 2012; Osier et al., 2000) showing that intracolonial seasonal variation has important positive or negative consequences for herbivores performance that feed on different seasons (Hwang and Lindroth, 1998). Long chain alkanes, such heptacosane, and nonacosane that had the highest proportions in Hass avocado branches in the dry season have been reported as feeding stimulants for some insects (Sarkar et al., 2013). As far as we know, this is the first time that branches seasonal variation is reported for a cultivated cloned tree.

Regarding the chemical differences between B and NB trees, when B trees had active larvae feeding (dry season) the trend was that some terpenoids had higher proportions, while butanolide 3 and  $\alpha$ -humulene had lower proportions than NB trees (Table 2). Considering the results from the second field study, the low proportions of butanolide 3 and  $\alpha$ -humulene in B trees might be intracolonial differences, while the high proportions of many sesquiterpenes and monoterpenes are the consequence of induced response. However, in the second study, the monoterpenes did not show statistically significant increase in concentration on bored branches; their trend was similar to the

sesquiterpenes increase, which might be a result of low sample size. Qualitative changes between branches containing active ABB larvae and undamaged branches occurred mainly in terpenoids. That result was similar to the reported increase of terpenoids concentration in resin as a response of wounding by bark or stem borers (Raffa and Berryman, 1982; Zhao et al., 2011) or mechanical damage (Tomlin et al., 2000) in conifers, and in *Eucalyptus* (Eyles et al., 2004).

Apparently, the avocado tree response to ABB infestation is to change qualitatively branch terpenoids while larvae are feeding; but when larvae start pupation or imagoes leave galleries, the avocado tree reduces the concentration of all compounds in used branches. This pattern may be a result of the accumulated damage caused by ABB larvae boring and adult emergence, where the xylem integrity and its capability to transport water is affected. Thus, nutrients are reallocated to growth buds below larvae feeding site (Chen et al., 2011a), and terpenoids production is diminished because the lack of nutrients. However, the change in quality of bored branches with old ABB damage could affect suitability for new infestation of ABB and other branch herbivores (Chen et al., 2011b).

The expected differences on the number of plant defensive compounds between chemical profiles of B and NB branches could be of few specific compounds or many of them (Poelman et al., 2009). In the first case, the screening hypothesis (SH) posed that plants maintain a high diversity of inactive compounds due to the increased probability to get an active compound by mutation (Jones and Firn, 1991). Our results do not agree with the SH predictions because we recorded induction for many compounds antagonists of insects and not only in one. In the second case, the coevolutionary arms race hypothesis proposed that the

diversity of plant compounds arise from the cyclic process of defenses and counter-defenses between plants and their herbivores and pathogens producing many defensive compounds that could be bioactive individually and being more effective in combinations due to additive and synergistic effects (Berenbaum and Zangerl, 1996). In the first scenario, herbivores should overcome a single defensive trait (a single barrier) to colonize a host, but in the second scenario, herbivores should adapt to a very complex mixture of compounds (a multibarrier) (Torres-Gurrola et al., 2011) that varies within and between plants. Thus, a set (or combination) of phytochemicals could function as a barrier for adult host choice and another set of compounds could be a barrier for larvae performance according to the multibarrier hypothesis (Kubo and Hanke, 1985; Torres-Gurrola et al., 2011). Indeed, the variation of non-volatile compounds such as phenolics (not analyzed here) should be included to get a complete overview.

Our results showed a set of sixteen compounds (monoterpenes and sesquiterpenes), which are strong and positively correlated and showing high fold change (ranging from 30 to 70%) on bored trees (Fig. 6b). This set of compounds might reduce ABB larvae performance because some of them have shown defensive functions in other tree species. For example,  $\alpha$ -pinene reduced feeding of the bark borer, *Dendroctonus valens* (Xu et al., 2014); camphene, myrcene, and limonene alone or in combination with sesquiterpenes affected larvae performance of western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Zou and Cates, 1997). Indeed, induced chemical response may prevent mass attack as has been reported on *Picea abies* attacked by *Ips typographus* (Schiebe et al., 2012).

Finally, for herbivorous insects, selection of optimal host is crucial in order to enhance offspring performance (Gripenberg et al., 2010), and then rules for host choice must be tuned to find the correct signs in an ocean of noise (Bruce and Pickett, 2011). In our study, we showed some dimensions of *Persea americana* cv Hass branch phytochemical variation (ontogenic, seasonal, intraclonal) overlapping with the induced response, which could affect *Copturus aguacatae* behavior. For example, volatile terpenoids of Hass avocado tree vary between branches of different thickness (Niogret et al., 2013), and ABB preferentially infest thin branches (1–3 cm) (Coria et al., 2007) maybe because their volatile blend may be more attractive and the tissue has high nutritional quality. Bored trees showed a low proportion of butanolide 3 and  $\alpha$ -humulene which could be related to host choice. Indeed, ABB oviposition period concurs with the high concentration of branch alkanes exhibited during the rainy season, so they could be stimulants. On the other hand, the increase of a set of terpenoids related to avocado induced response could be a signal of occupied sites for oviposition; and low concentration of all volatile compounds in branches with ABB damage from last years could be a signal of low-quality places for oviposition whenever those kinds of branches are dying. Thus, from the point of view of insects, the dimensions of the phytochemical variability of Hass avocado may contribute to the heterogeneity of plants as resources or “moving targets” (Nyman, 2010); and insect should overcome different barriers (many compounds that vary on different dimensions) to colonize successfully and completing its development in a host.

#### Funding

This work was supported by the National Autonomous University of Mexico (UNAM) through the Research Institute on Ecosystems and Sustainability (IIES) under grant IIESPO-FJEG awarded to FJE and by FJE personal funds.

#### Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgements

Authors acknowledge to the National Council of Science and Technology (CONACyT) for a Doctoral scholarship for CM; to Joselyn Millar and Jeremy McNeal for their valuable comments to the early version of this manuscript; to Local Board of Plant Health (JLSV) from Acuitzio-Villamadero and Tingambato, Mich. especially to Orlando Morales Reyes, Roberto Cervantes Servín and his staff, and avocado growers. Thanks to Yolanda M. García Rodríguez for the training course on GC-MS; to Ek del Val de Gortari and Guillermo Delgado Lamas by their support and valuable comments, and Diego Morales Rios and Jorge Sandoval Medina for their help in processing samples. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences (Posgrado en Ciencias Biológicas-UNAM).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.003>.

#### References

- Aukema, J.E., Leung, B., Kovacs, K., Chivers, C., Britton, K.O., Englin, J., Frankel, S.J., Haight, R.G., Holmes, T.P., Liebhold, A.M., McCullough, D.G., von Holle, B., 2011. Economic impacts of Non-native forest insects in the continental United States. *PLoS One* 6, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024587>.
- Berenbaum, M.R., Zangerl, A.R., 1996. Phytochemical diversity. Adaptation or random variation? In: Romeo, J.T., Saunders, J.A., Barbosa, P. (Eds.), *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–24. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6_1).
- Bruce, T.J.A., Pickett, J.A., 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects-finding the right mix. *Phytochemistry* 72, 1605–1611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.011>.
- Chen, Y., Ciaramitaro, T., Poland, T.M., 2011a. Moisture content and nutrition as selection forces for emerald ash borer larval feeding behaviour. *Ecol. Entomol.* 36, 344–354. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01278.x>.
- Chen, Y., Whitehill, J.G., Bonello, P., Poland, T.M., 2011b. Feeding by emerald ash borer larvae induces systemic changes in black ash foliar chemistry. *Phytochemistry* 72, 1990–1998. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.07.003>.
- Coria, V., Pescador, A., Lezama, R., Salgado, R., López, M., Vidales, A., Muñoz, J., 2007. Avocado stem weevil *Copturus aguacatae* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae) in Michoacan. In: *Proceedings of the VI World Avocado Congress*. Mexico, pp. 12–16.
- Eloh, K., Sasanelli, N., Maxia, A., Caboni, P., 2016. Untargeted metabolomics of tomato plants after root-knot nematode infestation. *J. Agric. Food Chem.* 64, 5963–5968. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02181>.
- Espinosa-García, F.J., García-Rodríguez, Y.M., Chávez Zavala, A., Delgado-Lamas, G., 2001. Implicaciones de la variación en los fenotipos químicos de las poblaciones de plantas en su susceptibilidad a las plagas y patógenos: el caso de *Persea americana* var. Hass. *Memorias del 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate*, Uruapan, Michoacán México, pp. 46–57.
- Eyles, A., Davies, N.W., Mohammed, C.M., 2004. Traumatic oil glands induced by pruning in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globulus*: chemistry and histology. *Trees - Struct. Funct.* 18, 204–210. <http://dx.doi.org/10.1007/s00468-003-0297-4>.
- García-Rodríguez, Y.M., Bravo-Monzón, A.E., Martínez-Díaz, Y., Torres-Gurrola, G., Espinosa-García, F.J., 2012. Variación fitoquímica defensiva en ecosistemas terrestres. In: Rojas, J., Malo, E. (Eds.), *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur, México, pp. 217–252.
- García-Rodríguez, Y.M., Torres-Gurrola, G., Meléndez-González, C., Espinosa-García, F.J., 2016. Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill cv Hass. *Chem. Biodivers.* 13, 1767–1775. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600169>.
- Gripenberg, S., Mayhew, P.J., Parnell, M., Roslin, T., 2010. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. *Ecol. Lett.* 13, 383–393. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01433.x>.
- Hwang, S.Y., Lindroth, R.L., 1998. Consequences of clonal variation in aspen phytochemistry for late season folivores. *Écoscience* 5, 508–516. <https://doi.org/none>.
- Jason, G.R., O'Reilly-Wapstra, J.M., Brewer, M.J., Summers, R.W., Moore, B.D., 2011. Do Multiple herbivores maintain chemical diversity of scots pine monoterpenes? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366, 1337–1345. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0236>.
- Jansen, J.J., Allwood, J.W., Marsden-Edwards, E., van der Putten, W.H., Goodacre, R., van Dam, N.M., 2009. Metabolomic analysis of the interaction between plants and herbivores. *Metabolomics* 5, 150–161. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-008-0124-4>.
- Jones, C.G., Firn, R.D., 1991. On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 333, 273–280.
- Kubo, I., Hanke, F.J., 1985. Multifaceted chemically based resistance in plants. In: Cooper-Driver, G.A., Swain, T., Conn, E.E. (Eds.), *Chemically Mediated Interactions between Plants and Other Organisms*. Recent Advances in Phytochemistry. Springer US, Boston, MA, pp. 171–194. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-9658-2\\_7](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-9658-2_7).

- Kuhn, M., 2008. Building predictive models in R using the caret package. *J. Stat. Softw.* 28, 1–26. <http://dx.doi.org/10.1053/j.soda.2009.03.002>.
- Liimatainen, J., Karonen, M., Sinkkonen, J., Helander, M., Salminen, J.P., 2012. Phenolic compounds of the inner bark of *Betula pendula*: seasonal and genetic variation and induction by wounding. *J. Chem. Ecol.* 38, 1410–1418. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-012-0199-2>.
- Luna, A., López-Martínez, V., Pérez-De la O, N.B., Jiménez-García, D., Jones, R.W., Castañeda-Vildozola, Á., Ruiz-Montiel, C., 2017. Actual and potential distribution of five regulated avocado pests across Mexico, using the maximum entropy algorithm. *Florida Entomol.* 100, 92–100. <http://dx.doi.org/10.1653/024.100.0114>.
- Mari, G., Erb, M., Boccard, J., Glauser, G., Doyen, G.R., Villard, N., Robert, C.A.M., Turlings, T.C.J., Rudaz, S., Wolfender, J.L., 2013. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant Cell Environ.* 36, 621–639. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12092>.
- Mithöfer, A., Boland, W., 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 431–450. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>.
- Moore, B., Andrew, R., Kuhlheim, C., Foley, W., 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol.* 201, 733–750.
- Muñiz, R., Barrera, A., 1958. Clave para los barrenadores de las ramas del aguacatero (*Persea gratissima* Gaertn) en la América tropical y subtropical (Coleoptera: Curculionidae: Zygopinae). *Acta Zoológica Mex.* II 1958.
- Niogret, J., Epsky, N.D., Schnell, R.J., Boza, E.J., Kendra, P.E., Heath, R.R., 2013. Terpenoid variations within and among half-sibling avocado trees, *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *PLoS One* 8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073601>.
- Nyman, T., 2010. To speciate, or not to speciate? Resource heterogeneity, the subjectivity of similarity, and the macroevolutionary consequences of niche-width shifts in plant-feeding insects. *Biol. Rev.* 85, 393–411. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00109.x>.
- Osier, T.L., Hwang, S.Y., Lindroth, R.L., 2000. Effects of phytochemical variation in quaking aspen *Populus tremuloides* clones on gypsy moth *Lymantria dispar* performance in the field and laboratory. *Ecol. Entomol.* 25, 197–207. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00245.x>.
- Poelman, E.H., Van Dam, N.M., Van Loon, J.J., Vet, L.E.M., Dicke, M., 2009. Chemical diversity in *Brassica oleracea* affects biodiversity of insect herbivores. *Ecology* 90, 1863–1877. <http://dx.doi.org/10.1890/08-0977.1>.
- Prince, E.K., Pohnert, G., 2010. Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 193–197. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3162-5>.
- R Core Team, 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Raffa, K.F., Berryman, A.A., 1982. Accumulation of monoterpenes and associated volatiles following inoculation of grand fir with a fungus transmitted by the fir engraver, *Scolytus ventralis* (Coleoptera, scolytidae). *Can. Entomol.* 114, 797–810. <http://dx.doi.org/10.4039/Ent114797-9>.
- Rincón-Hernández, C.A., Espinosa-García, F.J., 2008. Relationship between the phytochemical diversity in creole avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) leaves and the incidence of foliar gall psyllid (*Trioxa anceps*). *Allelopath. J.* 21, 175–182.
- Sarkar, N., Mukherjee, A., Barik, A., 2013. Long-chain alkanes: Allelochemicals for host location by the insect pest, *Epilachna dodocastgna* (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl. Entomol. Zool.* 48, 171–179. <http://dx.doi.org/10.1007/s13355-013-0168-4>.
- Schiebe, C., Hammerbacher, A., Birgersson, G., Witzell, J., Brodelius, P.E., Gershenzon, J., Hansson, B.S., Krokene, P., Schlyter, F., 2012. Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia* 170, 183–198. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-012-2298-8>.
- Schultz, J.C., 1983. Habitat selection and foraging tactics of caterpillars in heterogeneous trees. In: Denno, R.F., McClure, M.S. (Eds.), *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems*. Academic Press, New York, pp. 61–90.
- SENASICA, 2010. Ficha técnica: Barrenador del tronco y ramas del aguacate *Copturus aguacatae* Kissinger [WWW Document]. URL <http://publico.senasica.gob.mx/?id=4518> (Accessed 11.16.16).
- Smith, E.A., Collette, S.B., Boynton, T.A., Lillrose, T., Stevens, M.R., Bekker, M.F., Eggett, D., St Clair, S.B., 2011. Developmental contributions to phenotypic variation in functional leaf traits within quaking aspen clones. *Tree Physiol.* 31, 68–77. <http://dx.doi.org/10.1093/treephys/tpq1100>.
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A.K., Westerhuis, J.A., 2012. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* 8, S3–S16. <http://dx.doi.org/10.1007/s11396-011-0330-3>.
- Tomlin, E.S., Antonejic, E., Alfaro, R.I., Borden, J.H., 2000. Changes in volatile terpene and diterpene resin acid composition of resistant and susceptible white spruce leaders exposed to simulated white pine weevil damage. *Tree Physiol.* 20, 1087–1095. <http://dx.doi.org/10.1093/treephys/20.16.1087>.
- Torres-Gurrola, G., Delgado-Lamas, G., Espinosa-García, F.J., 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.01.011>.
- Torres-Gurrola, G., García-Rodríguez, Y.M., Lara-Chávez, M.B.N., Guillen-Andrade, H., Delgado-Lamas, G., Espinosa-García, F.J., 2016. Análisis de la riqueza de metabolitos secundarios de *Persea* spp., bajo algunas hipótesis que proponen explicar la función de la diversidad fitoquímica. In: Anaya, A.L., Espinosa-García, F.J., Reigosa Roger, M.J. (Eds.), *Ecología Química y Alelopatía: Avances y Perspectivas*. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México-Plaza y Valdés, Mexico, pp. 195–292.
- Villari, C., Herms, D.A., Whitehill, J.G.A., Cipollini, D., Bonello, P., 2016. Progress and gaps in understanding mechanisms of ash tree resistance to emerald ash borer, a model for wood-boring insects that kill angiosperms. *New Phytol.* 209, 63–79. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13604>.
- Vogt, G., 2015. Stochastic developmental variation, an epigenetic source of phenotypic diversity with far-reaching biological consequences. *J. Biosci.* 40, 159–204. <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-015-9506-8>.
- Xu, B.B., Liu, Z.D., Sun, J.H., 2014. The effects of  $\alpha$ -pinene on the feeding performance and pheromone production of *Dendroctonus valens*. *Entomol. Exp. Appl.* 150, 269–278. <http://dx.doi.org/10.1111/eea.12161>.
- Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., 1993. Plant chemistry, insect adaptations to plant chemistry, and host plant utilization patterns. *Ecology* 74, 47–54.
- Zhao, T., Krokene, P., Hu, J., Christiansen, E., Björklund, N., Långström, B., Solheim, H., Borg-Karlson, A.K., 2011. Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in a dose-dependent manner. *PLoS One* 6. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026649>.
- Zou, J., Cates, R.G., 1997. Effects of terpenes and phenolic and flavonoid glycosides from Douglas fir on western spruce budworm larval growth, pupal weight, and adult weight. *J. Chem. Ecol.* 23, 2313–2326. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.000006676.68124.91>.

## Apéndice A. Información suplementaria

### **Metabolic profiling of *persea americana* cv. hass branch volatiles reveals seasonal chemical changes associated to the branch borer *copturus aguacatae***

Claudio Meléndez-González<sup>1,2</sup> and Francisco Javier Espinosa-García<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, CP 58190 Morelia, Michoacán, México;*

<sup>2</sup>*Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, México.*

Corresponding author contact: [espinosa@iies.unam.mx](mailto:espinosa@iies.unam.mx); Phone number: 443-3222721



## Appendix A. Supplementary information

**Table A1.** Volatile constituents detected in mature Hass avocado leaves from bored and non-bored trees. Concentration relative to internal standard in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry weight.

RT (min)	RI	Compound	Mature leaves <sup>a</sup>	
			Infested trees mean $\pm$ SD $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw	Non-infested trees mean $\pm$ SD $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dw
3.30	942	$\alpha$ -Pinene	0.0245 $\pm$ 0.0111	0.0230 $\pm$ 0.0123
3.43	959	Camphene	0.0021 $\pm$ 0.0038	0.0024 $\pm$ 0.0043
3.55	976	Benzaldehyde	0.0030 $\pm$ 0.0048	0.0048 $\pm$ 0.0074
3.59	981	$\beta$ -Phellandrene	0.0067 $\pm$ 0.0048	0.0058 $\pm$ 0.0054
3.64	988	$\beta$ -Pinene	0.0197 $\pm$ 0.0098	0.0195 $\pm$ 0.0110
3.68	993	$\beta$ -Myrcene	0.0215 $\pm$ 0.0290	0.0198 $\pm$ 0.0260
3.80	1009	3-Hexenyl acetate	0.0225 $\pm$ 0.0242	0.0223 $\pm$ 0.0202
3.83	1013	$\alpha$ -Phellandrene	0.0072 $\pm$ 0.0073	0.0070 $\pm$ 0.0074
3.98	1033	o-Cymeno	0.0002 $\pm$ 0.0009	0.0005 $\pm$ 0.0023
4.01	1037	Limoneno	0.0022 $\pm$ 0.0049	0.0019 $\pm$ 0.0034
4.03	1039	$\beta$ -( <i>E</i> )-Ocimene	0.0062 $\pm$ 0.0084	0.0055 $\pm$ 0.0077
4.05	1042	Eucalyptol	0.0009 $\pm$ 0.0021	0.0004 $\pm$ 0.0016
4.73	1152	2-Phenylethanol	0.0007 $\pm$ 0.0018	0.0005 $\pm$ 0.0016
5.05	1176	Benzyl acetate	0.0030 $\pm$ 0.0066	0.0024 $\pm$ 0.0046
5.30	1210	Methyl salicylate	0.0034 $\pm$ 0.0070	0.0024 $\pm$ 0.0041
5.31	1211	Estragol	0.0022 $\pm$ 0.0166	0.0006 $\pm$ 0.0023
6.38	1364	$\alpha$ -Cubebene	0.0100 $\pm$ 0.0099	0.0148 $\pm$ 0.0238
6.57	1392	Ylangene	0.0034 $\pm$ 0.0061	0.0053 $\pm$ 0.0079
6.67	1407	$\beta$ -Cubebene	0.0131 $\pm$ 0.0097	0.0169 $\pm$ 0.0230
6.91	1445	$\beta$ -Caryophyllene	0.0930 $\pm$ 0.0533	0.0884 $\pm$ 0.0704
7.14	1482	$\alpha$ -Humulene	0.0151 $\pm$ 0.0131	0.0146 $\pm$ 0.0133
7.25	1500	Unkown sesquiterpene	0.0017 $\pm$ 0.0109	0.0001 $\pm$ 0.0011
7.30	1508	Germacrene D	0.0599 $\pm$ 0.0623	0.0682 $\pm$ 0.0889
7.35	1516	$\alpha$ -Farnesene	0.0055 $\pm$ 0.0070	0.0049 $\pm$ 0.0058
7.40	1525	$\gamma$ -Elemene	0.0255 $\pm$ 0.0781	0.0251 $\pm$ 0.0403
7.66	1567	Dihydroactinoliolide	0.0057 $\pm$ 0.0069	0.0063 $\pm$ 0.0065
7.90	1606	Germacren-D-4-ol	0.0099 $\pm$ 0.0100	0.0089 $\pm$ 0.0105
7.97	1618	Caryophyllene oxide	0.0231 $\pm$ 0.0267	0.0196 $\pm$ 0.0170
11.33	2192	Avocadofuran	0.8969 $\pm$ 0.5144	0.8888 $\pm$ 0.9002
12.82	-	Unknown	1.6367 $\pm$ 1.3274	1.6098 $\pm$ 1.6980
13.08	-	Unknown	0.4609 $\pm$ 0.3125	0.4383 $\pm$ 0.3620
13.61	2628	Acetogenin1	3.1537 $\pm$ 2.4043	3.0532 $\pm$ 2.4400
13.90	2691	Acetogenin2	0.9056 $\pm$ 0.5477	0.8639 $\pm$ 0.5505

### A1. Acetogenins, butanolides and avocadofuran tentative identification

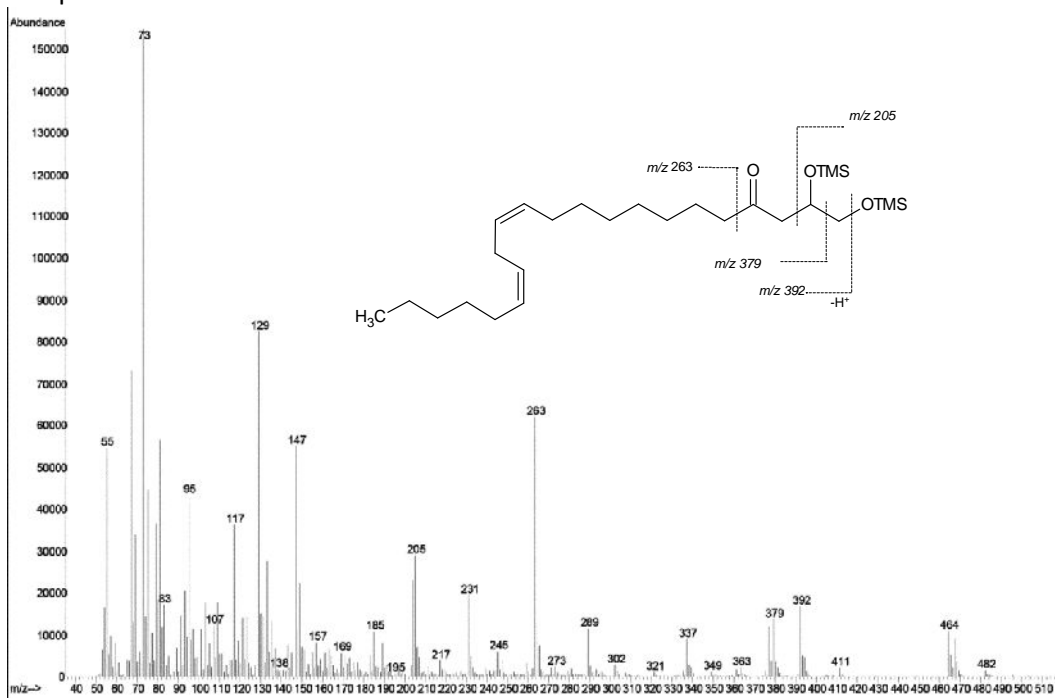
Putative acetogenins identities were assigned according to presence of ions  $m/z$  320 and 302 and the abundant peaks  $m/z$  81, 95, all shared with persin mass fragmentation pattern (Oelrichs et al., 1995). Silylation of a pooled sample where acetogenin peaks 1 (RT=13.61) and 2 (RT=13.90) were majoritarian, showed a peak with molecular ion of 482 [M+2TMS] corresponding to a weight 338 for acetogenin 1 (C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>); and another peak with molecular ion 452 [M+TMS] corresponding to a weight 380 for acetogenin 2 (C<sub>23</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>). Mass fragmentation patterns of their silylated derivatives suggest 1,2-Dihydroxy-heneicosa-dien-4-one for acetogenin 1 (Figure A1a), and their mono-acetylated analogue for acetogenin 2. Mass spectrum of acetogenin 2 and its molecular weight were consistent with persin structure (Figure A1b) (Oelrichs et al., 1995). Thus, the position and configuration of double bonds were depicted as persin (12Z,15Z); that assumption requires further confirmation. Avocadofuran (2-Heptadecadienyl-furan) was tentatively identified according to mass fragmentation pattern analysis (Rodriguez-Saona et al., 1998). Again, double bonds positions and configuration were depicted as 8Z and 11Z because 2-(8Z,11Z-Heptadecadienyl)furan is produced by rearrangement of persin (Rodriguez-Saona, C., Millar, J.G., Trumble, 1998) (Figure A1c).

Butanolides **1** and **3** were putatively identified according to the presence of abundant ions  $m/z$  70, 126, 140 and M-43 characteristic of 4-Hydroxy-5-methylene-3-alkylidene-2(3H)-furanones and 4-Hydroxy-5-methyl-3-alkylidene-2(3H)-furanones present in many butanolides isolated from species of Lauraceae (Kim et al., 2013; Seki et al., 1995; Zaki et al., 1980). Once again, silylation of a pooled sample where putative butanolides were majoritarian showed a molecular ion 352 [M+TMS] corresponding a molecular weight (MW) 280 (C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>) for butanolide **1** (consistent with litsealiicolide or isolitsealiicolide C; Figure S1d); while butanolide **3** showed a molecular ion 380 [M+TMS] corresponding to MW 308 (C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>) consistent with obtusilactone A or isoobtusilactone A (Figure A1f). Isoobtusilactone A has been isolated as majoritarian compound from *Persea borbonia* and other *Persea* species (Zaki et al., 1980) and from *Persea americana* (Le Dang et al., 2010), thus the configuration of double bond in alkylidene lateral chain was depicted as *E* configuration for butanolides **1-3**, but that assumption requires further confirmation. Butanolide **2** did not show reaction with BSTFA and exhibited a molecular ion 290 (C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), 18 mass units less than butanolide **3**. Probably butanolide **2** is the product of dehydration of butanolide **3** (Figure A1e). Our first attempts to isolate and purify butanolides **1-3** by column and preparative thin layer chromatography failed because they were unstable (Niwa et al., 1975), but further work will allow isolate and characterize unambiguously those compounds.

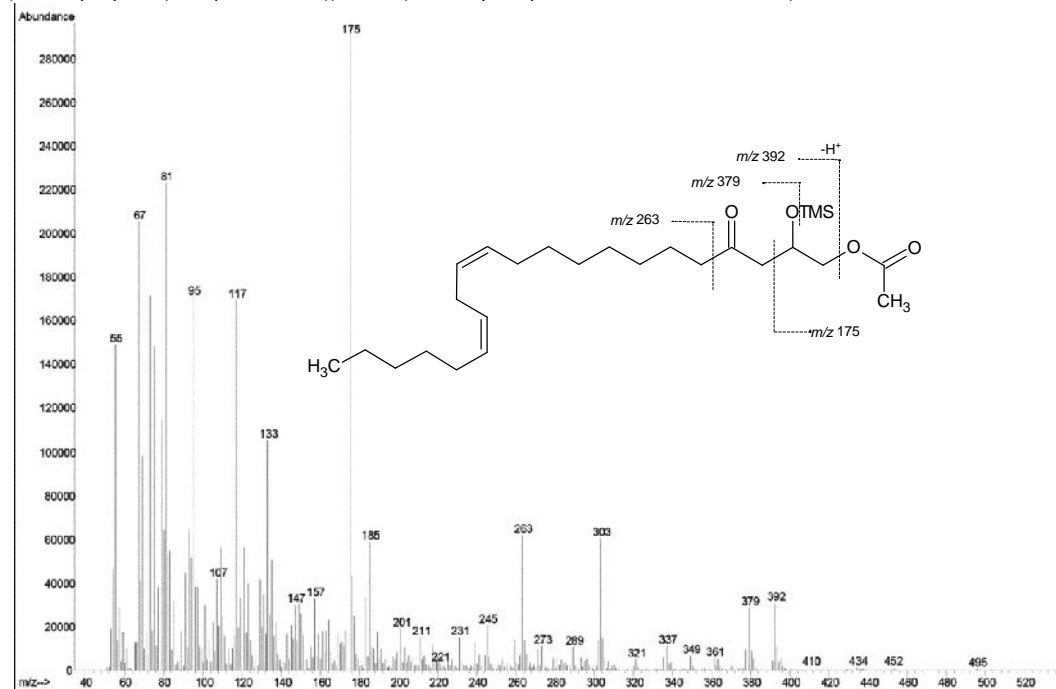
### References

- [50] P.B. Oelrichs, J.C. Ng, A.A. Seawright, A. Ward, L. Schaffeler, J.K. MacLeod, Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium, *Nat. Toxins*. 3 (1995) 344–349. doi:10.1002/nt.2620030504.
- [51] C. Rodriguez-Saona, J.G. Millar, D.F. Maynard, J.T. Trumble, Novel antifeedant and insecticidal compounds from avocado idioblast cell oil, *J. Chem. Ecol.* 24 (1998) 867–889. doi:10.1023/A:1022325601724.
- [52] J.T. Rodriguez-Saona, C. Millar, J.G., Trumble, isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblasts oil cells, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 1168–1170.
- [53] W. Kim, H.-N. Lyu, H.-S. Kwon, Y.S. Kim, K.-H. Lee, D.-Y. Kim, G. Chakraborty, K.Y. Choi, H.S. Yoon, K.-T. Kim, Obtusilactone B from *Machilus thunbergii* targets barrier-to-autointegration factor to treat cancer, *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 367–76. doi:10.1124/mol.112.082578.
- [54] A.I. Zaki, G.A. Zentmyer, J. Pettus, J.J. Sims, N.T. Keen, V. Sing, Borbonol from *Persea* spp.-chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi*, *Physiol. Plant Pathol.* 16 (1980) 205–212.
- [55] K. Seki, T. Sasaki, S. Wano, K. Haga, R. Kaneko, Linderanolides and isolinderanolides, ten butanolides from *Lindera glauca*, *Phytochemistry*. 40 (1995) 1175–1181. doi:10.1016/0031-9422(95)00399-R.
- [56] Q. Le Dang, H.R. Kwon, Y.H. Choi, G.J. Choi, K.S. Jang, M.S. Park, C.H. Lim, H.N. Luu, J.C. Kim, Nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* of isoobtusilactone A isolated from *Persea americana*, *Nematology*. 12 (2010) 247–253. doi:10.1163/138855409x12470480754708.
- [57] M. Niwa, M. Iguchi, S. Yamamura, The isolation and structure of obtusilactone, *Tetrahedron Lett.* 16 (1975) 1539–1542. doi:10.1016/S0040-4039(00)72191-5.

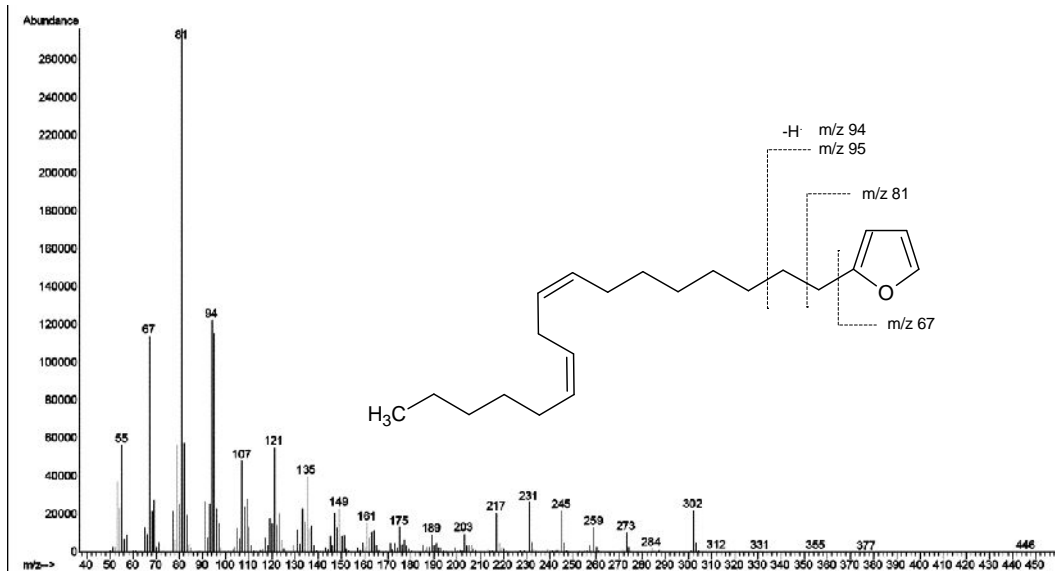
**Figure A1a-f.** Mass spectra and proposed fragmentation patterns for acetogenins and butanolides tentatively identified in branch hexanic extracts from *Persea americana* cv. Hass. The proposed structures are depicted with double bond position and configuration as in the most probable compounds.



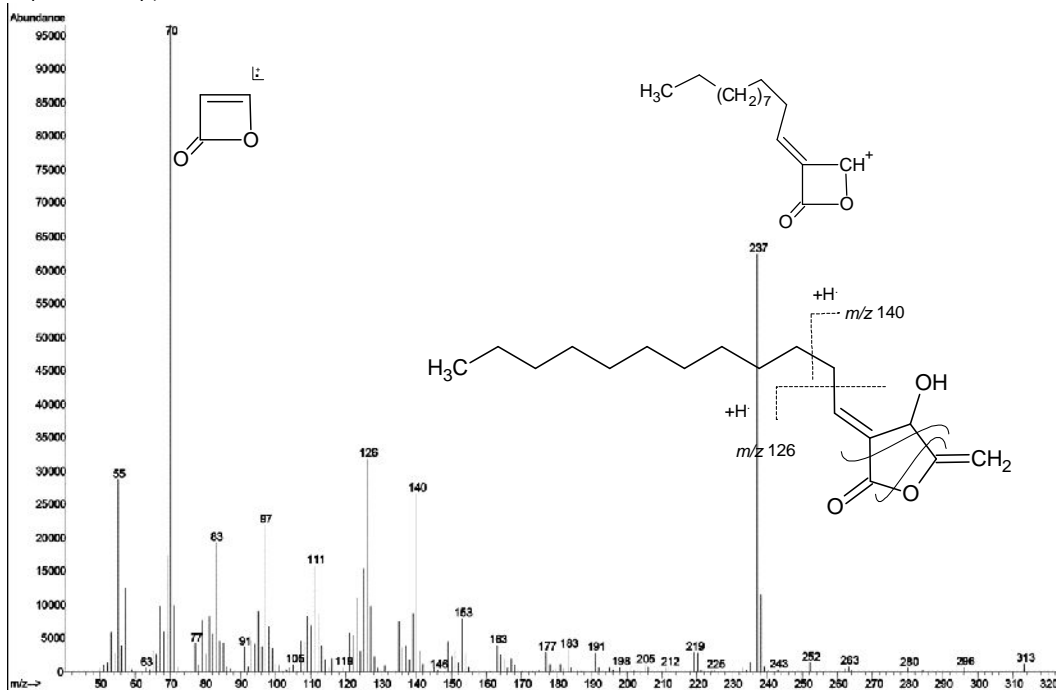
**Figure A1a.** Mass spectrum and fragmentation pattern of acetogenin 1 (1,2-Dihydroxy-heneicosa-dien-4-one)-2TMS (trimethylsilylated) compatible with ((Z12,Z15)-1,2-Dihydroxy-heneicosa-12,15-dien-4-one)-2TMS.



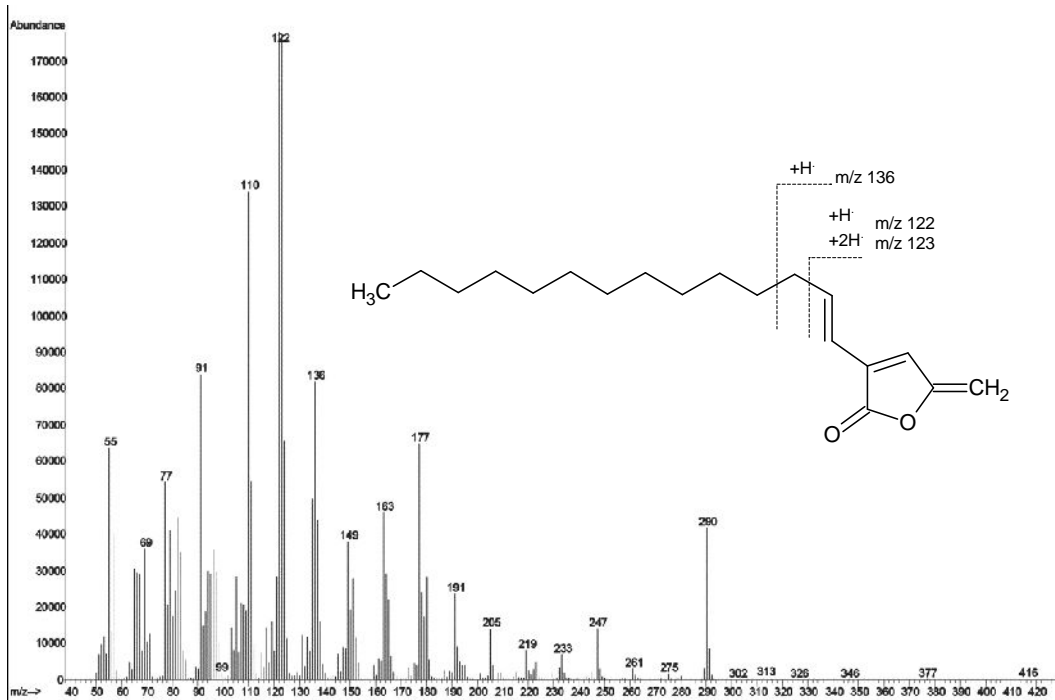
**Figure A1b.** Mass spectrum and fragmentation pattern of acetogenin 2 (1-Acetyl-2-dihydroxy-heneicosa-dien-4-one)-TMS compatible with ((Z12,Z15)-1-Acetyl-2-dihydroxy-heneicosa-12,15-dien-4-one)-TMS or Persin-TMS.



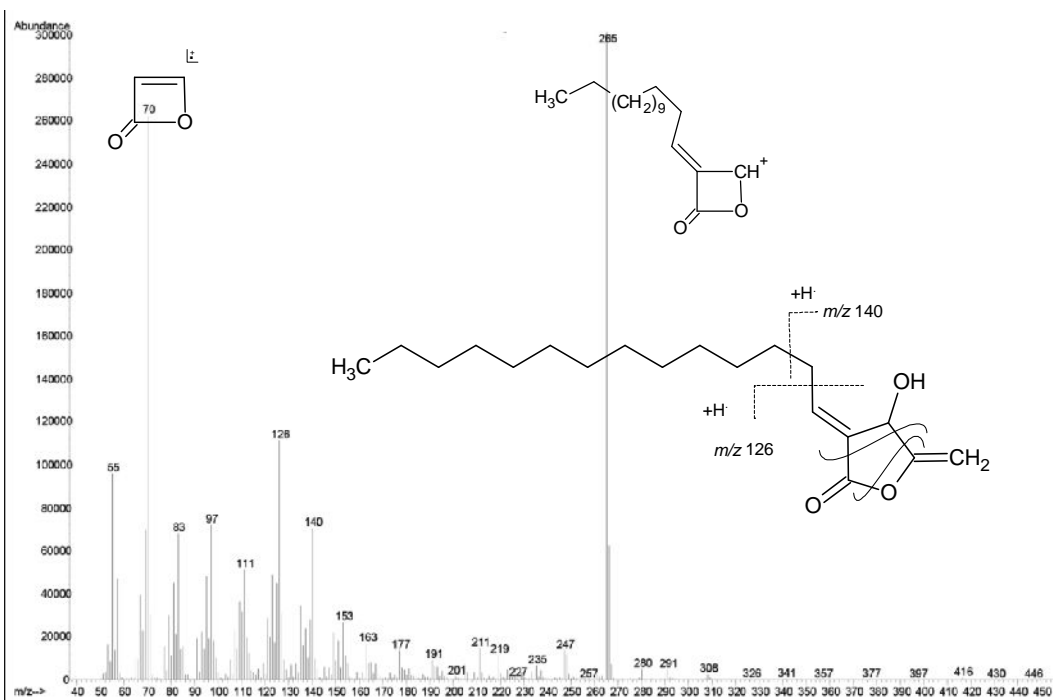
**Figure A1c.** Mass spectrum and fragmentation pattern of avocadofuran (Heptadecadienyl furan) compatible with 2-((8Z,11Z)-Heptadecadienyl)furan.



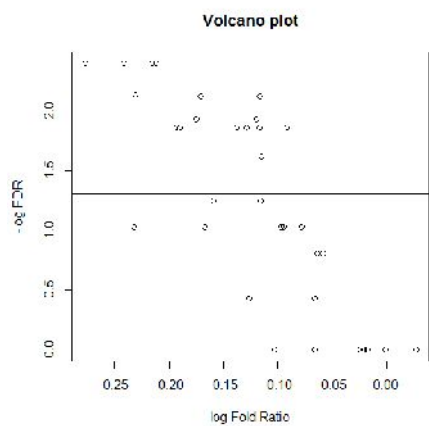
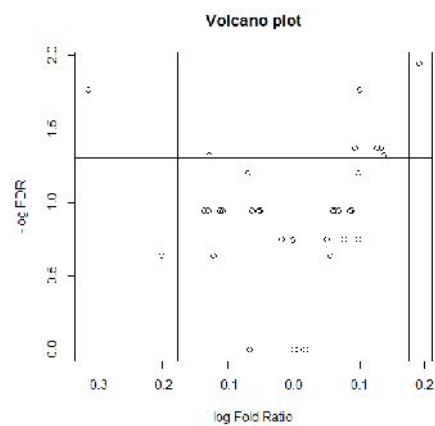
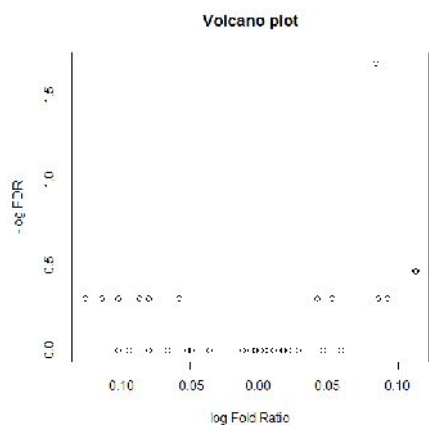
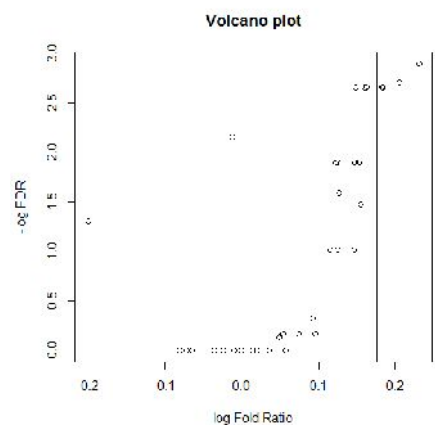
**Figure A1d.** Mass spectrum and fragmentation pattern of butanolide 1 (4-Hydroxy-5-methylene-3-dodecylidene-2(3H)-furanone) compatible with Litsealiicolide C or Isolitsealiicolide C.



**Figure A1e.** Mass spectrum and fragmentation pattern of butanolide 2 (3-(1-Tetradecenyl)-5-methylenedihydro-2(5H)-furanone) compatible with ((E)-3-(1-Tetradecenyl)-5-methylenedihydro-2(5H)-furanone).



**Figure A1f.** Mass spectrum and fragmentation pattern of butanolide 3 (4-Hydroxy-5-methylene-3-tetradecylidene-2(3H)-furanone) compatible with Isobutusilactone A or Obtusilactone A.

**Rainy season****a) Absolute concentration****Dry season****b) Absolute concentration****c) Relative concentration****d) Relative concentration**

**Figure A2.** Volcano plots for branch chemical profiles from *Persea americana* cv Hass between bored and non-bored trees. **a-b)** absolute concentration. **c-d)** relative concentration. Fold ratio is B/NB concentration quotient for each compound. Vertical lines denote compounds with a fold change of 50% (above or below bored trees concentration). Points above horizontal line are compounds with a  $Q$ -value  $< 0.05$ .  $Q$ -values are  $p$ -values from *Mann-Whitney U* test adjusted considering the probability to get false positives (false discovery rate; FDR).

Additional references complementary to Table 2 about metabolites identified in our study and previously reported on *Persea americana*.

- (1) Bravo-Monzón, A. E.; Espinosa-García, F. J. Volatile emissions in *Persea americana* in response to the stem borer *Copturus aguacatae* attack. *Allelopath. J.* 2008, 21 (1), 165–174.
- (2) García-Rodríguez, Y. M.; Torres-Gurrola, G.; Meléndez-González, C.; Espinosa-García, F. J. Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill cv Hass. *Chem. Biodivers.* 2016, 13 (12), 1767–1775.
- (3) Ogunbinu, A. O.; Ogunwande, I. A.; Flamini, G.; Cioni, P. L. Volatile compounds of *Persea americana* mill from Nigeria. *J. Essent. Oil Bear. Plants* 2007, 10 (2), 133–138.
- (4) Torres-Gurrola, G.; Montes-Hernández, S.; Espinosa-García, F. J. Patterns of Variation and Geographic Distribution in Foliar Chemical Phenotypes of *Persea americana* var. *drymifolia*. *Rev. Fitotec. Mex.* 2009, 32 (1), 19–30.
- (5) Le Dang, Q.; Kwon, H. R.; Choi, Y. H.; Choi, G. J.; Jang, K. S.; Park, M. S.; Lim, C. H.; Luu, H. N.; Kim, J. C. Nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* of isoobtusilactone A isolated from *Persea americana*. *Nematology* 2010, 12 (2), 247–253.
- (6) Zaki, A. I.; Zentmyer, G. A.; Pettus, J.; Sims, J. J.; Keen, N. T.; Sing, V. Borbonol from *Persea* spp. -chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Plant Pathol.* 1980, 16, 205–212.
- (7) Oelrichs, P. B.; Ng, J. C.; Seawright, A. A.; Ward, A.; Schaffeler, L.; MacLeod, J. K. Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *Nat. Toxins* 1995, 3 (5), 344–349.



### Capítulo 3

#### ***Persea americana* intraspecific phytochemical variation correlates with adult feeding preference and larvae performance from the avocado branch borer, *Copturus aguacatae* (Coleoptera: curculionidae).**

**Claudio Meléndez-González, Guillermo Delgado-Lamas, Ek del Val-de Gortari y Francisco J. Espinosa-García**

#### **Abstract:**

Plants exhibit great phytochemical diversity and variation and it is widely accepted that these characteristics are evolutionarily maintained because they are under the selection pressure of herbivorous insects, affecting host selection (preference and performance). However, to identify what compounds are related to host selection could be challenging and time consuming because of phytochemical variation. An alternative is to compare chemical composition of diverse hosts, for example, when insect diet breadth expansion occurs, because new and old hosts must share specific compounds related to host choice and insect performance. In this study, we assessed adult feeding preference and larvae performance from a specialized insect, the avocado branch borer *Copturus aguacatae*, in two coexisting *Persea americana* varieties, Creole and Hass.

Adult insects preferred to feed on Creole avocado and their larva gained more weight on the same host. A partial least square regression and multiple linear model, also showed that host chemical composition was related with feeding preference and larvae performance. Adult feeding preference was explained by high concentration of the volatile compound estragole that could serve as attractants and indicators of plant nutritional quality since fatty acids and  $\alpha$ -tocopherol were positively correlated. Larvae performance was positively correlated with  $\alpha$ -humulene (indicator of host quality), and negatively correlated with verimol I (phenylpropanoid derivative) and germacrene D which could be feeding deterrents. Our results indicate that avocado phytochemicals play a significant role on *C. aguacatae* preference acting as indicators of host quality.

## Introduction:

Phytochemical variation occurs in many levels along plant kingdom: from tissues within individuals, among individuals within populations, and between populations or among species. This variation has important ecological consequences for herbivorous insects (Moore et al., 2014) because phytochemicals and their variation could affect host preference and herbivore performance (Cornell & Hawkins, 2003; Nishida, 2014). In fact, it is widely accepted that the best explanation for intraspecific plant differential susceptibility to insects and pathogens is phytochemical variation (Berenbaum & Zangerl, 1996).

Indeed, plant phytochemicals are involved in insect host shifts (diet breadth expansion)(Becerra, 1997). The new host should share compounds with original host serving as attractants and oviposition stimulants (Murphy & Feeny, 2006) and should have variable content of parental toxins (Cheng et al., 2011; Orians, 2000). However, the outcome of new plant-insect interaction for insect's performance could be different depending on the insect diet breadth. While, generalist could have either an improved or diminished performance, specialists would more probably have a worse performance (Bertheau et al., 2010), in comparison with the original host.

Closely phylogenetically related hosts have more compounds in common than distant relatives (e.g. species from the same genus have more compounds in common than species within genera or families) (Cornell & Hawkins, 2003). In the same way, for specialist insects, new hosts within a genus have a lesser impact on insect performance than hosts from different genus (Bertheau et al., 2010). Thus, the magnitude of the detrimental effect on insect performance could be linked to chemical host similarity. However, if the new host plant is very similar to the original one, the specialist insect could suffer no effects on preference or performance. For example, intraspecific phytochemical variation at the level of chemotypes within populations or hybrids sometimes has an impact on specialist insects preference or performance (Cheng et al., 2013; Wheeler, 2006), but not always (Á. E. Bravo-Monzón et al., 2016; Bustos-Segura et al., 2015; Kuzina et al., 2009).

Therefore, through assays of preference and performance and the comparison of host plant chemical profiles composition (original and novel) it is possible identify which compounds (single or combinations) are probably involved on plant defense. Indeed, contributing to the understanding of the ecological role of phytochemical diversity and variation on plant-herbivore insect interactions.

The Creole or Mexican avocado, *Persea americana* var. *drymifolia* is one of the three recognized avocado breeds, and is the original host of a specialist weevil, the avocado branch borer (ABB), *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae). To the date, there are three known hosts of ABB: Mexican avocado and the varieties Fuerte and Hass, both

Mexican x Guatemalan hybrids (Lozano-Gutiérrez et al., 2015; Salazar-garcía & Bolio-garcía, 1992). Adult weevils feed in leaves and shoot while larvae bore galleries within branches (Muñiz, 1959). The highest incidence of ABB is in areas within or near to mountain humid tropical forests and lauraceous forests (above 2000 masl) where creole avocado was ancestrally distributed and now Hass avocado is being widely planted (Bost et al., 2013; Luna et al., 2017), suggesting an ABB host shift from Creole to Hass avocado.

The Hass avocado is a hybrid between Guatemalan and Mexican botanical varieties, and was introduced to Mexico in 1963 (Sánchez et al., 2001). Nowadays, Hass avocado is the most widely cultivar in Mexico and the ABB has become one of the worst five Hass avocado pests, and it is a potentially invasive species (Luna et al., 2017).

Avocado breeds are chemically distinguished by their foliar composition of volatile compounds such as terpenoids and phenylpropanoids (Bergh et al., 1973; Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016; Niogret, Epsky, Schnell, Boza, et al., 2013). Typically, Creole avocado leaves have a high proportion of phenylpropanoids as estragole (sometimes up to 85%), and the monoterpenes  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene (Bergh et al., 1973; Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016); while Hass avocado have high proportions of  $\beta$ -caryophyllene (Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016). Semivolatile compounds as acetogenins and avocadofurans are different among avocado varieties (Rodríguez-López et al., 2015) and between Creole and Hass cultivar (Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016). However, there are no reports about ABB preference or performance on its original and new hosts and its relationship with host chemistry.

In the present study we assayed ABB adult feeding preference (on a first experiment), and larvae performance (in a second independent experiment), both in Creole (original) and Hass (new host) avocados. Furthermore, we obtained foliar and trunk chemical profiles by GC-MS and through multivariate analysis we explore if Creole and Hass avocados are chemically different. Later, through partial least squares regression (PLSR) we explore what compounds (single or its combinations) are associated to ABB preference or performance.

According to the hybridization effects on phytochemistry and herbivore resistance reviewed by Cheng and cols (Cheng et al., 2011), the hybrids, should express 70 % of their parents secondary compounds on equal or low concentrations, and have 94.1 % of probability to be equal or more susceptible to their parent's pests. So, we expect that ABB larvae performance (weight gain) to be equal or higher on the hybrid host (Hass avocado) than Creole. On the other hand, ABB adult feeding preference should be equal or high on the hybrid host.

ABB larvae performance in both hosts could also be affected by the induced response of the tree. To differentiate the effect from constitutive and induced compounds on ABB

larvae performance, we studied, concomitantly with experiment two, the trunk's chemical profile of control trees with mechanical damage. We expect that the native host mounts a more specific induced response to ABB larvae than the new one.

## **Methods and materials**

### *Vegetal material-Avocado saplings*

Hass avocado saplings grafted on Creole avocado rootstock were purchased in a local nursery at Uruapan, Michoacán. Creole avocado rootstocks were grown from seeds from an unknown location to the nursery manager. One-year old saplings with 80-130 cm high were grown in a local andosol soil (called "topure") with watering and fertilization recommended by the nurseryman. Trees were watered with 500 ml weekly and fertilized with 10 g of NPK (10:20:10) monthly.

### *Avocado branch borer adults and larvae*

Avocado branches (30 cm long) with bored holes were collected from an avocado orchard from Villa Madero municipality in the Michoacan avocado belt (N 19°23'38.3"; W 101°18'00.1") in September 22th of 2016 during the adult emergence and flight season. Branches were put in a cardboard box lined inside with a plastic bag to avoid excessive loss of humidity and covered with organza fabric to prevent insects escape. Emerging insects were collected daily, sexed and separated in plastic containers with Hass avocado leaf buds and a small moist cotton ball for insect feeding and drinking respectively.

For ABB larva collection, Hass avocado branches showing a white powdery secretion (the characteristic damage) were collected from a commercial Hass avocado orchard at Villa Madero municipality (N 19°22'26.9"; W 101°15'53.1") in November 17th of 2016. Branches were put in plastics bags and carried to the laboratory. For larvae extraction, the bark with a white secretion was carefully removed with a knife to uncover the larvae. In that time period larvae were mainly feeding on cambium tissue. Larvae were manipulated with a moist paintbrush and kept on a petri dish with moist filter paper. Approximately 100 larvae were extracted and weighted on groups of ten. The mean weight for larvae was  $0.905 \pm 0.033$  mg.

### *Feeding preference experiment*

Six blocks containing four trees of similar height, two from each avocado variety, were made. Each block was covered with organza fabric bags (50x50x180 cm) and maintained in a shadow house. Inside each block a cardboard sheet was settled horizontally to prevent insect access to soil. For Hass avocados that panel also prevented access to the rootstock creole trunk as is illustrated on Figure 1. On the panel center, equidistant to avocado trunks, a petri dish with 12 adult insects, six males and six females, were

delivered in the morning (11:00 hrs). During the first week, counts of the number the insects on trees were made daily. By the end of two weeks some insects died due to a couple of cold days, and the experiment was terminated without mating and oviposition behavior observations. The surviving insects were retired, and the number of feeding punctures recorded.

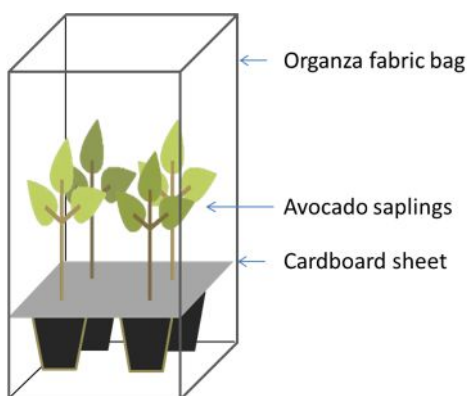


Fig. 1 Design of cages for ABB feeding experiment

#### *Larvae performance experiment*

Fifteen trees of each variety were infected each with one ABB larva. Each tree was punched with a micropipette tip trimmed to make a hole of 3x3 mm (diameter and depth) in branches with similar diameter. Then, one ABB larvae (0.905 mg approx.) was taken and introduced into the hole with a moist paintbrush. Then, the hole was covered with a piece of moist cotton that was hold in place with paraffin wax paper according to (A. E. Bravo-Monzón & Espinosa-García, 2008). Concomitantly, five trees from each variety were used as mechanical damage control following the same procedure but without larvae. Four mounts later, trees were cut from the base and the trunk was carefully dissected with a knife to get the ABB larva. Gallery length and larvae weight were recorded.

#### *Leaf samples*

Two intact mature leaves from trees of the preference experiment were sampled two weeks previous to the experiment. Additional leaves, young and mature, were sampled from undamaged trees (creole of Hass) to compare chemical composition related with leaf age.

#### *Trunk samples*

Cambium chemical profiles were obtained from the infested trunk of saplings from the second experiment. Thus, chemical profiles contain both constitutive compounds and

induced ones. To distinguish induced compounds we analyze in parallel chemical profiles of trees with mechanical damage, assuming that the effect of mechanical damage was not important, as previously shown (A. E. Bravo-Monzón & Espinosa-García, 2008).

#### *Sample processing*

The cambium tissue was removed from each branch, avoiding necrotic tissue, with a knife and separated in two parts; leaves were cut on the middle vein. One half of each tissue (leaf or branch) was dried at 80°C to obtain dry weight. The other half was cut in small fragments with scissors and put in a 75 ml amber flask with 40 ml of analytical grade hexanes and 1.0 mg of n-tetradecane as an internal standard. Samples were stored at 4°C for a week. Then, cambium (~5 g fresh) or leaf (~2 g fresh) tissue of each tree was ground with neutral sand and hexanes. Grinding with periodical hexanes removal and fresh hexanes addition was repeated until the hexanes extract was clear. The collected extract was filtered, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under a N<sub>2</sub> current until 1.0 ml. For each tree one leaf and one branch extract were obtained from composite samples of three leaves or branches.

#### *GC-MS analysis*

Each extract was homogenized in a vortex for 15 seconds and then 1µl was injected into an Agilent HP68490 gas chromatograph equipped with a HP-5 capillary column (length: 30m, inner diameter: 0.25mm; 5% phenyl siloxane-95% polymethyl siloxane) coupled with a selective mass detector (Agilent 5973N). The GC heating program and MS conditions used were the same as in (Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016). Chemical identity was assigned according to the NIST 2011 library matching and Kovat's retention index calculation (retention times relative to C7–C30 saturated n-alkanes) and pure compounds injection when standards were available. When reference mass spectra or standards were unavailable, tentative identity was assigned according mass spectrum fragmentation pattern analysis (see supplementary information).

#### *Statistical analysis*

Non-parametrical statistical analyses were preferred due to our small sample size. We used U Mann-Whitney test for pairwise comparisons such as feeding punctures and larvae weight gain between Creole VS Hass trunk, and young VS mature leaves.

In order to identify chemical differences between varieties we applied partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to volatilome components (GC-MS metabolic profiles) of leaves and trunks (Package mixOmics Ver. 6.3.2). Compounds with VIP-score (variable importance in the projection calculated as a weighted sum of the squared correlations between the PLS-DA components and the original variable) superior to 1.5 were considered with high discriminant power. Model performance was evaluated by

cross validation using Q2, R2 and AUC as quality parameters (values >0.6 for each parameter were considered as indicators of good models).

To identify compounds associated with induced response to ABB larvae activity, random forest (RF) analysis was applied (Package randomForest Ver. 4.6-14). Random forest is a robust analysis free of normality assumptions and adequate for small sample sizes (Brückner & Heethoff, 2017).

To determine which compounds or mixtures of them were associated with preference or performance, we applied partial least squares regression (PLSR) with leaf and trunk compounds and number of feeding punctures, gallery length and larval weight gain, respectively (Package PLS Ver.2.7-2). Later, a linear model was developed considering the ten compounds with the highest loadings obtained on PLSR and the model was repeated suppressing non-significant variables until obtain an improved model with the highest adjusted R-squared statistically significant. All analyses were developed in R software ver. 3.2.3.

## Results

### *Compounds identification*

The detected compounds on Creole and Hass cambium extracts match with those previously reported (Torres-Gurrola et al., 2011; García-Rodríguez et al., 2016; Meléndez-González and Espinosa-García 2018), but Verimol I, dehydro verimol I, linoleyl methyl ketone, linolenyl methyl ketone are reported for first time in Persea genus. Putative identification was supported by mass spectra fragmentation pattern analysis (see supplementary information).

### *Adult Feeding preference*

The daily number of ABB adults observed during five consecutive days on Creole leaves, branches or trunks was three times higher than those on Hass tissues ( $U(n_{1,2}=30);144$ ,  $p<0.05$ ); the number of insect feeding punctures was significantly higher on Creole than on Hass avocado ( $U(n_{1,2}=6);3.5$ ,  $p<0.05$ ) (Figure 1a). In addition, the distribution of damage along sapling tissues showed a particular pattern, Creole avocados received more feeding punctures on young leaves and trunk, while Hass avocados accounted more damage on the trunk (Figure 1b).

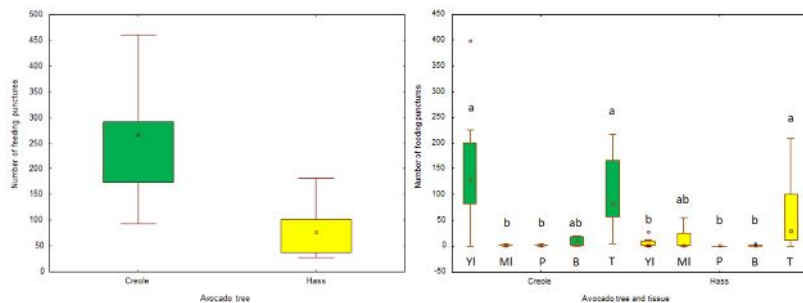


Figure 1. Number of feeding punctures on avocado saplings (Creole or Hass) produced by *Copturus aguacatae* adults in a choice experiment (n=6). a) Differences between Creole and Hass avocados; b) Distribution of ABB feeding damage along saplings. YI: young leaves; MI: mature leaves; P: petiole; B: branch; T: trunk. Different letters mean significant differences on Man-Whitney U test;  $p < 0.05$ .

### ABB larvae performance

From the 15 trees of each variety, artificially infested with ABB larvae only 8 (43 %) survived on Creole and 10 (66 %) on Hass. For larvae performance, there was no difference in gallery length between creole ( $4.0 \pm 1.5$ ) and Hass ( $2.9 \pm 1.4$ ) trunks ( $U_{(n1=8, n2=10)}; 25, p > 0.05$ ), but larvae weight average was marginally higher on Creole (23.1) than Hass avocado (20.7) ( $U_{(n1=8, n2=10)}; 19, p < 0.1$ ). However, the heaviest larva (80 mg) was obtained from a Hass sapling and suppression of this outlier makes the analysis significant ( $U_{(n1=8, n2=9)}; 12.5; p < 0.05$ ) (Figure 2).

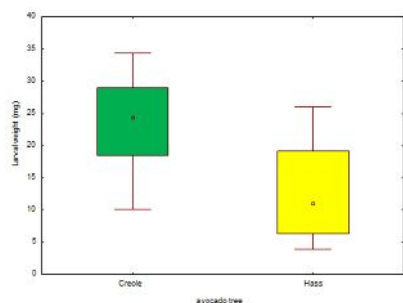


Figure 2. Weight gain of ABB larvae on Creole and Hass avocados after an outlier was removed.

### Hass and Creole avocados chemical composition

Leaf and trunk compounds detected on GC-MS chemical profiles match with those previously reported (Yolanda Magdalena García-Rodríguez et al., 2016; Meléndez-González & Espinosa-García, 2018; Torres-Gurrola et al., 2011). The retention time and identity (when possible) are listed in Table 1.



Thirty-four compounds showed significant differences between Creole and Hass foliar chemical profiles (see Table 1): for example, estragole concentration was 457-fold higher in creole leaves, while acetogenins and avocadofuran concentration (RT: 11.27) were 2-3 higher in Hass leaves. Regarding trunk chemical compounds, there were 46 compounds showing significant differences between avocados; for example, phenylpropanoids were undetectable on Hass, while fatty acid esters and  $\alpha$ -tocopherol were 7 to 15-fold higher, and also many terpenoids were 1 to 5-fold higher on Creole than Hass. But, some alkanes, butanolides and acetogenins were 2 to 15-fold higher in Hass than Creole as is shown in Table 1.

Table 1. Compounds identified on leaves or trunk from Creole or Hass avocado saplings by GC-MS.

Compound name	RT (min)	Leaves			Trunk				
		Creole Mean ± SE	Hass Mean ± SE	p- valu e	Ratio (C/H)	Creole Mean ± SE	Hass Mean ± SE	p- value	Ratio (C/H)
Unk monoterpene	3.06	0.019 ± 0.067	---	-	-	---	---	-	-
α-pinene <sup>a</sup>	3.24	0.625 ± 1.328	0.043 ± 0.047		6.75	0.146 ± 0.216	0.190 ± 0.088		1.98
Camphene <sup>a</sup>	3.37	0.012 ± 0.029	0.008 ± 0.013		0.58	0.011 ± 0.034	0.065 ± 0.050	**	0.46
β-phellandrene	3.53	0.001 ± 0.005	0.007 ± 0.007	**	0.14	---	---	-	-
β-pinene	3.57	0.652 ± 1.315	0.064 ± 0.094		4.26	0.132 ± 0.198	0.058 ± 0.052	*	5.32
β-myrcene <sup>a</sup>	3.62	0.044 ± 0.056	0.007 ± 0.008	*	3.01	0.019 ± 0.026	0.040 ± 0.049		1.53
Unknown	3.69	0.011 ± 0.029	0.011 ± 0.012	*	0.35	---	---	-	-
α-phellandrene <sup>a</sup>	3.77	---	---	-	0.00	0.010 ± 0.034	0.253 ± 0.169	***	0.12
p-cymene <sup>a</sup>	3.92	0.019 ± 0.061	0.006 ± 0.009		1.21	---	0.046 ± 0.043	***	0.00
Limonene	3.96	0.030 ± 0.070	0.034 ± 0.063		0.36	0.007 ± 0.020	0.013 ± 0.038		1.43
β-(E)-ocimene	3.97	0.028 ± 0.070	0.001 ± 0.004	.	5.45	0.034 ± 0.041	0.089 ± 0.083		1.17
Eucalyptol	3.98	0.072 ± 0.135	0.002 ± 0.004	.	18.42	---	---	-	-
β-(Z)-Ocimene	4.06	0.033 ± 0.051	0.002 ± 0.005	.	10.10	0.028 ± 0.031	0.020 ± 0.030	*	4.17
Linalol	4.46	---	---	-	-	0.010 ± 0.023	---	.	-
Terpineol	5.25	---	---	-	-	---	---	-	-
Estragole <sup>a</sup>	5.26	<b>3.528 ± 3.752</b>	<b>0.004 ± 0.014</b>	***	457.18	0.921 ± 1.074	---	***	-
Unknown	5.75	0.041 ± 0.100	0.008 ± 0.008		1.81	---	---	-	-
α-Cubebene <sup>a</sup>	6.33	0.023 ± 0.052	0.001 ± 0.003	*	5.22	0.008 ± 0.012	0.121 ± 0.066	***	0.21
Ylangene	6.50	---	---	-	-	<b>0.005 ± 0.013</b>	<b>0.101 ± 0.050</b>	***	0.12
α-Copaene	6.53	0.191 ± 0.325	0.009 ± 0.011		9.32	0.070 ± 0.061	0.227 ± 0.116		0.99
β-Cubebene	6.62	0.143 ± 0.292	---	***	-	0.026 ± 0.028	0.065 ± 0.052		1.13
Aldehyde	6.66	---	---	-	-	---	0.023 ± 0.035	*	-
Methyleugenol <sup>a</sup>	6.70	0.077 ± 0.115	0.001 ± 0.002	**	96.34	0.077 ± 0.225	---	*	-
β-caryophyllene <sup>a</sup>	6.86	1.725 ± 2.838	0.066 ± 0.045	**	13.58	0.341 ± 0.347	0.495 ± 0.214	.	1.89
Alloaromadendrene	6.98	---	---	-	-	0.003 ± 0.007	---		-
α-Humulene <sup>a</sup>	7.08	0.181 ± 0.292	0.008 ± 0.008	***	11.13	0.035 ± 0.035	0.042 ± 0.040	*	2.40
Unknown	7.18	0.027 ± 0.069	---	*	24.22	---	---	-	-
Bergamotene	7.20	---	---	-	-	0.085 ± 0.081	0.025 ± 0.034	**	11.84
Germacrene D	7.25	0.189 ± 0.247	0.037 ± 0.045	*	3.37	0.205 ± 0.160	0.538 ± 0.309		1.16
α-Farnesene	7.29	0.024 ± 0.085	0.003 ± 0.004		2.10	0.005 ± 0.012	0.105 ± 0.119	*	0.19
Tridecanal	7.30	---	---	-	-	0.003 ± 0.008	0.084 ± 0.125	*	0.10
γ-elemene	7.34	0.048 ± 0.145	0.001 ± 0.003	*	37.59	<b>0.014 ± 0.017</b>	<b>0.198 ± 0.121</b>	***	0.22
Cubedol	7.46	<b>0.268 ± 0.476</b>	<b>0.005 ± 0.007</b>	**	27.52	0.077 ± 0.052	0.125 ± 0.068	*	1.76
E-nerodilol	7.65	0.221 ± 0.395	---	***	-	0.016 ± 0.027	---	*	-

Unknown	7.80	0.051 ± 0.167	0.003 ± 0.006	8.01	---	---	-	-	
Germacren-D-4-ol	7.84	0.030 ± 0.084	0.006 ± 0.008	2.14	<b>0.003 ± 0.010</b>	<b>0.101 ± 0.067</b>	***	0.06	
Spathulenol	7.86	---	---	-	---	0.078 ± 0.070	**	0.00	
Caryophyllene oxide <sup>a</sup>	7.91	0.229 ± 0.381	0.011 ± 0.009	**	9.54	<b>0.140 ± 0.091</b>	<b>1.078 ± 0.473</b>	***	0.42
Dihydro verimol I	8.05	0.008 ± 0.030	---	-	---	---	-	-	
Unknown	8.07	0.013 ± 0.026	---	*	-	0.008 ± 0.011	0.046 ± 0.046	.	0.46
Unknown	8.30	0.022 ± 0.031	0.007 ± 0.009	1.61	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	-	-	
5-methyl-1-undecene	8.60	---	---	-	0.008 ± 0.019	0.004 ± 0.016		6.07	
Verimol I	8.61	1.393 ± 4.269	0.012 ± 0.012	*	39.30	0.117 ± 0.310	---	-	
Unknown	9.00	0.016 ± 0.030	0.012 ± 0.015	0.77	0.015 ± 0.022	0.141 ± 0.088	**	0.36	
Unknown	9.52	0.015 ± 0.018	0.012 ± 0.008	0.89	---	---	-	-	
Unknown	9.59	0.025 ± 0.032	0.026 ± 0.021	*	0.55	0.022 ± 0.017	0.021 ± 0.037	**	4.47
Unknown	9.63	0.095 ± 0.060	0.094 ± 0.078	0.78	0.065 ± 0.041	---	***	-	
Fatty acid derivative	9.73	0.011 ± 0.016	0.005 ± 0.008	1.71	---	---	-	-	
Methyl palmitate	9.78	0.064 ± 0.049	0.029 ± 0.022	.	1.59	0.020 ± 0.017	0.003 ± 0.013	***	15.15
Unknown	9.94	0.013 ± 0.039	0.014 ± 0.016	*	0.45	---	---	-	-
Palmitic acid	10.00	0.220 ± 0.269	0.292 ± 0.337	0.55	---	---	-	-	
Ethyl palmitate	10.15	0.101 ± 0.092	0.095 ± 0.058	0.71	0.033 ± 0.030	---	***	-	
2-Pentadecylfuran	10.26	0.007 ± 0.016	0.029 ± 0.032	*	0.25	---	---	-	-
Unknown	10.36	0.012 ± 0.015	0.011 ± 0.016	0.58	---	---	-	-	
Linoleyl methyl ketone	10.66	<b>0.063 ± 0.128</b>	<b>0.333 ± 0.241</b>	***	0.16	0.013 ± 0.026	0.182 ± 0.081	***	0.20
Unknown	10.77	---	---	-	-	0.022 ± 0.020	0.063 ± 0.047		1.00
Methyl linolenate	10.81	0.031 ± 0.028	0.034 ± 0.018	*	0.57	0.027 ± 0.025	0.008 ± 0.022	**	7.08
Phytol	10.88	0.642 ± 0.364	0.731 ± 0.397	**	0.62	0.119 ± 0.057	0.137 ± 0.074	***	2.86
Linolenyl methyl ketone	10.96	0.176 ± 0.466	0.080 ± 0.047	*	0.93	---	---	-	-
Linolenic acid	11.06	1.708 ± 1.654	1.991 ± 1.659	*	0.58	0.287 ± 0.367	1.350 ± 2.154		0.81
Linoleic ethyl ester	11.18	0.502 ± 0.457	0.400 ± 0.232	0.85	0.096 ± 0.091	0.021 ± 0.047	**	13.58	
Avocadofuran1	11.27	<b>0.269 ± 0.324</b>	<b>0.935 ± 0.526</b>	***	0.24	0.049 ± 0.068	0.486 ± 0.325	**	0.41
Unknown	11.50	0.048 ± 0.069	0.043 ± 0.033	0.92	---	---	-	-	
Avocadofuran2	11.68	0.083 ± 0.151	0.094 ± 0.068	**	0.48	---	---	-	-
Nonadecane <sup>a</sup>	11.89	0.075 ± 0.094	0.026 ± 0.017	3.61	0.029 ± 0.029	0.212 ± 0.114	**	0.38	
Butanolide2a	12.00	---	---	-	-	<b>0.004 ± 0.010</b>	<b>0.139 ± 0.068</b>	***	0.06
Unknown	12.05	0.038 ± 0.050	0.006 ± 0.012	*	3.39	---	---	-	-
Unknown	12.09	0.042 ± 0.065	0.050 ± 0.033	*	0.62	---	---	-	-
Unknown	12.14	0.009 ± 0.017	0.021 ± 0.011	**	0.39	---	---	-	-
Butanolide2b	12.18	---	---	-	-	<b>0.082 ± 0.090</b>	<b>1.588 ± 0.779</b>	***	0.16
Unknown	12.25	0.042 ± 0.045	0.025 ± 0.010	1.07	---	---	-	-	
Unknown	12.42	1.077 ± 1.944	0.369 ± 0.566	1.69	0.020 ± 0.030	0.047 ± 0.057		1.19	
Unknown	12.43	---	---	-	-	0.023 ± 0.087	0.303 ± 1.172		0.26
Unknown	12.46	0.700 ± 0.827	0.877 ± 1.689	0.73	---	---	-	-	

Obtusilactone A	12.65	---	---	-	-	0.005 ± 0.010	0.167 ± 0.115	***	0.07
Unknown	12.69	0.104 ± 0.158	0.078 ± 0.047	.	0.86	---	---	-	-
Acetogenin	12.76	<b>0.360 ± 0.612</b>	<b>1.639 ± 0.994</b>	***	0.16	<b>0.041 ± 0.047</b>	<b>0.576 ± 0.194</b>	***	0.21
Isoobtusilactone A	12.87	---	---	-	-	0.042 ± 0.041	0.540 ± 0.401	***	0.27
Pentadecane <sup>a</sup>	12.94	<b>0.053 ± 0.087</b>	<b>0.195 ± 0.119</b>	***	0.25	0.069 ± 0.047	0.366 ± 0.135	**	0.51
Unknown	13.02	0.395 ± 0.736	0.378 ± 0.202	**	0.55	0.040 ± 0.033	0.052 ± 0.050	.	2.76
Unknown	13.13	<b>0.028 ± 0.042</b>	<b>0.077 ± 0.053</b>	***	0.26	---	---	-	-
Acetogenin	13.17	---	---	-	-	<b>0.017 ± 0.029</b>	<b>0.408 ± 0.239</b>	***	0.12
Acetogenin289	13.55	<b>0.925 ± 1.458</b>	<b>1.790 ± 1.083</b>	**	0.34	0.044 ± 0.061	0.710 ± 0.615	***	0.18
Acetogenin	13.85	<b>0.130 ± 0.231</b>	<b>0.442 ± 0.254</b>	***	0.21	---	---	-	-
Heptacosane <sup>a</sup>	13.89	0.143 ± 0.185	0.260 ± 0.159	***	0.37	<b>0.279 ± 0.165</b>	<b>2.085 ± 0.569</b>	***	0.39
Octacosane <sup>a</sup>	14.36	0.267 ± 0.407	0.180 ± 0.190		1.24	0.158 ± 0.079	0.346 ± 0.149	**	1.34
Squalene	14.56	0.240 ± 0.273	0.235 ± 0.150	*	0.86	0.196 ± 0.378	0.198 ± 0.129		3.54
Nonacosane <sup>a</sup>	14.87	<b>0.291 ± 0.400</b>	<b>0.654 ± 0.369</b>	***	0.30	1.246 ± 0.667	4.978 ± 1.490	.	0.77
Unknown	14.92	---	---	-	-	0.290 ± 0.250	0.953 ± 1.473		1.03
Triacosane <sup>a</sup>	15.43	---	---	-	-	0.130 ± 0.066	0.235 ± 0.172	*	1.72
Unknown	15.74	---	---	-	-	0.144 ± 0.119	0.651 ± 0.224	*	0.63
γ-tocopherol	15.98	0.298 ± 0.196	0.186 ± 0.123		1.19	---	---	-	-
Hentriacontane <sup>a</sup>	16.09	<b>0.134 ± 0.177</b>	<b>0.287 ± 0.163</b>	***	0.34	0.803 ± 1.479	0.790 ± 0.384	**	2.38
α-tocopherol	16.58	0.887 ± 0.734	0.452 ± 0.209		1.36	0.281 ± 0.205	0.062 ± 0.054	***	12.42

Mann-Whitney U test p-values: (\*\*\*) p<0.001, (\*\*) p<0.01, (\*) p<0.05, (·) p<0.1

Numbers in bold had VIP-Scores>1.5 on PLS-DA

<sup>a</sup> Identification confirmed by pure standard injection

--- Undetected

Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) showed a clear difference between GC-MS chemical profiles of leaves and trunk (cambium) tissues of Creole and Hass avocado saplings [Fig. 3].

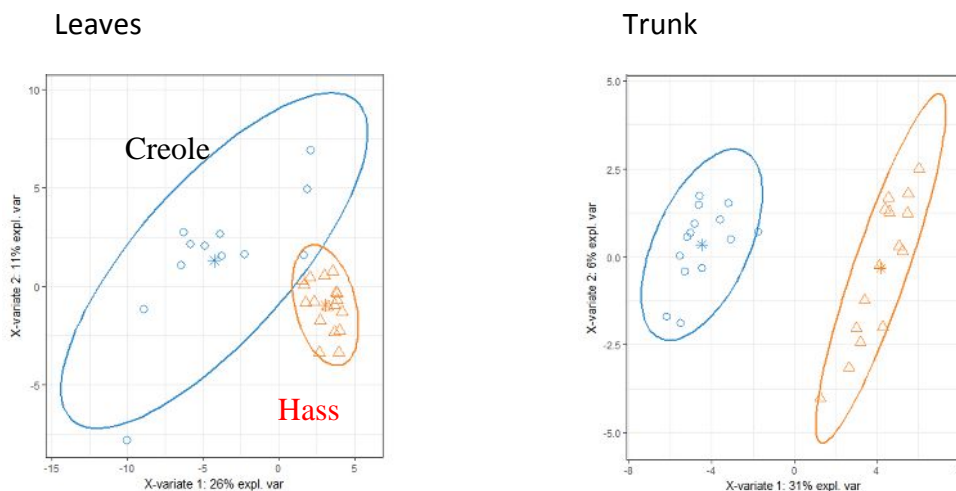


Fig.3. PLS-DA plots for leaves and bark GC-MS chemical profiles from Creole (circles) and Hass (triangles) avocados. *Left*: leaves ( $Q^2=0.5$   $R^2=0.47$ ,  $AUC=0.82$ ); *right*: bark ( $Q^2=0.90$ ,  $R^2=0.88$ ,  $AUC=1$ ).

The most discriminant compounds from leaves or trunk ( $VIP\text{-score} \geq 1.5$ ) are listed on Table 1. In addition, results of pair-wise comparisons using Mann-Whitney U test between Hass and Creole saplings and C/H concentration ratio are also listed in Table 1, for leaf and trunk compounds.

#### *Compounds relation with ABB preference or performance*

Partial least squares regression allowed to identify the sets of compounds among a mix of correlated compounds that more probably explains differential ABB preference or performance (Fig. 4). Later, the selected sets of compounds were included on multiple linear models that explore relations (negative or positive) with performance parameters.

For adult feeding preference, the optimized model including the following compounds: fatty acid derived compound (RT: 9.73),  $\alpha$ -tocopherol, estragole, unknown acetogenin (RT: 13.85), unk comp. (RT: 13.13), acetogenin (RT: 12.76), hexadecanoic acid methyl ester, and avocadofuran (RT: 11.27) gave a significant relationship (Table 2).

For larvae performance only larvae weight gave a statistic significant optimized multiple linear model considering the following compounds: Linoleyl methyl ketone,  $\alpha$ -humulene, linolenic acid methyl ester, germacrene D, verimol I, butanolides 3 y 3a (Table 3).

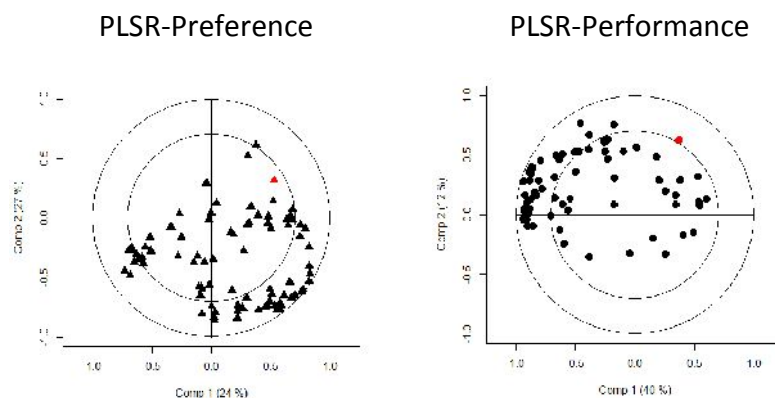


Figure 4. Plot of PLSR showing correlations between branch compounds ABB parameters: *Left*) adult feeding punctures; *Right*) larvae weight. Variables within circles denote high correlations among variables, black icons are avocado compounds, and red icons are ABB parameters.

Table 2. Results of optimized multiple linear model explaining ABB preference using compounds selected through PLSR.

	coefficients	significance
intercept	$1.2 \times 10^{-4}$	
unkn comp. (RT: 9.73)	0.437	*
$\alpha$ -tocopherol	0.617	***
estragole	0.556	**
acetogenin (RT: 13.85)	0.772	.
unkn comp. (RT: 13.13)	-0.576	**
acetogenin (RT: 12.76)	-0.405	
methyl palmitate	0.335	
model fit (adjusted R <sup>2</sup> )	0.54	**

Explanatory variables included in the model were selected based on variable of importance for projection (VIP) scores (VIP > 0.80) from PLSR, which provide a measure of the amount of variation explained by each independent variable.  
p-values: (\*\*\*) p<0.001, (\*\*) p<0.01, (\*) p<0.05, (·) p<0.1

Table 3. Optimized multiple linear model explaining ABB performance using compounds selected through PLSR.

	coefficients	significance
intercept	$-2.2 \times 10^{-5}$	
linoleyl methyl ketone	0.902	**
$\alpha$ -humulene	0.473	.
methyl linolenate	0.441	*
germacrene D	-0.993	*
verimol I	-0.354	*
butanolide 3	0.936	.
butanolide 3a	-1.104	
model fit (adjusted R <sup>2</sup> )	0.741	**

Explanatory variables included in models were selected based on variable of importance for projection (VIP) scores (VIP > 0.80) from PLSR, which provide a measure of the amount of variation explained by each independent variable  
p-values: (\*\*\*) p<0.001, (\*\*) p<0.01, (\*) p<0.05, (·) p<0.1

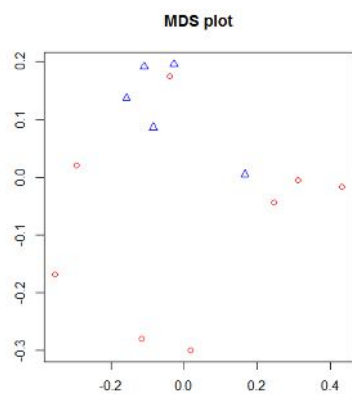
### *Avocados trunk induced response*

To explore induced response to ABB larvae infestation, random forest analysis (RFA) was developed comparing trunk chemical composition of trees with mechanical damage and trees artificially infested. Analysis for Creole and Hass avocados were developed separately. RFA showed a good separation between borer-infested (BI) and mechanical damage (MD) for Hass avocado but no for Creole. The most important compounds according RFA are showed in Figures 4a and 4b for Creole and Hass, respectively.

On Creole avocados, four compounds showed significant changes between mechanical damage and borer infested saplings. Only the peak corresponding to Eucalyptol/ocimene mixture (coelution) showed a significant increase (8.8-fold) on borer infested trees; in contrast, obtusilactone A and  $\alpha$ -cubebene mean concentrations decreased significantly 8.9 and 3.5-fold, while p-cymene was suppressed until not be detectable on borer infested trees (Table 4).

Regarding Hass avocado only seven compounds were statistically significant between mechanical damage and ABB infested saplings. Four increased on its mean proportion: squalene 2.1 fold, nonadecane 8.8 fold, unknown compounds (RT= 15.74) 1.6 fold; and unknown (RT: 12.42) was produced exclusively on infested trees; while tree compounds decreased 10, 1.8 and 1.7 fold: 5-methyl-1-Undecene, acetogenin2 (RT= 13.17) and linoleyl methyl ketone respectively (Table 5).

a) Creole avocado



b) Hass avocado

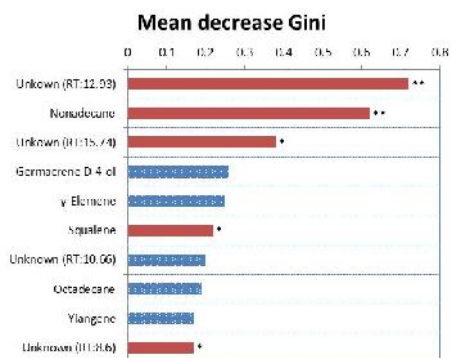
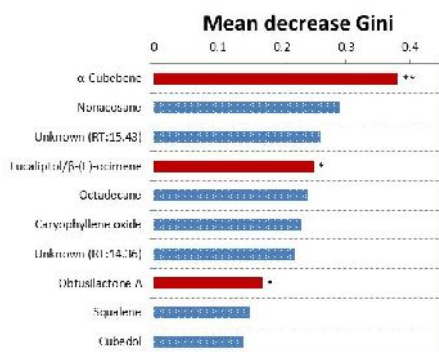
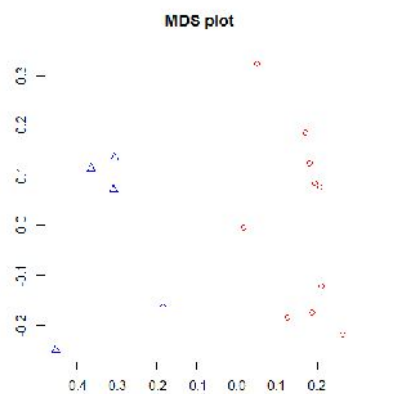


Fig.4. Random forest results from comparison of chemical profiles with mechanical damaged or borer infested avocado saplings from Creole (A) or Hass (B) varieties. Metric dimensional scaling representation of Creole and Hass avocado saplings based on GC-chemical profiles. Mechanical damage (triangles), borer infested (circles). Below (C-D): Contribution of the most important compounds to treatment separation. Solid bars and asterisks denote compounds with significant differences on Man-Whitney U test (Table S1-S2). The mean decrease in Gini coefficient is a measure of how each variable contributes to the nodes purity (0= homogeneous; 1= heterogeneous) and leaves in the resulting random forest.



Table 4. Mean proportions from Creole trunk compounds with major importance on random forest analysis between of borer infested and mechanical damaged avocado trees.

Creole	Compounds proportion (mean $\pm$ SD)	
	Mechanical damage (n=5)	Bored (n=8)
$\alpha$ -cubebene	<b>0.36 <math>\pm</math> 0.09</b>	<b>0.11 <math>\pm</math> 0.16</b>
Nonacosane	11.24 $\pm$ 3.73	18.25 $\pm$ 8.40
Triacontane	1.29 $\pm$ 0.54	1.91 $\pm$ 0.83
Eucalyptol/ocimene	<b>0.04 <math>\pm</math> 0.10</b>	<b>0.46 <math>\pm</math> 0.34</b>
octadecane	3.45 $\pm$ 1.21	5.73 $\pm$ 2.44
Caryophyllene oxide	1.48 $\pm$ 0.56	2.11 $\pm$ 0.75
Octacosane	1.38 $\pm$ 0.82	1.99 $\pm$ 0.47
Obtusilactone A	<b>0.40 <math>\pm</math> 0.42</b>	<b>0.03 <math>\pm</math> 0.08</b>
Squalene	0.86 $\pm$ 0.75	1.50 $\pm$ 1.40
Cubedol	0.87 $\pm$ 0.49	0.95 $\pm$ 0.36
p-cymene	<b>0.11 <math>\pm</math> 0.17</b>	<b>Undetected</b>

Letters in bold mean statistical differences in Mann-Whitney U test

Table 5. Mean proportions from Hass trunk compounds with major importance on random forest analysis between of borer infested and mechanical damaged avocado trees

Hass	Compounds proportion (mean $\pm$ SD)	
	Mechanical damage (n=5)	Bored(n=10)
pentadecane	<b>Undetected</b>	<b>0.23 <math>\pm</math> 0.18</b>
nonadecane	<b>0.15 <math>\pm</math> 0.16</b>	<b>1.32 <math>\pm</math> 0.53</b>
unk 15.74	<b>0.59 <math>\pm</math> 0.17</b>	<b>0.98 <math>\pm</math> 0.48</b>
germacrene-D-4-ol	0.48 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.17
$\gamma$ -elemene	0.69 $\pm$ 0.25	0.88 $\pm$ 0.16
squalene	<b>0.51 <math>\pm</math> 0.15</b>	<b>1.11 <math>\pm</math> 0.73</b>
linoleyl methyl ketone	<b>1.37 <math>\pm</math> 0.50</b>	<b>0.81 <math>\pm</math> 0.33</b>
hentriacontane	3.82 $\pm$ 1.18	3.27 $\pm$ 0.75
ylangene	0.38 $\pm$ 0.25	0.48 $\pm$ 0.10
5-methyl-1-Undecene	<b>0.20 <math>\pm</math> 0.13</b>	<b>0.02 <math>\pm</math> 0.08</b>
acetogenin 13.17	<b>2.94 <math>\pm</math> 1.36</b>	<b>1.62 <math>\pm</math> 0.81</b>

Letters in bold mean statistical differences in Mann-Whitney U test

## Discussion

We demonstrated that avocado variety affects branch borer adults feeding preference and larvae performance quite probably through their chemical differences. Feeding preference and larvae performance were higher in the original host, the Creole avocado, than Hass. These results agree with the preference-performance hypothesis, which establishes that when insect larvae are unable to reallocated themselves, insect females, select hosts for oviposition where their progeny has a better performance (Gripenberg et al., 2010; Jaenike, 1978); this behavior is stronger for oligophagous and monophagous than polyphagous insects (Gripenberg et al., 2010). Avocado branch borer fulfills some of these conditions: larvae are concealed, adults are bad flyers, and females feed on the

same tissue as their larva (Gripenberg et al., 2010). However, we cannot discard the possibility that Hass avocado has higher concentrations of oviposition stimulants than creole avocado despite of its low quality for ABB.

#### *Host chemical differences*

Creole and Hass avocado trees were chemically different hosts for ABB in their branch and leaf composition. Creole and Hass trunk volatiles share 74 compounds and 6 are exclusive to Creole variety. On the other hand, Creole and Hass leaves chemical profiles share 56 compounds and 8 are exclusive to Creole and 3 are exclusive to Hass avocado. The concentrations of shared compounds, relative and absolute, were very different as was showed on Mann-Whitney U test and PLS-DA (Fig 1).

However, not all compounds differing between avocado varieties are necessarily associated with ABB host choice and larval performance. To unravel relations among compounds with ABB preference or performance entangled within complex chemical profiles, partial least squares analysis, and multiple linear modeling were applied.

#### *Host chemistry and ABB adults feeding preference*

ABB preferred to feed on its original host, Creole avocado tree, despite that insects used in our experiments were obtained from Hass avocado trees. Indeed, ABB preferred to feed on young than mature Creole avocado leaves. The comparison between GC-MS chemical profiles from young (Y) and mature (M) Creole leaves showed significant differences on three compounds; in young leaves relative concentration of linolenic acid ( $Y=3.5 \pm 4.6$ ,  $M=13.7 \pm 4.6$ ) and phytol ( $Y=2.41 \pm 1.07$ ,  $M=4.3 \pm 1.98$ ) were lower than in mature leaves, but, the methyl palmitate ( $Y= 0.4 \pm 0.21$ ,  $M= 0.2 \pm 0.05$ ), was higher in young than in mature ones.

We hypothesized that linolenic acid acts as a feeding deterrent (Städler & Hanson, 1978) and/or that avocado induced response is higher on mature than young Creole leaves, since linolenic acid is directly related to the jasmonate pathway induced defense (Li et al., 2016). Probably, adult insects feed on mature leaves until deterrent compounds are produced and then insects relocate themselves to feed on young less responsive leaves.

Additionally, the ABB adult preference for young Creole leaves could be explained for physical factors too, for example, young leaves are softer and thinner than mature ones, in contrast with Hass avocado which young and mature leaves are similar in hardness and thickness (C. M. *personal observation*). Probably, creole avocado young leaves are more palatable and more nutritive than mature leaves as has been shown in other plants (Ikonen, 2020).

Multivariate analysis (PLSR and MLM) showed that four compounds are positively correlated with ABB adult feeding preference. One of these compounds is estragole, the main component of Creole avocado volatile compounds (King & Knight, 1992). According to phytochemical coevolutionary theory compounds (such as estragole) that are toxins for unadapted generalist herbivorous insects, are also attractants for specialized insects (Cornell & Hawkins, 2003) and could serve as clues to locate high-quality hosts. In this sense, the positive correlation between feeding punctures and the antioxidant compound  $\alpha$ -tocopherol (Fraenkel & Blewett, 1946) could be an indicator of host nutritional quality. On the other hand, the unknown compound RT: 13.13 could be a feeding deterrent.

#### *Host chemistry and ABB larvae performance*

Regarding the relationship between trunk chemistry and larval performance four compounds were positively correlated with larval weight gain: Linoleyl methyl ketone, methyl linolenate,  $\alpha$ -humulene and butanolide 3 (the last two marginally). The  $\alpha$ -humulene is the unique volatile compound positively correlated with ABB larvae weight gain, thus it could be an indicator of host quality for ABB since  $\alpha$ -humulene is an attractant of some bark and wood borers (Crook et al., 2008; Kendra et al., 2011; Yasui et al., 2007). This supposition is supported by previous results where  $\alpha$ -humulene concentration increased in ABB infested branches in comparison with undamaged Hass avocado branches from the same tree (Meléndez-González & Espinosa-García, 2018). The remaining compounds positively correlated with larvae performance were lipid derivatives, so they could be feeding stimulants or have nutritional value for ABB larvae.

Butanolide 3, one of the majoritarian compounds in branches was previously linked to ABB preference, trees with high amounts of that compound were infested later than their neighbors, suggesting a negative relation with oviposition preference and/or detrimental effects on ABB larvae (Meléndez-González & Espinosa-García, 2018). However, according to our results, a detrimental effect on larval development is not supported, therefore, the effect of butanolide 3 on ABB oviposition preference should be further studied.

Instead, verimol I (absent in Hass trunks) and germacrene D were negatively correlated with larvae weight gain, they are probably feeding deterrents or toxic for ABB larvae. Germacrene D had been reported as a feeding deterrent against Lepidoptera (Kiran, Reddy, et al., 2006) and mosquito larvae (Kiran, Bhavani, et al., 2006). In fact, in our experiment, the avocado tree harboring the heaviest larva (outlier datum) had an undetectable amount of germacrene D while the rest of volatile compounds had similar concentration found in the other studied trees.

#### *Avocado trees induced response*

The main goal of our experiment about the induced response to herbivory was to establish which of the related compounds with ABB preference or performance are

constitutively expressed. For that reason, the experiment was focused to determine induced chemical changes as mean values of the tree groups (MD vs BI) instead of before-after approach. A previous study about Hass avocado tree induced response to ABB larvae infestation showed that sixteen terpenoids and fatty acids increased concentration while fatty acid derivatives (acetogenins, butanolides and avocadofurans) were reduced. This pattern was hypothesized how an unspecific response to ABB borer because this weevil is a relatively new pest for Hass avocado. Thus, it was expected that the induced response would be specific on the native host, Creole avocado, changing specific volatile compounds related to parasitoids attraction or diminishing ABB performance. The pattern previously reported for Hass avocado was not observed in our experiment, probably because the previous study compared undamaged versus borer infested branches, and in ours, we compare mechanically damaged branches with borer infested ones.

In general, the induced response of Hass and Creole sapling avocados were qualitative and quantitatively different, but contrary to our expectation, Hass avocado showed more compounds changes and stronger compound's concentration-response than creole avocado contrary to our expectation. Probably, Creole avocado induced response is disarmed by ABB larvae.

In summary, ABB preference and performance were affected by avocado varieties, there was great differences between Hass and Creole chemistry, and the effect of chemistry was more pronounced on ABB adults feeding preference. On the other hand, the effect of avocado genotype on ABB larvae weight gain was only significant ignoring an outlier; and variety had no significant effect on gallery length. However, avocado host chemistry could affect ABB performance.

Overall, few compounds from one hundred probably affected avocado branch borer, some of them affecting positively and negatively adults feeding preference and some others affecting larvae performance. But the largest effect was on feeding preference probably for the presence of informative and nutritional compounds and low presence of antinutritive or toxic compounds. Our results agree with the preference-performance hypothesis and the neural constraints hypothesis in which informative compounds (nontoxic as many volatiles) determine the choice of host with high nutritional quality. Compounds correlated with ABB adult feeding and compounds correlated with ABB larvae performance were chemically different in agreement with results obtained for other specialized weevils (Lee et al., 2016), because specialist insects are well adapted to compounds that are toxins for non-adapted insects.

Another interesting result is that several chemically different compounds were related to ABB preference or performance, suggesting that avocado defense acts through combinations of compounds that affect different development stages of *Copturus*

*aguacatae* in agreement with the multibarrier hypothesis, as found for another avocado pest (Torres-Gurrola et al., 2011).

Apparently, avocado branch borer has not had enough time to adapt to new host chemistry, and the weevil severely affects Hass avocado orchards mainly because the preferred host, Creole avocado, is becoming scarcer. The high feeding preference for Creole avocado trees could be used to develop pest management strategies where Creole avocados planted on Hass orchard's edge could serve to monitor the arrival of ABB, and to design and develop bait tramps.

## References

- Becerra, J. X. (1997). Insects on plants: macroevolutionary chemical trends in host use. *Science* (New York, N.Y.), 276(5310), 253–256. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.253>
- Berenbaum, M. R., & Zangerl, A. R. (1996). Phytochemical Diversity. Adaptation or random variation? In J. T. Romeo, J. A. Saunders, & P. Barbosa (Eds.), *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions* (Vol. 11, pp. 1–24). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6_1)
- Bergh, B., Scora, R., & Storey, W. (1973). A comparison of leaf terpenes in *Persea* subgenus *Persea*. *Botanical Gazette*, 134(2), 130–134. <http://www.jstor.org/stable/2473702>
- Bertheau, C., Brockerhoff, E. G., Roux-Morabito, G., Lieutier, F., & Jactel, H. (2010). Novel insect-tree associations resulting from accidental and intentional biological “invasions”: A meta-analysis of effects on insect fitness. *Ecology Letters*, 13(4), 506–515. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01445.x>
- Bost, J. B., Smith, N. J. H., & Crane, J. H. (2013). *The Avocado, Botany, Production and Uses* 2nd Edition. In: *The Avocado: botany, production and uses*. <https://doi.org/10.1079/9780851993577.0000>
- Bravo-Monzón, A. E., & Espinosa-García, F. J. (2008). Volatile emissions in *Persea americana* in response to the stem borer *Copturus aguacatae* attack. *Allelopathy Journal*, 21(1), 165–174.
- Bravo-Monzón, Á. E., Ríos-Vásquez, E., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2016). Differential herbivory of the specialist beetle *Stolas punicea* on chemical phenotypes of its host *Mikania micrantha*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3), 419–425. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1118436>

- Brückner, A., & Heathoff, M. (2017). A chemo-ecologists' practical guide to compositional data analysis. *Chemoecology*, 27(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s00049-016-0227-8>
- Bustos-Segura, C., Külheim, C., & Foley, W. (2015). Effects of Terpene Chemotypes of *Melaleuca alternifolia* on Two Specialist Leaf Beetles and Susceptibility to Myrtle Rust. *Journal of Chemical Ecology*, 41(10), 937–947. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0628-0>
- Cheng, D., Van der Meijden, E., Mulder, P. P. J., Vrieling, K., & Klinkhamer, P. G. L. (2013). Pyrrolizidine Alkaloid Composition Influences Cinnabar Moth Oviposition Preferences in *Jacobaea* Hybrids. *Journal of Chemical Ecology*, 39(3), 430–437. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0257-4>
- Cheng, D., Vrieling, K., & Klinkhamer, P. G. L. (2011). The effect of hybridization on secondary metabolites and herbivore resistance: implications for the evolution of chemical diversity in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10, 107–117. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9194-9>
- Cornell, H. V., & Hawkins, B. A. (2003). Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *The American Naturalist*, 161(4), 507–522. <https://doi.org/10.1086/368346>
- Crook, D. J., Khrimian, A., Francese, J. A., Fraser, I., Poland, T. M., Sawyer, A. J., & Mastro, V. C. (2008). Development of a host-based semiochemicals lure for trapping emerald ash borer *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Environmental Entomology*, 37(2), 356–365. [https://doi.org/10.1603/0046-225X\(2008\)37](https://doi.org/10.1603/0046-225X(2008)37)
- Fraenkel, G., & Blewett, M. (1946). The role of linoleic acid, alpha-tocopherol and other fat-soluble substances in the nutrition of an insect (*Ephestia kuehniella* Lep.). *Biochemical Journal*, 40(2), xxii.
- García-Rodríguez, Y. M., Torres-Gurrola, G., Meléndez-González, C., & Espinosa-García, F. J. (2016). Phenotypic variations in the foliar chemical profile of *Persea americana* Mill cv Hass. *Chemistry & Biodiversity*, 13(12), 1767–1775. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600169>
- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M., & Roslin, T. (2010). A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. *Ecology Letters*, 13(3), 383–393. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01433.x>

- Ikonen, A. (2002). Preferences of six leaf beetle species among qualitatively different leaf age classes of three Salicaceous host species. *Chemoecology* 12, 23–28. <https://doi.org/10.1007/s00049-002-8323-3>
- Jaenike, J. (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical Population Biology*, 14(3), 350–356. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(78\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(78)90012-6)
- Kendra, P. E., Montgomery, W. S., Niogret, J., Peña, J. E., Capinera, J. L., Brar, G., Epsky, N. D., & Heath, R. R. (2011). Attraction of the Redbay Ambrosia Beetle, *Xyleborus glabratus*, to Avocado, Lychee, and Essential Oil Lures. *Journal of Chemical Ecology*, 37(9), 932–942. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9998-0>
- King, J. R., & Knight, R. J. (1992). Volatile components of the leaves of various avocado cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(7), 1182–1185. <https://doi.org/10.1021/jf00019a020>
- Kiran, R. S., Bhavani, K., Devi, S. P., Rao, R. B. R., & Reddy, J. K. (2006). Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresource Technology*, 97(18), 2481–2484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.003>
- Kiran, R. S., Reddy, S. A., Devi, S. P., & Reddy, J. K. (2006). Insecticidal, antifeedant and oviposition deterrent effects of the essential oil and individual compounds from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Pest Management Science*, 62, 1116–1121. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Kuzina, V., Ekstrøm, C. T., Andersen, S. B., Nielsen, J. K., Olsen, C. E., & Bak, S. (2009). Identification of defense compounds in *Barbarea vulgaris* against the herbivore *Phyllotreta nemorum* by an ecometabolomic approach. *Plant Physiology*, 151(4), 1977–1990. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136952>
- Lee, G., Joo, Y., Diezel, C., Lee, E. J., Baldwin, I. T., & Kim, S. G. (2016). Trichobaris weevils distinguish amongst toxic host plants by sensing volatiles that do not affect larval performance. *Molecular Ecology*, 25(14), 3509–3519. <https://doi.org/10.1111/mec.13686>
- Li, T., Cofer, T., Engelberth, M., & Engelberth, J. (2016). Defense priming and jasmonates: A role for free fatty acids in insect elicitor-induced long distance signaling. *Plants*, 5(1), 145–169. <https://doi.org/10.3390/plants5010005>

- Lozano-Gutiérrez, J., España-Luna, M. P., Balleza-Cadengo, J. J., & Liñan-Quiroz, B. M. (2015). Biodiversidad de coleópteros en árboles de aguacate de Aramberri, Nuevo León, México. *Entomología Mexicana*, 2, 392–396.
- Luna, A., López-Martínez, V., Pérez-De la O, N. B., Jiménez-García, D., Jones, R. W., Castañeda-Vildozola, Á., & Ruiz-Montiel, C. (2017). Actual and Potential Distribution of Five Regulated Avocado Pests Across Mexico, Using the Maximum Entropy Algorithm. *Florida Entomologist*, 100(1), 92–100. <https://doi.org/10.1653/024.100.0114>
- Meléndez-González, C., & Espinosa-García, F. J. (2018). Metabolic profiling of *Persea americana* cv. Hass branch volatiles reveals seasonal chemical changes associated to the avocado branch borer, *Copturus aguacatae*. *Scientia Horticulturae*, 240, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.003>
- Moore, B., Andrew, R., Külheim, C., & Foley, W. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201, 733–750. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12526/full>
- Muñiz, V. R. (1959). *Copturus aguacatae* Kissinger, plaga del aguatero (*Persea gratissima* Gaertn.) en México. *Acta Zoologica Mexicana*, III(3), 1–35.
- Murphy, S. M., & Feeny, P. (2006). Chemical facilitation of a naturally occurring host shift by *Papilio machaon* butterflies (Papilionidae). *Ecological Monographs*, 76(3), 399–414. <https://doi.org/10.1177/026858090602100310>
- Niogret, J., Epsky, N. D., Schnell, R. J., Boza, E. J., Kendra, P. E., & Heath, R. R. (2013). Terpenoid Variations within and among Half-Sibling Avocado Trees, *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073601>
- Nishida, R. (2014). Chemical ecology of insect-plant interactions: Ecological significance of plant secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.877836>
- Orians, C. M. (2000). The Effects of hybridization in Plants on Secondary Chemistry: Implications for the Ecology and Evolution of Plant-Herbivore Interactions. *American Journal of Botany*, 87(12), 1749–1756. <https://doi.org/10.2307/2656824>
- Rodríguez-López, C. E., Hernández-Brenes, C., & Díaz de la Garza, R. I. (2015). A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *RSC Advances*, 5(128), 106019–106029. <https://doi.org/10.1039/C5RA22854A>



- Salazar-garcía, S., & Bolio-garcía, J. M. (1992). Damage Caused by Avocado Branch Weevil (*Copturus aguacatae* Kiss.) in 'Fuerte' Avocado Trees in Atlixco, Puebla, Mexico. Proceedings of the 2nd World Avocado Congress, 269.
- Sánchez, S., Mijares, P., López, L., & Barrientos, A. (2001). Historia del aguacate en México. In Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX S. C. (Issues 1998–2001). [http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex\\_1998-2001/CICTAMEX\\_1998-2001\\_PG\\_171-187.pdf](http://www.avocadosource.com/journals/cictamex/cictamex_1998-2001/CICTAMEX_1998-2001_PG_171-187.pdf)
- Städler, E., & Hanson, F. E. (1978). Food discrimination and induction of preference for artificial diets in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Physiological Entomology*, 3(2), 121–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1978.tb00142.x>
- Torres-Gurrola, G., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (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* (Triozidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2011.01.011>
- Wheeler, G. S. (2006). Chemotype variation of the weed *Melaleuca quinquenervia* influences the biomass and fecundity of the biological control agent *Oxyops vitiosa*. *Biological Control*, 36(2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.10.005>
- Yasui, H., Yasuda, T., Fukaya, M., Akino, T., Wakamura, S., Hirai, Y., Kawasaki, K., Ono, H., Narahara, M., Kousa, K., & Fukuda, T. (2007). Host plant chemicals serve intraspecific communication in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology*, 42(2), 255–268. <https://doi.org/10.1303/aez.2007.255>

***Persea americana* intraspecific phytochemical variation correlates with adult feeding preference and larvae performance from the avocado branch borer, *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae).**

**Claudio Meléndez-González<sup>1</sup>, Guillermo Delgado-Lamas<sup>2</sup>, Ek del Val-de Gortari<sup>3</sup> y Francisco J. Espinosa-García<sup>4\*</sup>**

<sup>1</sup>*Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, México;*

<sup>2</sup>*Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán C.P. 04510, Cd de Mx;*

<sup>3</sup>*Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, México.*

Corresponding author contact: [espinosa@iies.unam.mx](mailto:espinosa@iies.unam.mx); Phone number: 443-3222721

## Supplementary information

### *Branch (cambium) avocado metabolites putative identification*

#### *Verimol I and dehydro verimol I identification*

Peak with retention time 8.61 min exhibited a molecular ion of 206 m/z and fragmentations M-31 (M-OCH<sub>3</sub>), M-43 (M-OCCH<sub>3</sub>) and M-59 (M-OOCCH<sub>3</sub>) that resemble estragole acetate mass spectrum. However, fragmentation pattern is very close to methoxy p-coumaryl alcohol acetate (verimol I) (Sy et al., 1998) predicted mass spectra reported by Allen y cols. (2016).

In a similar way, the peak with retention time 8.06 min exhibited a mass spectrum very close to peak RT=8.61 min, but with a molecular ion 208 m/z, two mass units more, suggesting the absence of a double bond. The fragment loss of M-60 m/z (an acetic acid molecule) result in an ion of 148 m/z that resemble the mass spectrum of estragole supporting our previous conjecture of methoxy p-coumaryl alcohol acetate for peak RT=8.61 min and dihydro methoxy p-coumaryl alcohol acetate for peak RT=8.06 min.

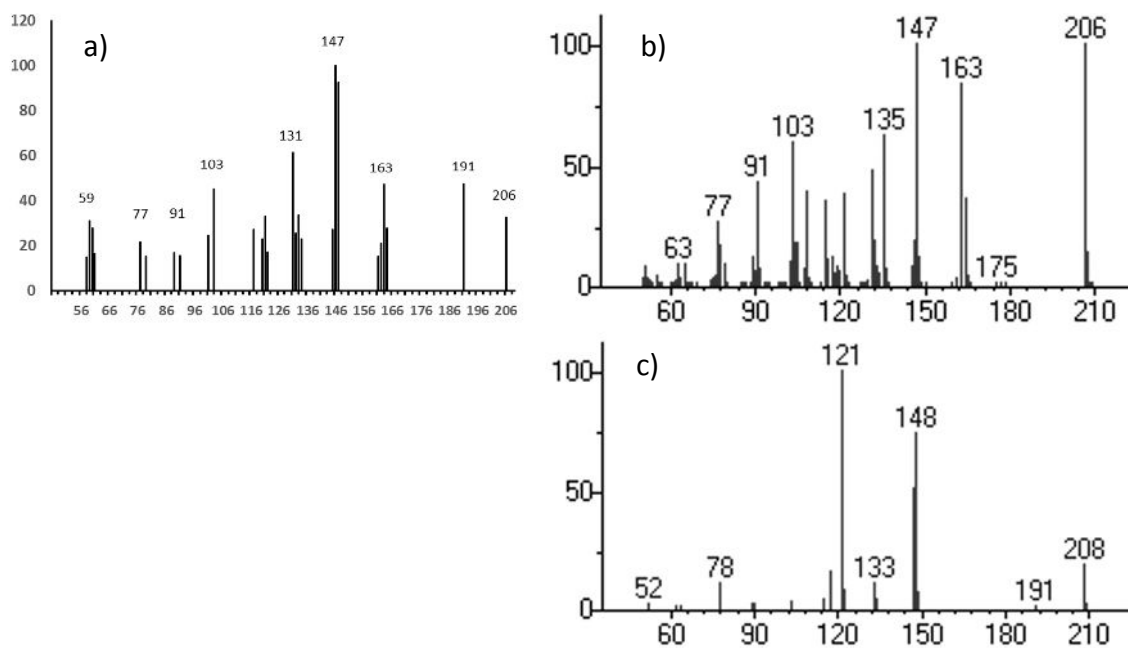


Figura 1. a) Calculated mass spectrum of verimol I (modified from Allen et al., 2016); b) Mass spectrum of peak RT= 8.61, putatively verimol I; c) Mass spectrum of peak RT=8.06, putatively dihydro verimol I.

## References

- Sy, L.-K., & Brown, G. D. (1998). Novel Phenylpropanoids and Lignans from *Illicium verum*. *Journal of Natural Products*, 61(8), 987–992. doi:10.1021/np9800553.

Allen, F., Pon, A., Greiner, R., Wishart, D. (2016) Computational Prediction of Electron Ionization Mass Spectra to Assist in GC/MS Compound Identification. *Anal Chem.* 2;88(15):7689-97. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01622

#### *Linoleyl methyl ketone and linolenyl methyl ketone identification*

The peak with RT 10.66 showed a molecular ion of 278 m/z (M<sup>+</sup>) and the primary loss of 263 (M-15), 235 (M-43) and 220 (M-58) suggest a molecule with a methyl ketone group, and the shape of the rest of mass spectrum resemble an unsaturated fatty acid, the formula C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O was proposed, which match with (10Z,13Z)-nonadeca-10,13-dien-2-one, a compound derivate from linoleic acid (Hanus et al 2012). The peak with RT=10.96 showed a molecular ion of 276, two mass units less than peak RT=10.66 and with the same fragmentation pattern of fatty methyl ketone, thus we assumed that peak RT= 10.96 is the linolenyl methyl ketone derivate.

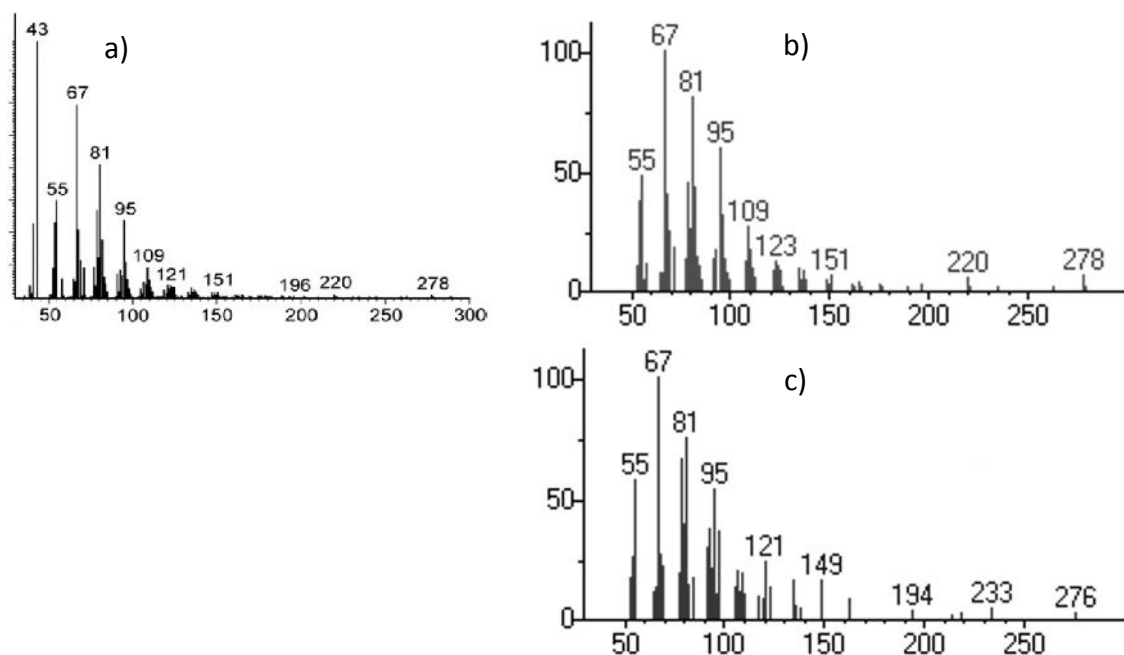


Figura 2. a) Mass spectrum of (10Z,13Z)-nonadeca-10,13-dien-2-one from Hanus et al., 2012; b) Mass spectrum from peak RT=10.66, putatively linoleyl methyl ketone; c) Mass spectrum of peak RT=10.96, putatively linolenyl methyl ketone.

#### Reference:

Hanus, R., Šobotník, J., Krasulova, J., Jiroš, P., Žáček, P., Kalinova, B., Dolejšova, K., Cvacka, J., Bourguignon, T., Roisin, Y., Lacey, M. J. & Sillam-Dusse, D. (2012). Nonadecadienone, a new termite trail-following pheromone identified in *Glossotermes oculatus* (Serritermitidae). *Chemical senses*, 37(1), 55-63.

## Capítulo 4

### **Ensayos iniciales para identificar compuestos del aguacate *Persea americana* cv. Hass afectando la preferencia del barrenador de las ramas del aguacatero, *Copturus aguacatae*, Kissinger**

#### **Resumen:**

*Copturus aguacatae* es un insecto especialista que afecta al cultivo del aguacate Hass. Los insectos adultos seleccionan ramas de entre 1 y 3 cm para ovipositar. Estudios previos muestran que hay una importante variación en los compuestos volátiles en ramas de diferente diámetro. Sin embargo, no se ha explorado la relación de esa variación con la preferencia de los insectos adultos o con el desempeño de las larvas. En el presente estudio se realizó un muestreo de ramas infestadas y se determinó tanto el peso de las larvas, así como el diámetro de las ramas para determinar si el diámetro de la rama está relacionado con el peso de las larvas (desempeño). Posteriormente se hicieron ensayos de preferencia con insectos adultos y segmentos de ramas de diferente diámetro. En seguida se relacionó el perfil de metabolitos secundarios determinado por GC-MS con la incidencia de larvas y la preferencia de alimentación. Posteriormente se extrajeron diferentes fracciones de metabolitos de las ramas de diámetro preferidas y se ensayó su actividad antialimentaria o fagoestimulante con insectos adultos. Los resultados confirman que las ramas de 1 a 2.5 cm son las más frecuentemente infestadas, pero no hubo diferencias significativas en el peso de las larvas en ramas de diferente diámetro lo cual sugiere una baja concentración de toxinas. El espatulenol fue el único compuesto que mostró una variación en armonía con la incidencia de larvas por lo que se propone como posible estimulante de la oviposición. En los experimentos de laboratorio, la preferencia de alimentación de hembras fue relacionada con la concentración de  $\alpha$ -copaeno y bergamoteno (posibles atrayentes), con una butanólida y un compuesto no identificado (posibles estimulantes). Por otra parte, se evaluó el efecto en la alimentación de tres fracciones con compuestos no volátiles, azúcares, fenoles y butanólidas. Los azúcares tuvieron un efecto estimulante de la alimentación de hembras del barrenador, los fenoles, catequina y ácido cafeico, mostraron un efecto disuasorio, mientras que las butanólidas no mostraron ningún efecto. Se propone que la preferencia de alimentación está determinada por la presencia de compuestos volátiles atrayentes (sesquiterpenos), fagoestimulantes (azúcares y otros compuestos) y por bajas concentraciones de compuestos disuasorios (fenoles).

## Introducción

El barrenador del tronco y ramas del aguacatero *Copturus aguacatae* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae) es un insecto especialista de las distintas variedades del aguacate y es una de las plagas cuarentenarias del cultivo de aguacate Hass (SENASICA-DGSV, 2016). Además, un insecto endémico de México del cual se desconoce su ecología química, no se han reportado feromonas sexuales o de agregación (Engstrand et al., 2010) ni tampoco alelomonas, por ejemplo, se desconocen los compuestos que utilizan para seleccionar a su hospedero. Los insectos adultos se alimentan de hojas y brotes tiernos mientras que las larvas perforan galerías en las ramas. Está reportado que la mayor incidencia de infestación ocurre en la ramas terciarias (1-3 cm de diámetro) (Coria et al., 2007) donde las hembras ovipositan en promedio 8 huevos a lo largo de un segmento de rama de 30 cm (Muñiz, 1959). También es posible encontrar larvas afectando ramas gruesas y el tronco, pero esto solo se ha observado en huertas con altos niveles de infestación (Coria et al., 2007).

A pesar de que el aguacate Hass es un cultivo clonal, se ha encontrado gran variación fitoquímica entre clones que ha sido correlacionada con la preferencia y desempeño del barrenador (Espinosa-García et al., 2001). Por ejemplo, entre clones de aguacate se observó que los árboles con mayor concentración de isoobtusilactona A y  $\alpha$ -humuleno fueron menos susceptibles a la infestación del barrenador ya que se mantuvieron libres de la plaga cuando árboles vecinos con menor concentración de estos compuestos estaban severamente infestados; aunque dos años más tarde fueron infestados (Meléndez-González & Espinosa-García, 2018). Lo anterior sugiere que estos compuestos actúan como disuasores, que afectan la preferencia de los insectos, pero no el desempeño de las larvas, posiblemente funcionando como repelentes o inhibidores de la oviposición.

En otro estudio donde se evaluó el efecto del genotipo (variedades criolla y Hass) y su composición química en la preferencia de alimentación y desempeño de las larvas se encontró que el mayor efecto de la química del hospedero fue sobre la preferencia de alimentación. Los insectos prefirieron alimentarse de árboles de aguacate con mayor concentración de compuestos volátiles como estragol y semi-volátiles como el  $\alpha$ -tocoferol, los cuales pueden estar funcionando como atrayentes e indicadores de la calidad nutricional del hospedero. Pero las butanólidas, compuestos mayoritarios de la fracción volátil, como la isoobtusilactona A, no estuvieron relacionadas con la preferencia o desempeño (Capítulo 4).

La preferencia de oviposición de *C. aguacatae* por ramas de 1-3 cm de grosor podría explicarse por la variación en el contenido de terpenoides atrayentes y compuestos estimulantes de la oviposición ya que algunos terpenoides incrementan de forma proximal-distal (de las hojas hacia el tronco) mientras que otros compuestos presentan un comportamiento opuesto. Por ejemplo, la abundancia de  $\beta$ -cariofileno disminuye

conforme aumenta el grosor de las ramas, mientras que la abundancia de  $\beta$ -cubebeno y  $\alpha$ -copaeno incrementa conforme aumenta el grosor de las ramas (Niogret, Epsky, Schnell, Boza, et al., 2013; Niogret, Epsky, Schnell, Schnell, et al., 2013). Sin embargo, la variación de los compuestos semivolátiles mayoritarios (acetogeninas, butanólidas y avocadofuranos) en ramas de diferente grosor no ha sido registrada. Por lo tanto, es de esperarse que haya combinaciones de compuestos (volátiles y semivolátiles) relacionados con el grosor de rama preferido para alimentare y/o para ovipositar. Además, si los MS de la rama afectan el desempeño de las larvas esperaríamos encontrar variación en el peso de las larvas obtenidas de ramas de diferente grosor.

Para tratar de dar respuesta a estas suposiciones se realizó un muestreo en campo en una huerta de aguacate Hass infestada por el barrenador y se tomaron muestras de ramas infestadas de diferente grosor, se extrajeron las larvas y se pesaron en busca de diferencias en peso relacionadas con el grosor de las ramas. Además, se analizaron muestras de ramas de diferente grosor sin daño para monitorear la variación de compuestos volátiles y semivolátiles por GC-MS. Posteriormente se realizaron tres experimentos con insectos adultos. Primero, ensayos de alimentación con elección usando segmentos de ramas de diferente grosor; segundo, ensayos de alimentación sin elección con discos de papel donde se aplicaron diferentes componentes de las ramas para identificar compuestos fagoestimulantes y disuasorios; y tercero, ensayos de olfatometría para identificar compuestos volátiles atrayentes o repelentes.

## **Materiales y métodos**

### *Colecta de ramas con larvas*

Se colectaron ramas de una huerta de aguacate Hass Enel municipio de Villa Madero(, Michoacán (N 19°21'59.9"; W 101°16'0.02") que presentaban las secreciones blanquecinas características del daño ocasionado por las larvas del barrenador (Coria et al., 2007). Se tomaron 30 segmentos de ramas provenientes de 5 árboles y se transportaron al laboratorio. En el laboratorio el diámetro de las ramas se obtuvo con un vernier y luego fueron disectadas con ayuda de una navaja para obtener las larvas y pesarlas.

### *Obtención de extractos*

Se colectaron ramas de aguacate (sin daño) de 1-5 cm de grosor, se separó la corteza y el cambium con una navaja. Este material se secó en horno a 75° C por dos días. Se realizó una maceración con 500 ml acetona x 2 días y se repitió 3 veces. El extracto acetónico se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida. El residuo semisólido color vede oscuro se disolvió en la mínima cantidad de acetona y se sometió a un proceso de partición con agua-acetato de etilo. La fase acuosa se concentró lo más que se pudo a presión reducida y el residuo se dejó secar a

temperatura ambiente. La fase orgánica se concentró y posteriormente se sometió a un proceso de partición con metanol-hexano. Ambas fases se concentraron a presión reducida. Se obtuvieron tres fracciones: acuosa, metanólica y hexánica. Posteriormente, 50 mg de la fracción hexánica se sometieron a cromatografía en capa fina preparativa (hexano-acetato de etilo, 40:1 eluida dos veces) de acuerdo a la literatura (Chen et al., 2008). Se rasparon 2 bandas, una de las cuales contenía las butanólicas (corroborado por GC-MS).

#### *Análisis de los extractos*

Las tres fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía de gases. 3 mg de la fracción hexánica se disolvieron en 1 ml de hexano. Las fracciones más polares se sometieron a un proceso de silanización para obtener su perfil químico. 5 mg de cada fracción fueron disueltas en 50  $\mu$ l de piridina y se les agregaron 15  $\mu$ l de BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 20 minutos con agitación ocasional. 1  $\mu$ l de cada muestra se inyectó al cromatógrafo de gases. Las condiciones de análisis están reportadas en (Meléndez-González & Espinosa-García, 2018).

#### *Colecta de insectos adultos*

Los insectos adultos se obtuvieron colectando segmentos de ramas de aguacate en la temporada de lluvias. Las ramas seleccionadas presentaban daño ocasionado por el barrenador en años anteriores. Se almacenaron en una caja de cartón forrada con hule y con una tapa de organza. Diariamente se colectaban los adultos que iban emergiendo, eran sexados y colocados en contenedores separados (machos y hembras). Los insectos se mantuvieron con algodones humedecidos y hojas o ramas de aguacate Hass como alimento. Antes de utilizarlos en un ensayo se privaron de alimento por 48 horas.

#### *Bioensayos*

##### *Ensayo con segmentos de ramas*

Se evaluó la preferencia de hembras del barrenador hacia segmentos de ramas de diferente grosor. Se cortaron segmentos de ramas de grosor 0.7 mm, 10 mm y 20 mm y de longitud 5cm. Los bordes de las ramas fueron protegidos con parafilm para evitar la desecación. Tres segmentos de rama (uno de cada grosor) fueron colocados en contenedores de plástico donde se liberaron 6 hembras adultas que habían sido dejadas sin alimento por 48 hrs. Al cabo de 36 horas, bajo el microscopio (Leica Zoom 2000) con aumento de 40x, se contó el número de horadaciones de alimentación. El ensayo se realizó por triplicado.



### *Ensayo en disco de papel*

Se implementó un bioensayo de alimentación con discos de papel filtro donde se adicionaron las fracciones a probar. Discos de papel filtro de 6 mm de diámetro fueron lavados con metanol-acetona y secado en un horno a 75 °C por 24 horas. En contenedores individuales se colocó un disco de papel con 10 µl de una solución de 5 mg/ml las fracciones acuosa, metanólica, y de butanólidas. Como control se aplicaron 10 µl de los solventes utilizados (hexano y acetato de etilo). En cada contenedor se colocó una hembra y se evaluó la preferencia de 16 insectos. Al cabo de 48 horas se retiraron los insectos y los discos de papel. Estos últimos se digitalizaron con una cámara fotográfica bajo el microscopio (Leica Zoom 2000) a 40x para visualizar el daño. Se calculó el porcentaje de área raspada con el programa ImageJ.

### *Ensayos de olfatometría*

Los ensayos de olfatometría se realizaron con un tubo de vidrio con forma de “Y”. En cada uno de los brazos se colocó una fuente de olor o control (aire limpio). Se hizo pasar aire limpio y humidificado a un flujo de 40 ml/min. Por el extremo anterior del olfatómetro se liberó un insecto adulto (hembras o macho) con 24 horas de ayuno y se monitoreo su elección por algunos de los olores durante 5 min. Si el insecto se mantuvo más de 1 min en uno de los brazos se consideró como una elección positiva y se detuvo el experimento antes de concluir los 5 min. Los olfatómetros se lavaron después de cada ensayo con acetona y se hornearon por 5 min a 110 °C. Cada insecto se utilizó solo una vez por ensayo.

### *Análisis estadísticos*

En relación al peso de las larvas se comparó el promedio del peso de las larvas obtenidas de ramas de 0.5, 1, 1.5 y 2 cm de grosor con una prueba de ANOVA transformando los datos de conteos a raíz cuadrada. El número de picaduras (transformadas a raíz cuadrada) realizadas en secciones de ramas de diferente grosor, y el área consumida entre tratamientos del ensayo de alimentación con discos de papel también se analizaron por medio de ANOVAs. Para identificar los compuestos que principalmente difieren entre ramas de diferente grosor. El análisis discriminante se realizó con el paquete Mass para identificar los compuestos que principalmente difieren entre ramas de diferente grosor. Los resultados de olfatometría se evaluaron con la prueba binomial. Todos los análisis se desarrollaron en el software R ver 3.4.1.

## **Resultados y discusión**

### *Relación entre el diámetro de las ramas y la incidencia de larvas*

La distribución del diámetro de las ramas infestadas por el barrenador de las ramas muestra que las ramas con un diámetro de entre 1.5 y 2.5 cm son mayoritariamente

infestadas (Fig. 1). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el peso de las larvas en función del diámetro de las ramas ( $F_{(4;61)}= 2.0361$ ;  $p > 0.1$ ), sugiriendo la ausencia de compuestos que afectan el desempeño de las larvas y reforzando la idea de que los compuestos que estimulan la oviposición deben estar presentes en mayor concentración en ese tipo de ramas.

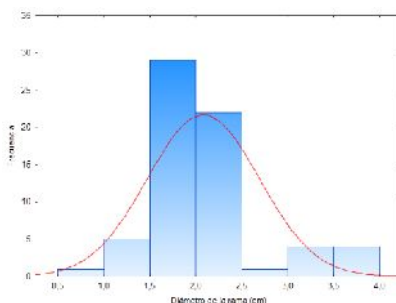


Figura 1. Histograma de frecuencia de larvas del barrenador encontradas en ramas de diferente grosor.

### *Relación entre el diámetro de ramas y preferencia de alimentación de insectos adultos*

Los análisis de preferencia de alimentación se realizaron únicamente con insectos hembra debido a que en un ensayo preliminar en el que se evaluó la preferencia de alimentación de hembras y machos hacia discos de hojas de aguacate Criollo y Hass no se encontraron diferencias significativas en el área consumida entre los tipos de hojas, pero si entre hembras y machos. Estos últimos consumieron 5 veces más tejido que las hembras (Figura 2). Posiblemente las hembras son mucho más sensibles a los fitoquímicos del aguacate ya que son ellas quienes determinan el sitio para ovipositar.

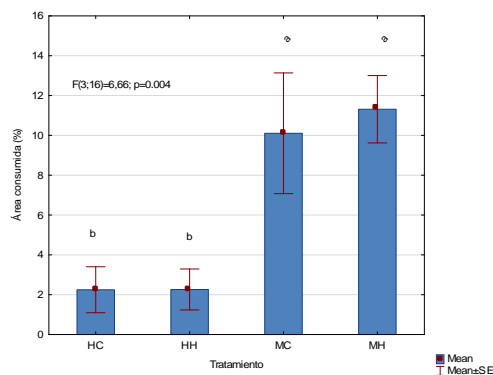


Figura 2. Ensayo de preferencia de alimentación entre machos y hembras de *C. aguacatae* con discos de hojas de aguacate criollo o Hass. H= hembras, M= machos; C= criollo, H= Hass. Las proporciones se transformaron a arco-seno para el análisis estadístico.

### *Ensayo de preferencia de alimentación con ramas de diferente diámetro*

Se ha reportado que la mayor infestación del barrenador ocurre en las ramas terciarias (crecimiento vegetativo del año anterior) con un grosor de 1-3 cm (Coria et al., 2007). Por lo tanto, se realizó un experimento de elección con hembras del barrenador para evaluar su preferencia hacia ramas de diferente diámetro (5, 10 y 20 mm) y posteriormente relacionarlo con la composición química de las ramas. El experimento muestra que de entre las ramas ofrecidas, las hembras prefieren alimentarse de aquellas con un diámetro de 1 cm y además muestran una tendencia particular en cuanto a la preferencia para alimentarse, las ramas de 2 cm tuvieron la menor preferencia y las de 5 mm preferencia intermedia (Figura 3), lo cual podría estar relacionado con la concentración de algunos metabolitos atrayentes o estimulantes.

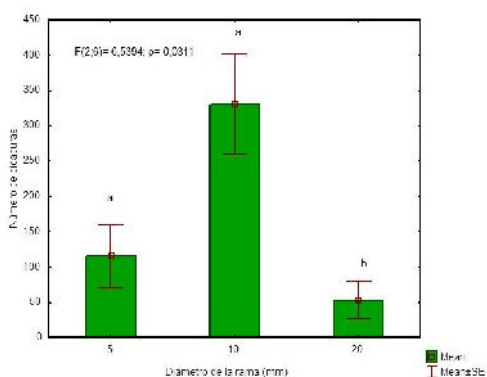


Figura 3. Resultados del ensayo de preferencia de hembras del barrenador hacia segmentos de rama de diferente diámetro. Los datos fueron transformados a raíz cuadrada para el análisis. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas en una prueba Tukey,  $p < 0.05$ ; media  $\pm$  error estándar.

### *Variación de los perfiles químicos de las ramas de diferente diámetro*

Posteriormente se obtuvieron los perfiles de compuestos volátiles por GC-MS de las ramas de diferentes diámetros. Los compuestos detectados coinciden con los reportados previamente (Meléndez-González & Espinosa-García, 2018) ver Tabla 1. De manera general, las acetogeninas y el avocadofurano disminuyen conforme aumenta el diámetro de las ramas, mientras que la mayoría de terpenoides aumentan como se observa en la Figura 4.

Tabla 1. Compuestos detectados por GC-MS en ramas de aguacate de diferente diámetro (promedio  $\pm$  desviación estándar).

RT (min)	Compuestos		Concentración (mg/g)			
	diámetro de la rama (mm)		5 (n=9)	10 (n=6)	15 (n=6)	20 (n=5)
3.30	-pineno		0.087 $\pm$ 0.050	0.090 $\pm$ 0.040	0.095 $\pm$ 0.041	0.081 $\pm$ 0.027
3.43	camfeno		0.024 $\pm$ 0.011	0.027 $\pm$ 0.012	0.030 $\pm$ 0.014	0.025 $\pm$ 0.006
3.59	-felandreno		0.009 $\pm$ 0.005	0.008 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.003	0.006 $\pm$ 0.002
3.64	-pineno		0.050 $\pm$ 0.031	0.042 $\pm$ 0.020	0.043 $\pm$ 0.018	0.036 $\pm$ 0.013
3.68	-mirceno+éster		0.046 $\pm$ 0.021	0.050 $\pm$ 0.021	0.053 $\pm$ 0.022	0.046 $\pm$ 0.016
3.83	-felandreno		0.145 $\pm$ 0.116	0.169 $\pm$ 0.084	0.181 $\pm$ 0.103	0.177 $\pm$ 0.124
3.98	p-cimeno		0.026 $\pm$ 0.020	0.037 $\pm$ 0.024	0.039 $\pm$ 0.014	0.036 $\pm$ 0.006
4.02	-(E)-ocimeno+limoneno		0.059 $\pm$ 0.038	0.069 $\pm$ 0.043	0.078 $\pm$ 0.040	0.059 $\pm$ 0.044
4.12	-(Z)-ocimeno <sup>a</sup>		<b>0.024<math>\pm</math>0.014</b>	<b>0.024<math>\pm</math>0.012</b>	<b>0.027<math>\pm</math>0.013</b>	<b>0.031<math>\pm</math>0.016</b>
6.38	-cubebeno		0.105 $\pm$ 0.066	0.092 $\pm$ 0.056	0.099 $\pm$ 0.029	0.063 $\pm$ 0.045
6.57	ylangene <sup>a, b</sup>		<b>0.054<math>\pm</math>0.014</b>	<b>0.082<math>\pm</math>0.033</b>	<b>0.082<math>\pm</math>0.009</b>	<b>0.070<math>\pm</math>0.023</b>
6.62	-copaeno		0.135 $\pm$ 0.071	0.164 $\pm$ 0.106	0.173 $\pm$ 0.044	0.130 $\pm$ 0.042
6.67	-cubebeno		0.071 $\pm$ 0.043	0.069 $\pm$ 0.046	0.074 $\pm$ 0.022	0.050 $\pm$ 0.039
6.69	dodecanal <sup>a</sup>		<b>0.018<math>\pm</math>0.017</b>	<b>0.033<math>\pm</math>0.015</b>	<b>0.048<math>\pm</math>0.010</b>	<b>0.035<math>\pm</math>0.034</b>
6.91	-cariofileno		0.410 $\pm$ 0.262	0.327 $\pm$ 0.230	0.333 $\pm$ 0.118	0.241 $\pm$ 0.152
7.14	-humuleno		0.054 $\pm$ 0.026	0.041 $\pm$ 0.030	0.045 $\pm$ 0.015	0.060 $\pm$ 0.056
7.18	sesquiterpeno desconocido		0.039 $\pm$ 0.028	0.016 $\pm$ 0.013	0.022 $\pm$ 0.022	0.018 $\pm$ 0.007
7.25	bergamoteno		0.031 $\pm$ 0.012	0.042 $\pm$ 0.023	0.043 $\pm$ 0.007	0.024 $\pm$ 0.020
7.30	germacreno D		0.899 $\pm$ 0.690	0.507 $\pm$ 0.423	0.448 $\pm$ 0.199	0.295 $\pm$ 0.254
7.31	tridecanal		0.087 $\pm$ 0.046	0.142 $\pm$ 0.061	0.162 $\pm$ 0.044	0.148 $\pm$ 0.071
7.40	-elemeno <sup>a</sup>		<b>0.075<math>\pm</math>0.032</b>	<b>0.113<math>\pm</math>0.087</b>	<b>0.143<math>\pm</math>0.052</b>	<b>0.127<math>\pm</math>0.066</b>
7.53	cubedol+cadinene <sup>b</sup>		<b>0.092<math>\pm</math>0.024</b>	<b>0.145<math>\pm</math>0.108</b>	<b>0.147<math>\pm</math>0.035</b>	<b>0.120<math>\pm</math>0.053</b>
7.90	germacren-D-4-ol <sup>b</sup>		<b>0.082<math>\pm</math>0.061</b>	<b>0.065<math>\pm</math>0.052</b>	<b>0.073<math>\pm</math>0.035</b>	<b>0.048<math>\pm</math>0.049</b>
7.93	espatulenol <sup>a, b</sup>		<b>0.013<math>\pm</math>0.018</b>	<b>0.042<math>\pm</math>0.038</b>	<b>0.065<math>\pm</math>0.031</b>	<b>0.064<math>\pm</math>0.021</b>
7.98	tetradecanal <sup>b</sup>		<b>0.438<math>\pm</math>0.242</b>	<b>0.692<math>\pm</math>0.235</b>	<b>0.751<math>\pm</math>0.118</b>	<b>0.526<math>\pm</math>0.360</b>
10.06	ácido hexadecanoico		0.359 $\pm$ 0.263	0.313 $\pm$ 0.191	0.422 $\pm$ 0.201	0.166 $\pm$ 0.160
10.94	fitol		0.165 $\pm$ 0.072	0.183 $\pm$ 0.049	0.184 $\pm$ 0.069	0.135 $\pm$ 0.052
11.15	ácido linoleico		0.656 $\pm$ 0.304	0.513 $\pm$ 0.237	0.701 $\pm$ 0.338	0.247 $\pm$ 0.247
11.33	avocadofurano <sup>b</sup>		<b>0.969<math>\pm</math>0.840</b>	<b>0.561<math>\pm</math>0.366</b>	<b>0.488<math>\pm</math>0.191</b>	<b>0.207<math>\pm</math>0.141</b>
11.81	butanolida 1 <sup>a, b</sup>		<b>0.072<math>\pm</math>0.043</b>	<b>0.181<math>\pm</math>0.091</b>	<b>0.218<math>\pm</math>0.155</b>	<b>0.191<math>\pm</math>0.112</b>
12.25	butanolida 2 <sup>b</sup>		<b>0.957<math>\pm</math>0.557</b>	<b>1.633<math>\pm</math>0.307</b>	<b>1.728<math>\pm</math>0.863</b>	<b>0.851<math>\pm</math>0.412</b>
12.76	acetogenina 1 <sup>a, b</sup>		<b>0.632<math>\pm</math>0.354</b>	<b>0.222<math>\pm</math>0.119</b>	<b>0.204<math>\pm</math>0.098</b>	<b>0.093<math>\pm</math>0.080</b>
12.94	butanolida 3 <sup>a, b</sup>		<b>0.578<math>\pm</math>0.351</b>	<b>1.746<math>\pm</math>0.738</b>	<b>1.631<math>\pm</math>1.112</b>	<b>1.670<math>\pm</math>1.191</b>
13.02	desconocido <sup>b</sup>		<b>0.268<math>\pm</math>0.185</b>	<b>0.481<math>\pm</math>0.123</b>	<b>0.428<math>\pm</math>0.271</b>	<b>0.169<math>\pm</math>0.139</b>
13.55	acetogenina 2 <sup>a, b</sup>		<b>1.627<math>\pm</math>1.049</b>	<b>0.501<math>\pm</math>0.207</b>	<b>0.517<math>\pm</math>0.174</b>	<b>0.214<math>\pm</math>0.137</b>
13.95	heptacosano		0.727 $\pm$ 1.012	0.524 $\pm$ 0.330	0.415 $\pm$ 0.141	0.370 $\pm$ 0.271

14.21	-sitosterol	0.521±0.430	0.205±0.190	0.402±0.151	0.193±0.219
14.95	nonacosano	1.178±1.262	1.065±0.303	0.998±0.251	0.905±0.605

<sup>a</sup> Diferencias significativas en prueba Kruskal-Wallis usando conc. relativa

<sup>b</sup> Diferencias significativas en prueba Kruskal-Wallis usando conc. absoluta

Numbers in black indicate compounds showing significant differences

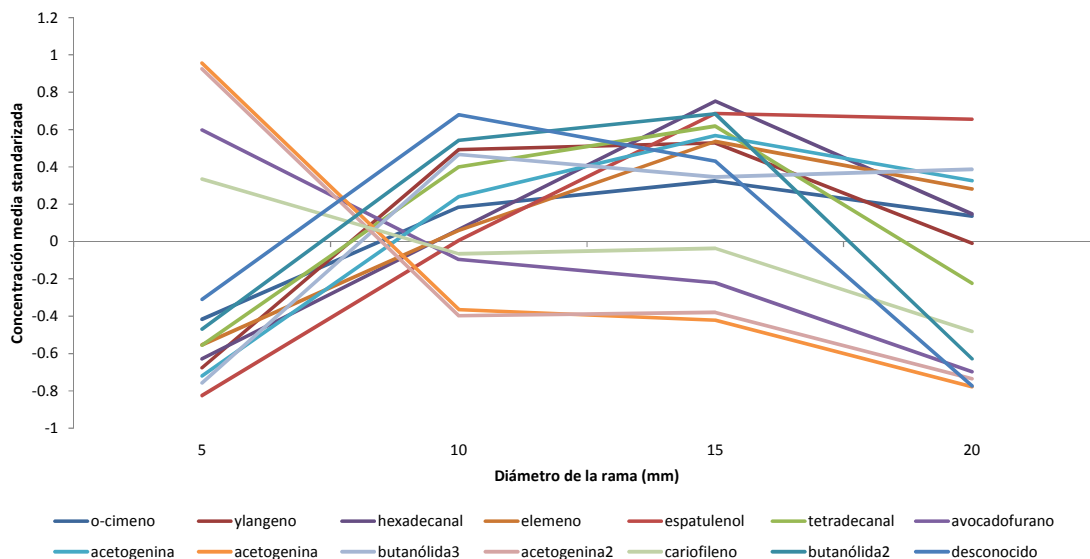


Figura 4. Variación en las proporciones medias de los compuestos detectados por GC-MS en ramas de diferente diámetro que mostraron diferencias estadísticas significativas (Prueba de Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).

### *Relación de la incidencia de larvas con los fitoquímicos de las ramas*

La mayor incidencia de larvas en ramas de 1.5 a 2.5 cm se puede explicar por la presencia de compuestos que estimulan la oviposición. Esperaríamos que los compuestos con posible actividad estimulantes se encuentren en mayor concentración en las ramas en las que mayor número de larvas se encontraron. De todos los compuestos detectados en nuestro estudio únicamente el sesquiterpeno espatulenol mostró una variación en la concentración acorde a incidencia de larvas, mostrando diferencias significativas entre las ramas de diferente diámetro (KW- $H_{(3,26)}$ : 12.89;  $p < 0.01$ ). Sin embargo, no hay reportes previos de este sesquiterpeno que lo relacionen con la actividad estimuladora de la oviposición.

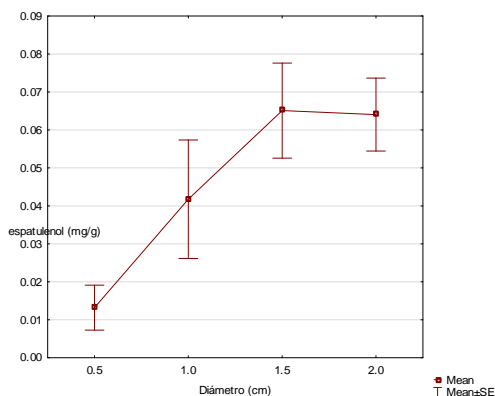


Figura 5. Variación en la concentración de espatulenol en ramas de diferente diámetro

### *Relación entre la preferencia alimentación con los fitoquímicos de las ramas*

El mayor número de orificios de alimentación se reportó en las ramas de 1 cm, seguido por las ramas de 0.5 cm y luego las de 2 cm. Si hay compuestos químicos involucrados en este comportamiento esperaríamos encontrar compuestos que sigan esta misma tendencia. Se encontraron cuatro compuestos que presentan este comportamiento:  $\alpha$ -copaeno, bergamoteno, butanólida 2 y un compuesto no identificado. Sin embargo, solamente los dos últimos compuestos presentaron diferencias estadísticas significativas.

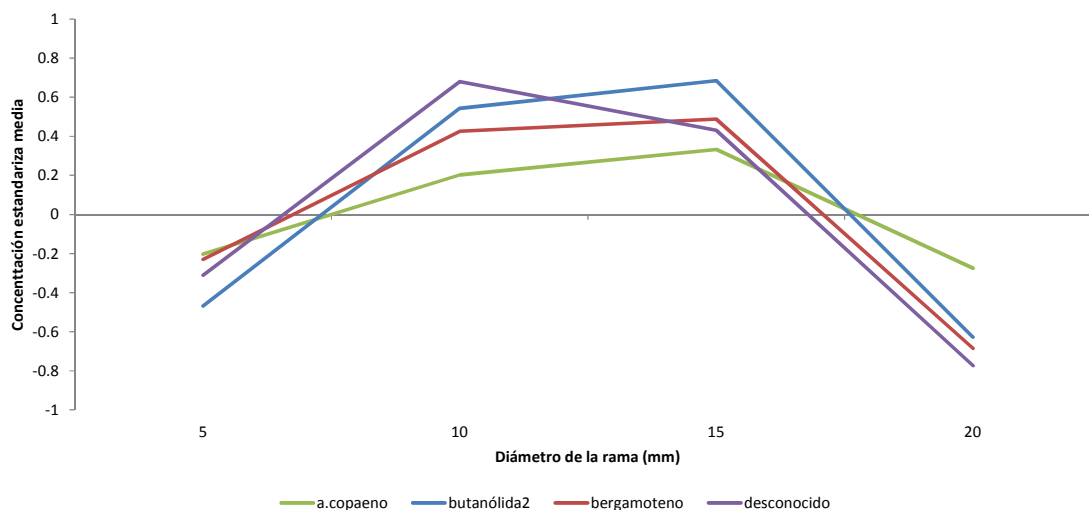


Figura 6. Concentraciones estandarizadas medias de compuestos que muestran un patrón similar a la preferencia de alimentación en ramas de diferente diámetro.

Posteriormente se estudió el posible efecto de las butanólidas mayoritarias de la fracción volátil, así como otros componentes en la preferencia de alimentación de los insectos

adultos. Para generar una fracción enriquecida con las butanólidas se preparó un extracto total de la corteza de ramas frescas que se fraccionó en tres, una fracción soluble en agua, otra soluble en metanol y otra soluble en hexano. De la fracción hexánica se derivó una fracción enriquecida con las butanólidas, que junto con la fracción metanólica y acuosa se evaluó su efecto en la preferencia de alimentación con insectos adultos y se analizó su composición química por GC-MS.

### Composición de las fracciones de la rama

Los perfiles químicos obtenidos por cromatografía de gases permitieron identificar a los azúcares como los componentes mayoritarios de la fracción soluble en agua, y catequina. Mientras que la fracción metanólica estuvo compuesta por fenoles, una mezcla de catequina y epicatequina, isoobtusilacona A y ácido cafeico. Mientras que la fracción enriquecida con butanólidas mostró a la isoobtusilactona A (identificación parcial) como componente mayoritario (Figura 7).

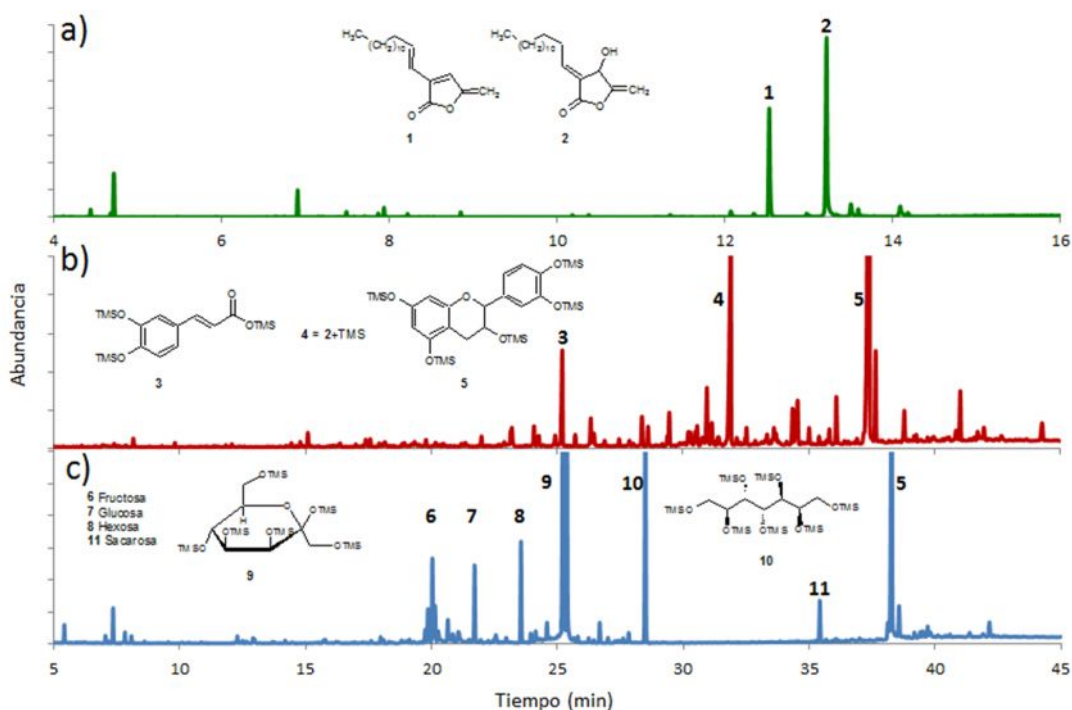


Fig. 7. Perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas de las ramas de aguacate Hass cambium: a) Fracción rica en butanólidas, b) Fracción soluble en metanol, c) Fracción soluble en agua.

### *Efecto de los componentes de la rama sobre la conducta de alimentación de hembras del barrenador*

Posteriormente se realizó un ensayo de alimentación forzada (sin elección) usando discos de papel filtro y evaluando el efecto de las tres fracciones obtenidas de las ramas. Los resultados muestran diferencias significativas entre el control y los tratamientos. Los azúcares mostraron un efecto fagoestimulante, mientras que los fenoles mostraron un ligero efecto disuasivo de la alimentación, en tanto que la fracción rica en butanólicas no mostró ningún efecto (Figura 8).

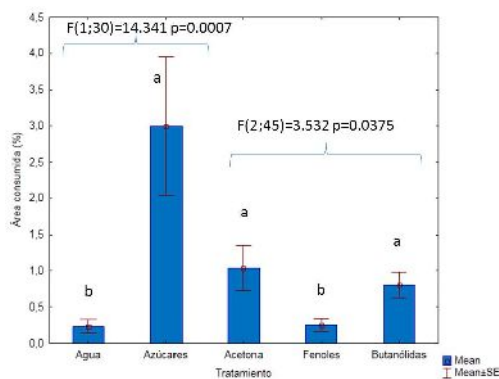


Figura 8. Resultados de ensayos de alimentación (sin elección) con hembras de *C. aguacatae*.

### *Ensayos de olfatometría*

Adicionalmente se evaluó el efecto de los volátiles emitidos por hojas, peciolo y ramas en la atracción de hembras y machos en ensayos de olfatometría. Los resultados muestran que ni las hembras ni los machos fueron atraídos por los compuestos volátiles de diferentes tejidos del aguacate o bien estos insectos no son aptos para ensayos de olfatometría (Figura 9).



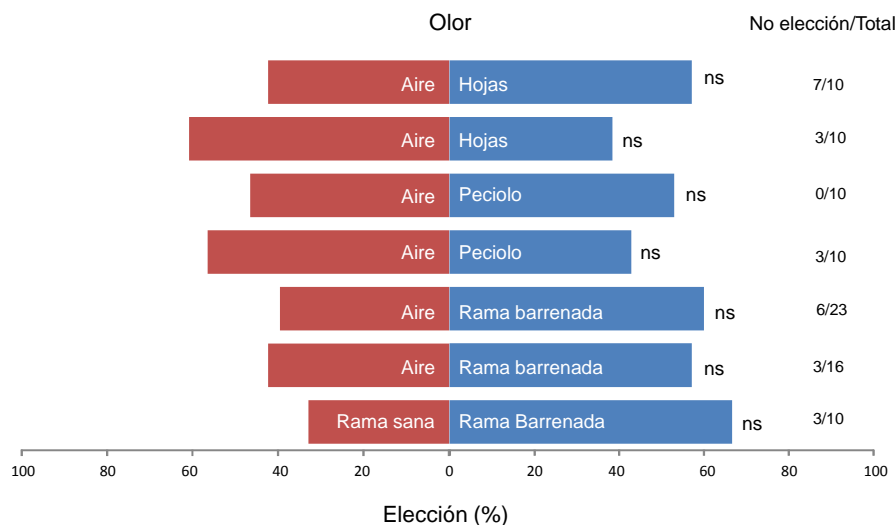


Figura 9. Resultados de los experimentos elección en olfactómetro de dos vías con insectos adultos (hembras y machos) del barrenador de las ramas a diferentes fuentes de olor.

## Conclusión

Los resultados de estudios preliminares refuerzan los resultados encontrados en los trabajos previos donde se encontró un mayor efecto del tipo genotipo y los fitoquímicos del hospedero sobre la preferencia de alimentación más que sobre el desempeño del barrenador de las ramas del aguacatero.

El espatulenol fue el único compuesto volátil de las ramas que pudiera estar relacionado con la preferencia de oviposición fungiendo como atrayente o estimulante. Esta es una suposición que debe ser probada experimentalmente.

Por otra parte, cuatro compuestos fueron relacionados con la preferencia de alimentación, dos de ellos son sesquiterpenos volátiles ( $\alpha$ -copaeno y bergamoteno), cuales podrían tener actividad atrayente de los insectos adultos del barrenador. El  $\alpha$ -copaeno, por ejemplo, es uno de los compuestos atrayentes de *Xyleborus glabratus*, una de las plagas del aguacate (Kendra et al., 2011). Mientras que la butanólida 2 y el compuesto desconocido (RT: 13.02) son de naturaleza no volátil a temperatura ambiente, por lo que su variación podría estar relacionada con un efecto estimulante de la alimentación. Sin embargo, la fracción que contenía las butanólidas no mostró actividad fagoestimulante. Posiblemente la mezcla de varios componentes es la que presenta la actividad estimulante.

Finalmente, la preferencia de alimentación por ramas de 1 cm puede estar relacionada con la presencia tanto de compuestos volátiles atrayentes, azúcares estimulantes y bajo contenido de fenoles disuasorios en una combinación particular. Esta suposición requiere estudios posteriores para ser probada.

## Referencias

- Chen, C. Y., Chen, C. H., Lo, Y. C., Wu, B. N., Wang, H. M., Lo, W. L., Yen, C. M., & Lin, R. J. (2008). Anticancer activity of isobutylacetone A from *Cinnamomum kotoense*: Involvement of apoptosis, cell-cycle dysregulation, mitochondria regulation, and reactive oxygen species. *Journal of Natural Products*, 71(6), 933–940. <https://doi.org/10.1021/np070620e>
- Coria, V., Pescador, A., Lezama, R., Salgado, R., López, M., Vidales, A., & Muñoz, J. (2007). Autoecology of Avocado Stem weevil *Copturus aguacatae* Kissinger (Coleoptera: Curculionidae) in Michoacan, Mexico. *Proceedings of the VI World Avocado Congress*, 12–16.
- Engstrand, R. C., Cibrián Tovar, J., Cibrián-Jaramillo, A., & Kolokotronis, S.-O. (2010). Genetic variation in avocado stem weevils *Copturus aguacatae* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Mitochondrial DNA*, 21 Suppl 1(December), 38–43. <https://doi.org/10.3109/19401736.2010.536226>
- Espinosa-García, F. J., García-Rodríguez, Y. M., Chávez Zavala, A., & Delgado-Lamas, G. (2001). Implicaciones de la variación en los fenotipos químicos de las poblaciones de plantas en su susceptibilidad a las plagas y patógenos: el caso de *Persea americana* var. Hass. *Memorias Del 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano Del Aguacate*, 46–57.
- Kendra, P. E., Montgomery, W. S., Niogret, J., Peña, J. E., Capinera, J. L., Brar, G., Epsky, N. D., & Heath, R. R. (2011). Attraction of the Redbay Ambrosia Beetle, *Xyleborus glabratus*, to Avocado, Lychee, and Essential Oil Lures. *Journal of Chemical Ecology*, 37(9), 932–942. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9998-0>
- Meléndez-González, C., & Espinosa-García, F. J. (2018). Metabolic profiling of *Persea americana* cv. Hass branch volatiles reveals seasonal chemical changes associated to the avocado branch borer, *Copturus aguacatae*. *Scientia Horticulturae*, 240, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.003>
- Muñiz, V. R. (1959). *Copturus aguacatae* Kissinger, plaga del aguatero (*Persea gratissima* Gaertn.) en México. *Acta Zoologica Mexicana*, III(3), 1–35.
- Niogret, J., Epsky, N. D., Schnell, E. Q., Schnell, R. J., Heath, R. R., Meerow, A. W., & Kendra, P. E. (2013). Analysis of Sesquiterpene Distributions in the Leaves, Branches, and Trunks of Avocado (*Persea americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences*, 4(4), 922–931. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.44114>

- Niogret, J., Epsky, N. D., Schnell, R. J., Boza, E. J., Kendra, P. E., & Heath, R. R. (2013). Terpenoid Variations within and among Half-Sibling Avocado Trees, *Persea americana* Mill. (Lauraceae). PLoS ONE, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073601>
- SENASICA-DGSV. (2016). Barrenador del tronco y ramas del aguacate, *Copturus aguacatae*, Kissinger, 1957 (Coleoptera: Curculionoidea) (pp. 8–12). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Dirección General de Sanidad Vegetal – Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria- Grupo Especialista Fitosanitario. Ficha Técnica.

## Capítulo 5

### Discusión general

El origen de la enorme diversidad de metabolitos secundarios producidos por las plantas y la variación de los mismos en sus distintos niveles espaciales y temporales continúa siendo un tema poco estudiado (Richards et al., 2015). Aunque hay sólida evidencia de que las interacciones entre las plantas y sus consumidores (herbívoros y patógenos) ejercen una presión de selección sobre metabolitos secundarios específicos sigue sin ser claro cómo surge y se mantiene una alta diversidad y variación (Moore et al., 2014).

La hipótesis del barrido, por ejemplo, propone que la diversidad química se mantiene porque incrementa la posibilidad de que surja por mutación un metabolito efectivo y por lo tanto hay muchos metabolitos inactivos y pocos o uno activo contra los consumidores, pero sin dar explicación sobre la variación (Jones & Firn, 1991b). De esta forma la defensa vegetal se comporta como una barrera única que debe ser superada por el herbívoro. En el lado opuesto tenemos a la hipótesis coevolutiva que propone que los metabolitos secundarios son resultado de una escalada de defensas y contradefensas entre las plantas y sus herbívoros consumidores, en la cual unos metabolitos son efectivos contra unos herbívoros pero no contra otros, y viceversa (Berenbaum & Zangerl, 1996). Además, las interacciones aditivas y sinérgicas entre compuestos son resultado de la carrera armamentista, y su variación (en sus diferentes dimensiones) provee de nuevas combinaciones (Richards et al., 2016) o barreras que deben superar los herbívoros.

Sin embargo, la variación fitoquímica no siempre tiene un efecto perjudicial en los herbívoros, particularmente en los insectos especialistas (menor amplitud de dieta) se considera que están mejor adaptados a la química de su hospedero que los insectos herbívoros generalistas (mayor amplitud de dieta) y por lo tanto son menos afectados por los fitoquímicos (Cornell & Hawkins 2003). Se ha reportado que la variación fitoquímica a nivel de clones, quimiotipos o híbridos a veces tiene un efecto perjudicial en los insectos especializados (Wheeler et al., 2006; Cheng et al., 2013), pero a veces no (Kuzina et al., 2009; Bustos-Segura et al., 2015; Bravo-Monzón et al., 2016). Por lo tanto, el primer capítulo de esta tesis se presenta una revisión de literatura sobre los efectos de la variación fitoquímica sobre insectos herbívoros con diferente amplitud de dieta. Se revisaron las hipótesis de coevolución fitoquímica, las limitaciones neuronales y las interacciones tritróficas y sus principales predicciones. Esta revisión nos muestra que

cuando ocurre la carrera armamentista entre plantas e insectos herbívoros la escalada de defensas y contra defensas no se limita a la producción de un reducido grupo de compuestos con actividad antiherbívoro (toxinas) en las plantas y enzimas detoxificadoras en los herbívoros que sino que se diversifica debido a las interacciones con el tercer nivel trófico y a las diferencias en procesamiento de información entre insectos especialistas y generalistas para evaluar la calidad de su planta hospedera. De tal forma que la diversidad y variación en compuestos volátiles es una forma de evitar que los insectos herbívoros reconozcan la combinación de compuestos que representa a su planta hospedera, además que también pueden servir como señal de alarma para plantas vecinas y como atrayente de depredadores y parasitoides. Por su parte, el resultado de la carrera armamentista para los insectos puede ser a través de mecanismos de detoxificación o evasión de las defensas vegetales (como cambios conductuales, por ejemplo).

En este trabajo caracterizamos la variación fitoquímica prevaleciente entre clones de una planta reproducida por esquejes (el aguacate; *Persea americana* cv Hass), sus fuentes de variación y consecuencias en un insecto especializado (el barrenador de las ramas; *Copturus aguacatae*).

En un estudio previo realizado hace más de una década se reportó una amplia variación en los fenotipos foliares dentro y entre huertas de aguacate (Espinosa-García et al., 2001). En el presente estudio (capítulo 2) se encontró mayor homogeneidad en la composición química de los árboles, posiblemente debido a selección artificial sobre los fenotipos con características del fruto similares. A pesar de eso, encontramos variación fitoquímica debida a la ontogenia entre ramas de diferente grosor, variación estacional entre los compuestos mayoritarios (butanólidas y alcanos), variación constitutiva entre clones y variación debida a respuesta inducida por el barrenador de las ramas.

De manera correlativa obtuvimos que los árboles con mayor concentración de isoobtusilactona A y  $\alpha$ -humuleno son menos preferidos por el barrenador de las ramas (antixenosis). Además, mostramos que el aguacate Hass induce una respuesta defensiva cuando las larvas están alimentándose de las ramas incrementando la concentración de un grupo de 16 monoterpenos y sesquiterpenos. De esta forma observamos que hay varios compuestos que están involucrados en la defensa del aguacate en armonía con la hipótesis de la barrera múltiple.

Con el segundo experimento (Capítulo 3) analizamos el efecto de un orden mayor de variación fitoquímica, la variación entre variedades de aguacate, el aguacate criollo y el aguacate Hass (un híbrido entre la raza criolla y la guatemalteca) en la preferencia de alimentación de adultos y desempeño de las larvas del barrenador de las ramas. Demostramos que las variedades Hass y Criollo son químicamente diferentes y que afectan diferencialmente la preferencia y desempeño de los barrenadores. Los insectos adultos prefieren alimentarse y las larvas ganan más peso en el aguacate criollo, su hospedero nativo, en armonía con la hipótesis de preferencia-desempeño; la cual establece que los insectos seleccionan al hospedero que maximiza la adecuación de su progenie (Gripenberg et al., 2010; Jaenike, 1978). Posiblemente porque el insecto está mejor adaptado a su composición química. Cabe destacar que el efecto del hospedero fue más acentuado en la preferencia que en el desempeño.

De entre la gran diversidad de metabolitos secundarios que se pudieron detectar en la fracción volátil de hojas y ramas (realizado por GC-MS), pudimos correlacionar la concentración de varios compuestos con la preferencia de alimentación y con el desempeño de las larvas.

Por ejemplo, la preferencia de los insectos adultos para alimentarse por hojas jóvenes respecto de las maduras de aguacate criollo estuvo asociada a diferencias en dos compuestos, mientras que la diferencia para alimentarse entre el aguacate criollo y el Hass estuvo positivamente correlacionada con cuatro compuestos que se postula podrían ser atractivos e indicadores de la calidad nutricional del hospedero. Por otra parte, encontramos cuatro compuestos positivamente correlacionados con el desempeño de las larvas, medido como la ganancia de peso, uno de estos compuestos, el  $\alpha$ -humuleno (único volátil) se propone como un indicador de la calidad nutricional del hospedero para ovipositar, mientras que los otros tres compuestos (no volátiles) podrían ser estimulantes de la alimentación. Por otra parte, dos compuestos fueron correlacionados negativamente con el desarrollo de las larvas, el acetato de eugenol y el germacreno D, por lo que estos compuestos podrían ser disuasores de la alimentación o ligeramente tóxicos para las larvas del barrenador.

En armonía con la hipótesis de la barrera múltiple, encontramos varios compuestos relacionados positiva y negativamente con la preferencia y el desempeño del barrenador de las ramas en ambos hospederos, además los compuestos relacionados con la

preferencia fueron químicamente diferentes de aquellos correlacionados con el desempeño.

Posteriormente, para tratar de generar mayor evidencia sobre el efecto de algunos fitoquímicos del aguacate o sus combinaciones con la preferencia o desempeño del barrenador realizamos algunos experimentos adicionales (capítulo 4). Un estudio de campo en el cual colectamos ramas infestadas nos confirmó que las ramas preferidas para ovipositar son las que tienen un diámetro de 1.5 a 2.5 cm. Además, no encontramos evidencia de que haya un efecto de la variación de los compuestos de ramas con diferente diámetro en la ganancia de peso de las larvas. Pero encontramos que el sesquiterpeno espatulenol incrementa su concentración en las ramas que presentaron mayor incidencia de larvas, por lo que se propone como posible atrayente o estimulante de la oviposición de *Copturus aguacatae*.

Después, en un experimento de selección, encontramos que las hembras del barrenador prefieren alimentarse de ramas de 1 cm lo cual estuvo correlacionado positivamente con la concentración de 4 compuestos, dos de ellos sesquiterpenos volátiles ( $\alpha$ -coapeno y bergamoteno) que pudieran ser atrayentes; y dos semivolátiles (una butanólida y un compuesto no identificado) que pudieran ser estimulantes.

Sin embargo, en un experimento posterior, donde evaluamos el efecto fagoestimulante sobre los insectos adultos de una fracción conteniendo las butanólidas no encontramos evidencia de actividad fagoestimulante. Empero, otros componentes de la rama que también evaluamos si mostraron actividad; una fracción rica en fenoles (catequina, epicatequina y ácido cafeico) mostró un efecto antialimentario, mientras que una fracción rica en azúcares del aguacate (manoheptulosa y perseitol) mostró actividad fagoestimulante.

En resumen, en este estudio encontramos que una fracción de la diversidad y de la variación de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles del aguacate entre clones y entre variedades están relacionados con algún efecto en la preferencia y desempeño de *Copturus aguacatae*. Dichos compuestos son de naturaleza química variada, algunos son terpenos, otros fenil propanoides, derivados de ácidos grasos, azúcares y fenoles. Esta diversidad estructural y funcional refuerza la noción de que la defensa vegetal funciona como una barrera múltiple inclusive para un insecto especializado. Sin embargo, como este trabajo es ampliamente correlativo hacen falta

experimentos más puntuales para probar el efecto de cada metabolito y sus combinaciones en la preferencia y desempeño del barrenador de las ramas.

La variación fitoquímica en sus diferentes dimensiones funciona como una barrera múltiple o de múltiples capas por que ocurren de forma superpuesta y son interdependientes entre sí (Shuman & Baldwin, 2016), inclusive entre los clones del aguacate, de tal forma que generan fenotipos suficientemente diferentes para afectar la percepción de los insectos herbívoros y modificar su comportamiento de elección de hospedero y el desempeño de sus larvas. Por ejemplo, en el segundo capítulo se mostró que los árboles no infestados mostraron mayor concentración de la obtusilactona A y  $\alpha$ -humuleno, y que la concentración del primer compuesto se duplica con el cambio de estación; y la concentración de  $\alpha$ -humuleno también cambia debido a la respuesta inducida por el daño del barrenador. Además, en el capítulo 3 se mostró que el estragol es un compuesto relacionado con la preferencia de alimentación de los insectos adultos pero que mostró gran variación entre árboles, estando incluso ausente (indetectable) en algunos individuos de la variedad Criolla. De manera similar, el germacreno D que estuvo negativamente relacionado con el desempeño de las larvas estuvo ausente (indetectable) en un individuo de la variedad Hass. Estos resultados tienen implicaciones relevantes para el diseño de estrategias de manejo de este insecto plaga. Por ejemplo, utilizando árboles de aguacate criollo (el hospedero favorito) como árboles trampa para monitorear la llegada del insecto o, también se pueden seleccionar y propagar quimiotipos de aguacate Hass que sean menos atractivos para el insecto o con mayor resistencia.

Aunque la mayor parte de la evidencia generada es correlativa, ésta fue obtenida mediante el estudio del volatiloma, por lo que generamos hipótesis específicas sobre la ecología química del barrenador de las ramas y el aguacate Hass que pueden ser probadas puntualmente sin necesidad de recurrir al enfoque tradicional del fraccionamiento biodirigido que puede resultar muy tardado e infructuoso si los compuestos bioactivos funcionan en combinaciones.

El presente trabajo contribuye a la descripción de la composición de la fracción volátil de las ramas del aguacate Hass y del aguacate criollo, la cual no había sido reportada anteriormente. Además, se describe la respuesta inducida del aguacate Hass a la infestación por *Copturus aguacatae* y se postulan varios compuestos del aguacate Hass y criollo que posiblemente participan en la comunicación entre el barrenador y sus hospederos.



## Referencias

- Berenbaum, M. R., & Zangerl, A. R. (1996). Phytochemical Diversity. Adaptation or random variation? In J. T. Romeo, J. A. Saunders, & P. Barbosa (Eds.), *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions* (Vol. 11, pp. 1–24). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1754-6_1).
- Á.E. Bravo-Monzón, E. Ríos-Vásquez, G. Delgado-Lamas, F.J. Espinosa-García, Differential herbivory of the specialist beetle *Stolas punicea* on chemical phenotypes of its host *Mikania micrantha*, *Biocontrol Sci. Technol.* 26 (2016) 419–425. doi:10.1080/09583157.2015.1118436.
- Bustos-Segura, C., Külheim, C., Foley, W. Effects of Terpene Chemotypes of *Melaleuca alternifolia* on Two Specialist Leaf Beetles and Susceptibility to Myrtle Rust, *J. Chem. Ecol.* 41 (2015) 937–947. doi:10.1007/s10886-015-0628-0.
- Cornell, H.V. & Hawkins, B.A. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *American Naturalist.* 161 (2003) 507–522
- Cheng, D., Van der Meijden, E., Mulder, P.P.J., Vrieling, K., Klinkhamer, P.G.L. Pyrrolizidine Alkaloid Composition Influences Cinnabar Moth Oviposition Preferences in *Jacobaea* Hybrids, *J. Chem. Ecol.* 39 (2013) 430–437. doi:10.1007/s10886-013-0257-4.
- Espinosa-García, F. J., García-Rodríguez, Y. M., Chávez Zavala, A., & Delgado-Lamas, G. (2001). Implicaciones de la variación en los fenotipos químicos de las poblaciones de plantas en su susceptibilidad a las plagas y patógenos: el caso de *Persea americana* var. Hass. *Memorias Del 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano Del Aguacate*, 46–57.
- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M., & Roslin, T. (2010). A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. *Ecology Letters*, 13(3), 383–393. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01433.x>
- Jaenike, J. (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical Population Biology*, 14(3), 350–356. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(78\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(78)90012-6)
- Jones, C. G., & Firn, R. D. (1991). On the evolution of plant secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 333(1267), 273–280.

- Kuzina V., Ekstrøm, C.T., Andersen, S.B., Nielsen, J.K., Olsen, C.E., Bak, S. Identification of defense compounds in *Barbarea vulgaris* against the herbivore *Phyllotreta nemorum* by an ecometabolomic approach., *Plant Physiol.* 151 (2009) 1977–1990. doi:10.1104/pp.109.136952.
- Moore, B., Andrew, R., Külheim, C., & Foley, W. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201, 733–750. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.12526/full>
- Richards, L. A., Dyer, L. A., Forister, M. L., Smilanich, A. M., Dodson, C. D., Leonard, M. D., & Jeffrey, C. S. (2015). Phytochemical diversity drives plant–insect community diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10973–10978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504977112>
- Richards, L. A., Glassmire, A. E., Ochsenrider, K. M., Smilanich, A. M., Dodson, C. D., Jeffrey, C. S., & Dyer, L. A. (2016). Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. *Phytochemistry Reviews*, 15(6), 1153–1166. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9479-8>
- Schuman, M. C., & Baldwin, I. T. (2016). The Layers of Plant Responses to Insect Herbivores. *Annual Review of Entomology* 61:1, 373-394.
- Wheeler, G.S. Chemotype variation of the weed *Melaleuca quinquenervia* influences the biomass and fecundity of the biological control agent *Oxyops vitiosa*, *Biol. Control.* 36 (2006) 121–128. doi:10.1016/j.biocontrol.2005.10.005.