



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Maestría en Ciencias Biológicas

**Interacción entre adultos de *Macrodactylus mexicanus*
(Coleoptera: Melolonthidae) con *Quercus grahamii* y *Quercus
sartorii* (Fagaceae), mediada por volátiles**

Tesis

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIÓL. BLANCA XOCHITL MOCTEZUMA VEGA

DIRECTOR:
DR. ANGEL ALONSO ROMERO LÓPEZ

CO-DIRECTOR:
DR. JUAN HÉCTOR GARCÍA CHAVEZ



Marzo 2022



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 14 de marzo de 2022

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

"Interacción entre adultos de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) con *Quercus grahamii* y *Quercus sartorii* (Fagaceae), mediada por compuestos volátiles"

Que presenta la estudiante **Blanca Xochitl Moctezuma Vega** con número de matrícula **219470574**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **"Ecología y aprovechamiento de recursos bióticos"**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dra. Palestina Guevara Fiore

Tutor Externo: M. en C. Alan Carrasco Carballo

Revisor: Dr. Jesús Francisco López Olguín

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.



Declaración de autoría de tesis

Quien suscribe, egresada de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) de la Facultad de Ciencias Biológicas y estudiante del programa de Maestría en Ciencias Biológicas, libre y voluntariamente declara la responsabilidad del contenido de la presente tesis titulada “Interacción entre adultos de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera; Melolonthidae) con *Quercus grahamii* y *Quercus sartorii* (Fagaceae) mediada por compuestos orgánicos volátiles”. Se trata de un trabajo original, sin plagio y el cual no ha sido usado para otro trámite de obtención de grado.

Por lo tanto, se ceden los derechos de propiedad intelectual de la misma a la BUAP para que se incluya como parte del acervo de la Biblioteca, como documento de lectura y consulta.



Biól. Blanca Xochitl Moctezuma Vega

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU 1000304) para poder llevar a cabo el presente trabajo.

A la Maestría en Ciencias Biológicas (BUAP) incluida en el PNP (005671) por el acompañamiento académico.

Al director Dr. Angel Alonso Romero López por el apoyo a lo largo del proceso, el tiempo dedicado, la paciencia y por compartir su valioso conocimiento científico.

Al co-director Dr. Juan Héctor García Chávez por el aporte al escrito y por compartir su conocimiento científico.

Al profesor M. en C. Alan Carrasco Carballo por el apoyo brindado al compartir su conocimiento científico, por su disponibilidad de tiempo y material de laboratorio indispensables para la realización del trabajo.

A la profesora Dra. Palestina Guevara Fiore por el tiempo dedicado, por compartir su increíble conocimiento científico y su aporte tan valioso al escrito.

Índice General

| | |
|---|---------------|
| 1. Resumen | - 1 - |
| 2. Introducción | - 2 - |
| 2.1 <i>Interacción entre coleópteros <i>Macroductylus mexicanus</i> y encinos</i> | - 4 - |
| 2.2 <i>Estudio de la interacción <i>M. mexicanus</i>-<i>Q. grahamii</i> y <i>Q. sartorii</i> con la posible participación de COVs</i> | - 7 - |
| 3. Antecedentes | - 8 - |
| 4. Justificación | - 9 - |
| 5. Pregunta de investigación | - 9 - |
| 6. Hipótesis | - 10 - |
| 7. Objetivos | - 10 - |
| 7.1 Objetivo general | - 10 - |
| 7.1.1 <i>Objetivos particulares</i> | - 10 - |
| 8. Material y métodos | - 10 - |
| 8.1 <i>Sitio y modelos de estudio</i> | - 10 - |
| 8.2 <i>Muestreo y recolecta de hojas de ambas especies de <i>Quercus</i></i> | - 10 - |
| 8.3 <i>Análisis de COVs</i> | - 11 - |
| 8.4 <i>Acoplamiento molecular</i> | - 13 - |
| 8.4 <i>Análisis estadísticos</i> | - 13 - |
| 9. Resultados y Discusión | - 14 - |
| 9.1 <i>Análisis fitoquímicos</i> | - 14 - |
| 9.2 <i>Recolecta de material y extracción de COVs</i> | - 16 - |
| 9.3 <i>CG-EM</i> | - 16 - |
| 9.4 <i>Acoplamiento molecular</i> | - 25 - |
| 9.4.1 <i>Selección de OBPs</i> | - 25 - |
| 9.4.2 <i>Análisis energético</i> | - 27 - |
| 9.4.3 <i>Análisis secuencial</i> | - 31 - |
| 9.4.4 <i>Análisis de residuos aminoacídicos</i> | - 32 - |
| 10. Conclusiones | - 45 - |
| 11. Literatura citada | - 46 - |
| 12. Anexos | - 52 - |

Índice de Cuadros

- Cuadro 1. Pruebas fitoquímicas efectuadas con hojas de *Quercus grahamii* y *Quercus sartorii*.
..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Cuadro 2. Metabolitos secundarios determinados para las especies de encinos bajo estudio. - 14 -
- Cuadro 3. Compuestos presentes en el perfil químico de los extractos de hojas de *Q. sartorii*. Se enlistan los promedios del porcentaje de abundancia dentro de la muestra en cada temporada. Además, se etiquetan los nombres de los compuestos con palabras más cortas referidas entre comillas. - 18 -
- Cuadro 4. Compuestos presentes en el perfil químico de los extractos de hojas de *Q. grahamii*. Se enlistan los promedios de abundancia dentro de la muestra de cada temporada. Además, se reetiquetan los nombres de los compuestos con los referidos entre comillas. - 20 -
- Cuadro 5. Análisis de varianza con modelo lineal generalizado..... - 21 -
- Cuadro 6. Estructuras bidimensionales de los compuestos presentes en el perfil químico de los extractos de hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii*. - 23 -
- Cuadro 7. Residuos aminoacídicos con los que interactúan cada compuesto de especies de *Quercus* con la HELEOBP1 - 35 -
- Cuadro 8. Residuos aminoacídicos con los que interactúan cada compuesto de especies de *Quercus* con la HELEOBP3 - 39 -
- Cuadro 9. Residuos aminoacídicos con los que interactúa cada compuesto de especies de *Quercus* con la HELEOBP4..... - 44 -

Índice de Figuras

- Figura 1. Interacciones ecológicas en las que generalmente participan los COVs de las plantas. Tomado de Marín-Loaiza (2007) - 3 -
- Figura 2. Adulto de *Macrodactylus mexicanus*. Se muestran algunas de sus principales características como la forma del cuerpo y coloración de patas. Se observa al insecto mordiendo la hoja de *Quercus grahamii* (Foto B. M.)..... - 5 -
- Figura 3. Árbol y hojas de *Quercus grahamii* (Foto B.M). - 6 -
- Figura 4. Árbol y hojas de *Quercus sartorii*. (Foto B.M). - 7 -
- Figura 5. Sistema de hidrodestilación tipo Clevenger. Tomado de Samadi *et al.* (2016)..... - 12 -
- Figura 6. Prueba de KOH/H₂O para la identificación de cumarinas en *Q. grahamii*. Se muestra el cambio de color a amarillo de la muestra, indicando positivo a la presencia de cumarinas. - 14 -
- Figura 7. Proceso de extracción fundamentado en la destilación por arrastre de vapor, a) Pesado de material foliar (100g); b) Sistema de hidrodestilación Clavenger. - 16 -
- Figura 8. Cromatogramas generados a partir de los extractos de hojas de *Quercus sartorii*. Temporada indicada en A) invierno, B) primavera y C) verano, con un intervalo total de 0 a 60 min (tiempo de retención). - 17 -
- Figura 9. Gráfica de cajas y bigotes de *Q. sartorii* y *Q. grahamii*. Se muestra la abundancia de los compuestos en la temporada de verano. - 19 -
- Figura 10. Cromatogramas generados a partir de los extractos de hojas de *Quercus grahamii*. Temporada indicada en A) invierno, B) primavera y C) verano, con un intervalo total de 0 a 60 min (tiempo de retención). - 19 -
- Figura 11. A) 3 careno y B) 4 careno - 24 -
- Figura 12. Se observa en a) *H. elegans* (Foto: Ernesto Cisternas), b) estructura antenal laminar presente en ambas especies y c) *M. mexicanus*. - 25 -
- Figura 13. Sensilas de *H. elegans*. Se observan a) quimiorreceptores quéticos, b) tricoideos y c) placoideos (Mutis *et al.*, 2014). - 26 -

Figura 14. Sensilas de *M. mexicanus*. Se observan A) sensilas auricólicas (AUS) y basicónicas (BAS). B) Placoideos (PLAS), tricoideos (TRS) y BAS. C) Superficie de la cara interna de la lamela proximal (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015)..... - 27 -

Figura 15. Acoplamiento molecular con HELEOBP1. Docking entre los compuestos de los perfiles químicos de ambas especies de *Quercus*. Se resalta pul (verde) con mayor energía de acoplamiento para *Q. grahamii* y 2cyc (azul) con mayor energía de acoplamiento para *Q. sartorii*..... - 28 -

Figura 16. Acoplamiento molecular con HELEOBP3. Docking entre los compuestos de los perfiles químicos de ambas especies de *Quercus*. Se resalta men (verde) con mayor energía de acoplamiento para *Q. grahamii* y *Q. sartorii*. Como segundo compuesto con mayor energía de acoplamiento se encuentra 2cyc (azul) único para *Q. sartorii*..... - 29 -

Figura 17. Acoplamiento molecular con HELEOBP4. Docking entre los compuestos de los perfiles químicos de ambas especies de *Quercus*. Se resalta cyc (verde) con mayor energía de acoplamiento para *Q. grahamii*. Finamente empatados 2met y 2cyc (azul) siendo este último único para *Q. sartorii*..... - 30 -

Figura 18. Alineamiento. Se observa el alineamiento entre las tres OBP bajo estudio, donde los colores significan: rojo: interacción hidrofóbica y aromáticos; azul: interacción acida; magenta, interacción básica H; verde: interacción con hidroxilo; gris: aminoácido inusual. Los símbolos significan: (*) posición de residuo altamente conservada, (:) indica conservación entre grupos con propiedades altamente similares y (.) indica conservación entre grupos con propiedades levemente similares. - 31 -

Figura 19. Interacción 2D HELEOBP1 con alpi, dlim, bmir, 2cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción..... - 32 -

Figura 20. Interacción 2D HELEOBP1 con bihep, men, bihex, 13cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, verde intenso) enlace de hidrógeno, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción. - 33 -

Figura 21. Interacción 2D HELEOBP1 con cyc, 2met, 4car y 24cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, verde intenso) enlace de hidrógeno, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción. - 34 -

Figura 22. Interacción 2D HELEOBP1 con pul y 14cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción. - 34 -

Figura 23. Interacción 2D HELEOBP3 con alpi, dlim, bmir, 2cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción..... - 36 -

Figura 24. Interacción 2D HELEOBP3 con bihep, men y bihex. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción..... - 37 -

Figura 25. Interacción 2D HELEOBP3 con 13cyc, cyc, 2met y 4car. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción. - 38 -

Figura 26. Interacción 2D HELEOBP3 con 24cyc, pul y 14cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción..... - 39 -

Figura 27. Interacción 2D HELEOBP4 alpi, dlim, bmir y 2cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción..... - 41 -

Figura 28. Interacción 2D HELEOBP4 con bihep, men y bihex. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción..... - 42 -

Figura 29. Interacción 2D HELEOBP4 con 13cyc, cyc, 2met y 4car. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, verde intenso) enlace de hidrógeno, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción. - 43 -

Figura 30. Interacción 2D HELEOBP4 con 24cyc, pul y 14cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde (Vander Waals), verde intenso (enlace de hidrógeno), morado (pi-sigma), rosa (alquílicas) y azul (carbón-hidrógeno). El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción. - 44 -

1. Resumen

La Ecología química es el área de estudio que se enfoca en las interacciones que se establecen entre dos o más organismos a través de sustancias químicas, su origen, función y evolución (Ruther *et al.*, 2002). Estas sustancias, también llamadas infoquímicos, son producidas y liberadas al ambiente por un organismo, provocando reacciones fisiológicas o de comportamiento entre individuos de la misma o de distinta especie (Dicke y Sabelis, 1988). Por ejemplo, desde el enfoque químico, las interacciones planta-insecto analizan cómo los metabolitos secundarios que liberan la plantas, promueven varias interacciones ecológicas con distintas especies de insectos; dentro de los metabolitos secundarios más comunes se encuentran los compuestos orgánicos volátiles (COVs), (Anaya-Lang, 2003). En México han sido reportadas las interacciones planta-insecto, que se observan entre coleópteros de la familia Melolonthidae con sus plantas hospederas (Romero-López, 2016) y recientemente encontramos nuevos registros de la presencia de *Macroductylus mexicanus* Burmeister en poblaciones del género *Quercus* (Moctezuma-Vega, 2020). De tal manera que no ha sido demostrado que esta interacción podría estar siendo establecida por los COVs de las diferentes especies de encino. Por ello, en el presente estudio se analizó la interacción entre dos especies de encino, *Quercus grahamii* Benth. y *Quercus sartorii* Liebm. con adultos de *M. mexicanus*, mediante los COVs liberados por las hojas de dichos árboles. Se logró obtener el perfil químico de ambas especies, el cual determinó catorce compuestos de la clasificación de los terpenos. Aunado a esto, se simuló el acoplamiento molecular entre proteínas de unión a olores (OBP, del inglés odorant binding protein) que pudieran formar parte de la estructura antenal de *M. mexicanus* y permitirle interactuar con los COVs. A partir de este procedimiento bioinformático, el COV más relevante en la interacción entre *M. mexicanus* con *Q. grahamii* es el 2-metil-5- (1-metiletenil) (S) -2-ciclohexen-1-ona, tanto por abundancia como por energía de acoplamiento, mientras que los COVs más relevantes en la interacción entre *M. mexicanus* con *Q. grahamii* son β -mirceno por abundancia y pulegona por energía de acoplamiento. Esto sugiere que los compuestos reportados tienen formas complementarias al sitio de unión de las OBP permitiendo así que se establezca una interacción intraespecífica entre ambas especies de encino con *M. mexicanus*.

Palabras clave: acoplamiento molecular, ecología química, perfil químico.

2. Introducción

La Ecología química es el área de conocimiento que estudia el origen, función y evolución de las interacciones que se establecen entre dos o más organismos a través de sustancias químicas (Ruther *et al.*, 2002). Estas sustancias también llamadas infoquímicos son producidas y liberadas al ambiente por un organismo, provocando reacciones fisiológicas o de comportamiento de otros individuos de la misma o de distinta especie (Dicke y Sabelis, 1988). Este campo de estudio se ha visto reforzado por los avances conceptuales de otras disciplinas como la biología molecular, además de las metodologías y avances tecnológicos que permiten análisis más detallados sobre estos infoquímicos y su efecto en las interacciones ecológicas (Eisner y Meinwald, 1995). Cuando la ecología química aún no se formalizaba como una disciplina, contaba con estudios pioneros como los de Ehrlich y Raven (1964), en los cuales se estudió la interacción entre mariposas y plantas, concluyendo que la ocupación está dada por la preferencia de las larvas a los compuestos químicos presentes en algunas plantas. De igual forma, el reporte de Dethier (1954) da luz sobre las plantas que utilizan algunos metabolitos secundarios como defensa contra fitófagos. A partir de estos documentos, el interés en la investigación de las interacciones planta-insecto vistas desde el enfoque químico-ecológico se ha renovado, principalmente en lo referente al análisis de los metabolitos secundarios que median estas interacciones (Anaya-Lang, 2003). Estos metabolitos de origen vegetal, también llamados compuestos orgánicos volátiles (COVs), generalmente son mezclas de varios elementos orgánicos, lipofílicos y de bajo peso molecular que provocan la atracción de polinizadores y que forman parte fundamental de la defensa vegetal contra insectos, hongos y bacterias (Figura 1) (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

Los COVs se producen en distintas rutas metabólicas propias de las plantas, principalmente por dos: la vía de los ácidos grasos o vía de los volátiles de hojas verdes y la vía del mavelonato; entre los COVs más importantes se encuentran los terpenos, hidrocarbonos saturados e insaturados, bencenoides y fenilpropanoides (Niinemets *et al.*, 2004). Estos mismos COVs suelen ser exclusivos de la especie vegetal que los emite, provocando que la interacción con otros organismos, como con los insectos, tienda a la especificidad (Xu y Turlings, 2018).

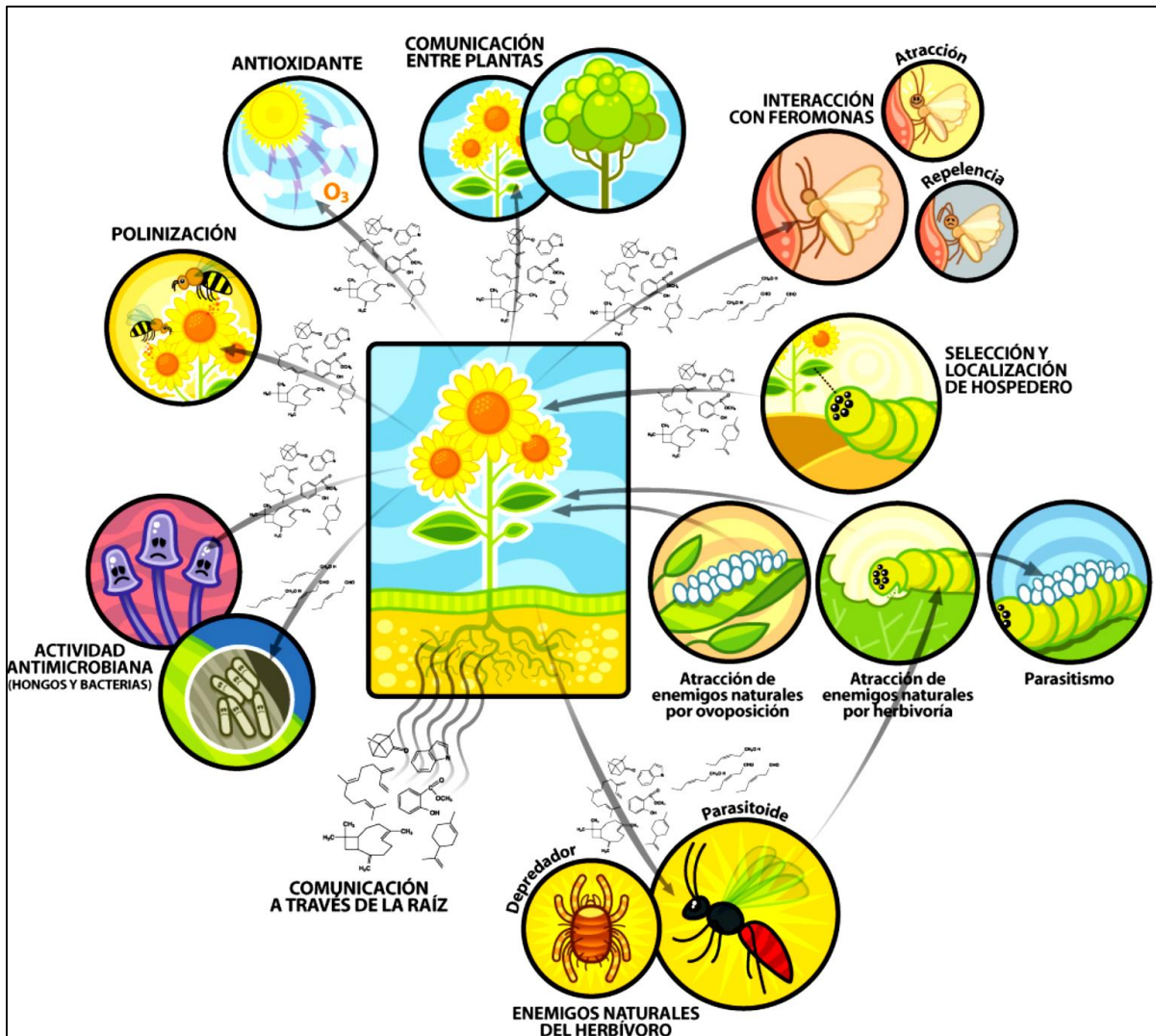


Figura 1. Interacciones ecológicas en las que generalmente participan los COVs de las plantas. Tomado de Marín-Loaiza (2007)

Para que puedan llevarse a cabo estas interacciones planta-insecto, los insectos cuentan con estructuras morfológicas especializadas, tanto en las antenas como en áreas bucales, que están relacionadas con el sistema olfativo. Estas estructuras les permiten llevar a cabo la detección y reconocimiento de los COVs de las plantas (Leal, 1998; Romero-López *et al.*, 2019), un proceso sensorial complejo que involucra desde proteínas de unión a olores (OBP, por sus siglas en inglés odorant binding protein) hasta la codificación neuronal (transducción de la información) y las respuestas de comportamiento correspondientes. De esta manera se promueven distintos tipos de

interacción, como la selección y localización de las plantas hospederas, búsqueda de pareja o sitios de oviposición (Conchou *et al.*, 2019).

2.1 Interacción entre coleópteros *Macrodactylus mexicanus* y encinos

En México se han estudiado interacciones planta-insecto, como las que se observan entre coleópteros de la familia Melolonthidae con sus plantas hospederas (Romero-López, 2016). La familia Melolonthidae Leach cuenta con registros de 1179 especies de coleópteros en territorio mexicano, los cuales se encuentran presentes en todos los hábitats continentales, excepto en ambientes con hielos perennes (Morón *et al.*, 2014). Estos insectos pueden ser encontrados desde el edafón hasta el dosel, sobre todo porque los adultos se alimentan de las hojas, flores y tallos de varias plantas, mientras que las larvas se alimentan de raíces, humus o xilema. Predominan los registros en los que se enlistan las especies vegetales que fungen como alimento, refugio y sitios de oviposición de estos insectos, causando pérdidas económicas en cultivos agrícolas en su etapa larvaria y adulta (Cherman y Morón, 2014).

Dentro de Melolonthidae, se encuentra el género *Macrodactylus*, el cual está conformado por coleópteros conocidos como “frailecillos” o “escarabajos de las rosas” (Arce-Pérez y Morón, 2000). Los adultos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, suelen ser coleópteros activos en el periodo mayo-agosto, sobre todo en ambientes templados o semicálidos situados entre los 100 y los 2650 m de altitud; muestran un cuerpo alargado y delgado cubierto por élitros largos y anchos que abarcan cinco esternitos abdominales, además de presentar patas largas y delgadas de coloración variable, aunque con una tendencia a tonos anaranjados (Arce-Pérez y Morón, 2000) (Figura 2). Existe evidencia de que las larvas de *M. mexicanus* se alimentan de raíces del maíz (*Zea maíz* (L.)) y el frijol (*Phaseolus vulgaris* (L.)). Sin embargo, en su etapa adulta muestran patrones de comportamiento relacionados con la agregación, alimentación y cópula en algunas especies arbóreas, como los pinos (Aragón-García *et al.*, 2010), aunque también se ha asociado la presencia de adultos de *M. mexicanus* con árboles del género *Quercus*, como *Quercus grahamii* (Benth.) y *Quercus sartorii* (Liebm.). No se ha analizado la interacción a fondo, la cual podría estar mediada por COVs de las hojas de estas dos especies de encino (Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020).

El género *Quercus* pertenece a la familia Fagaceae. Para México se registran alrededor de 161 especies, de las cuales 86 son endémicas y económicamente importantes dado su uso maderable por las propiedades anatómicas, mecánicas y físicas que poseen (Valencia, 2004; Luna-José *et al.*, 2003). En la actualidad, se encuentran en un estado de declinamiento, es decir, en la pérdida del vigor del arbolado, muerte progresiva de ramas y posteriormente, del organismo (Uribe-Salas *et al.*, 2019). Las poblaciones de encinos son afectadas por diversos factores tanto abióticos como bióticos, como es la presencia de diversas especies de insectos que amenazan su supervivencia, entre las cuales se encuentran integrantes de las familias Cerambycidae, Buprestidae (Sosa-Ramírez, 2011), así como de Melolonthidae (Romero-López *et al.*, 2007; Romero-López, 2016).



Figura 2. Adulto de *Macroductylus mexicanus*. Se muestran algunas de sus principales características como la forma del cuerpo y coloración de patas. Se observa al insecto mordiendo la hoja de *Quercus grahamii* (Foto B. M.).

Quercus grahamii es un grupo de árboles conocidos comúnmente como “encinos chilillos” y forman parte de la sección *Lobatae* (Nixon, 1993) (Figura 3). Crecen en regiones templadas y en México se les encuentra en los estados de Colima, Jalisco, México, Michoacán, Puebla, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz (Romero-Rangel, 2006; Valencia, 2017). Dentro de la *Red*

List, es una especie que se encuentra en la categoría de escasa información; sin embargo, su sinónimo taxonómico *Quercus acutifolia* (Née) se registra dentro de la categoría vulnerable, sin información del estado actual de la población (Wenzell y Kenny, 2015).



Figura 3. Árbol y hojas de *Quercus grahamii* (Foto B.M).

Quercus sartorii, por otro lado, es un grupo de encinos pertenecientes también a la sección *Lobatae*, los cuales presentan hojas lanceoladas, elípticas y ovadas; estas presentan margen dentado con los dientes aristados (Figura 4) (Cabrera, 2003). Estos encinos cuentan con una amplia distribución en México, ya que se les encuentra en bosques de montaña perennifolios de Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Tamaulipas y Veracruz (Valencia, 2004; Sabás-Rosales *et al.*, 2015). Esta especie cuenta con un registro en la Red List como especie bajo amenaza (Jerome, 2018).



Figura 4. Árbol y hojas de *Quercus sartorii*. (Foto B.M).

2.2 Estudio de la interacción *M. mexicanus*-*Q. grahamii* y *Q. sartorii* con la posible participación de COVs

Todas las plantas producen COVs que promueven la interacción con factores bióticos, ya sea planta-planta, o en el caso de este estudio, planta-insecto y estos compuestos son difíciles de aislar e identificar; sin embargo, en la actualidad existen procedimientos que permiten analizarlos de una forma eficaz, permitiendo recabar información sobre los interactuantes y de los metabolitos involucrados.

Una manera de esclarecer estos mecanismos de interacción es mediante el análisis de las proteínas de unión a olor o también llamadas OBP, que son proteínas que se encuentran localizadas en el sistema olfatorio de los insectos en general y participan en el reconocimiento y transducción de la información (Fan *et al.*, 2011). Aunado a estas proteínas, el acoplamiento de los COVs puede ser analizado desde el enfoque de la bioinformática mediante la herramienta denominada “acoplamiento molecular” o también llamado “docking”, que es un estudio que permite analizar la

unión de un ligando (en este caso los COVs) con una proteína receptora (en este caso las OBPs), de tal manera que permite predecir la probabilidad del acoplamiento mediante la suma de la energía de afinidad entre ambos componentes (Yuriev y Ramsland, 2013). De esta manera, su aplicación dentro de la ecología química es la de inferir las posibles interacciones entre plantas e insectos dilucidando el mecanismo de acción del esquema de comunicación.

3. Antecedentes

Se cuenta con registros de adultos de algunas especies de Melolonthidae que responden a los COVs de plantas, destacando los estudios de Heath *et al.* (2001) y Ruther *et al.* (2002), en los cuales se señala que los adultos de *Macrodactylus subspinosus* F. y *Melolontha hippocastani* F. son atraídos a plantas como *Carpinus betulus* (Carpe), que presentan fitofagia por parte de sus conespecíficos. Otros estudios corresponden a adultos de *M. nigripes*, para los cuales se ha observado que los COVs liberados por hojas de “azumiate” (*Baccharis salicifolia* (Ruiz y Pav.) Asteraceae) provocan el acercamiento de hembras y machos de estos insectos para alimentarse de las hojas de los árboles (Nieves-Silva y Romero-López, 2019). En el caso de la interacción entre adultos de Melolonthidae con encinos, Ruther *et al.* (2002) reportaron la interacción entre adultos de *M. hippocastani* y *Quercus rubra* (L.). Los autores encontraron daños (agujeros en la estructura foliar) en hojas en desarrollo y totalmente desarrolladas de esta especie vegetal, con diferencias entre los COVs liberados. Además, detectaron que las hembras de esta especie de Melolonthidae se guiaban por los COVs para encontrar las plantas y los machos los usaban para localizar a las hembras, identificando como compuesto principal el aldehído-3-hexenal. Para especies de Melolonthidae distribuidas en México, se ha reportado la presencia de adultos de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y *Phyllophaga ravidata* Blanchard en hojas de *Quercus* sp. (Romero-López *et al.*, 2007), así como de adultos de *M. mexicanus* en hojas de cinco especies de encinos (entre ellas *Q. grahamii* y *Q. sartorii* (Moctezuma-Vega, 2019), pero sin confirmarse aún la participación de COVs en los eventos.

Con respecto a estudios del efecto de COVs de encinos en otros grupos de insectos, destaca el de Sánchez-Osorio (2008) en el cual se obtuvo el perfil químico de hojas de *Quercus suber* (L.) conformado primordialmente por α -pineno, sabineno, limoneno y mirceno y se confirmó su

actividad biológica para adultos de *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera: Cerambycidae) a través de registros electroantenográficos.

Finalmente, el empleo del acoplamiento molecular en especies de Melolonthidae, se ha realizado para la simulación de la interacción entre adultos de *Hylamorpha elegans* Burmeister y su planta hospedera *Nothofagus obliqua* (Mirbel, Nothofagaceae). Se evidenció el acoplamiento entre sesquiterpenos (principales componentes de sus COVs) y los complejos OBP-OR, principales centros sensoriales en estos insectos (González-González *et al.*, 2016). Por otro lado, en el estudio de Wang *et al.*, (2013), utilizando el mismo modelo biológico, detectaron las OBP HoblOBP1, HoblOBP2 y HoblOBP4, en las sensilas basicónicas, que son estructuras quimiorreceptoras del sistema olfativo de los insectos.

4. Justificación

En México se ha estudiado la Ecología química de los miembros de *Macrodactylus*, principalmente de los adultos de *M. nigripes* que son atraídos a COVs de hojas de azumiate, una de sus plantas hospederas (Nieves-Silva y Romero-López, 2019). Recientemente se ha reportado la presencia de adultos de *M. mexicanus* en hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii* (Moctezuma-Vega, 2019), encinos de importancia ecológica y económica que ofrecen diferentes servicios ecosistémicos, (Luna-José, 2003). No obstante, la información sobre el papel de los COVs liberados por las hojas de ambas especies vegetales en la atracción o repelencia de estos insectos no ha sido descrita, lo cual pretende esclarecerse con el presente estudio. De tal manera que se completará el esquema de comunicación química de los coleópteros, detectando los elementos partícipes en el mensaje químico específico y la recepción del mismo, permitiendo entender los mecanismos que establecen la interacción entre estos organismos a través de los COVs involucrados.

5. Pregunta de investigación

¿Cuáles son los COVs que median la interacción entre adultos de *M. mexicanus* con hojas de árboles de *Q. grahamii* y *Q. sartorii*?

6. Hipótesis

Los terpenos son los principales COVs que median la interacción entre adultos de *M. mexicanus* con *Q. grahamii* y *Quercus sartorii*.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

Analizar la actividad biológica que provocan los COVs liberados por hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii* en adultos de *M. mexicanus*.

7.1.1 Objetivos particulares

- Identificar los COVs extraídos de las hojas de ambas especies de encinos.
- Simular la respuesta de los adultos de *M. mexicanus* hacia los COVs extraídos de las hojas de los encinos bajo estudio, mediante acoplamiento molecular.

8. Material y métodos

8.1 Sitio y modelos de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Herbario y Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México. Los encinos maduros de las especies *Q. grahamii* y de *Q. sartorii* fueron determinados previamente como hospederos de adultos de *M. mexicanus* (Moctezuma-Vega, 2019).

8.2 Muestreo y recolecta de hojas de ambas especies de *Quercus*

Se llevaron a cabo muestreos dirigidos en ambas especies de encino ubicados en el Jardín Botánico Universitario y se tomó el criterio de elegir hospederos de *M. mexicanus* en árboles de cada especie vegetal separados por más de 10 m entre unos y otros (esto con la finalidad de evitar que entre ellos se sinergice la liberación de volátiles); dichos árboles tendrían que presentar más

de cincuenta “frailecillos” al momento del muestreo. Este se efectuó entre las 9:00 y las 11:00 hrs da cada día de trabajo.

Las hojas de los encinos se recolectaron de manera manual con tijeras de jardinería. Para ello se tomaron ramas completas de distintas partes de la copa de los árboles y se colocaron inmediatamente en bolsas herméticas y en un recipiente con hielo para evitar la deshidratación de las hojas y evaporación precipitada de los COVs. Una vez trasladadas al laboratorio, se separaron las hojas de las ramas para procesarlas. Se consideraron hojas completas desde el ápice hasta el peciolo.

Se consideraron tres temporadas para la toma de material foliar como materia base de la extracción de COVs. La primera temporada de recolecta se denominó “invierno” y se llevó a cabo en octubre de 2019. La segunda temporada de recolecta, “primavera”, se efectuó entre febrero y marzo de 2020. Finalmente, la tercera temporada denominada como “verano” se llevó a cabo en julio de 2020, cuando se presenta el pico de actividad principal de los adultos de *M. mexicanus* (Moctezuma-Vega, 2019). Se tomaron muestras de tres cortes de 300 g de material foliar para cada árbol en cada temporada, divididos a su vez en tres cortes de 100 g cada uno para la extracción de COVs.

8.3 Análisis de COVs

Previo a la extracción de los compuestos, se efectuaron análisis fitoquímicos por triplicado de las hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii* con la finalidad de contar con un panorama general de los componentes químicos presentes. Se seleccionaron hojas sin daño de ambas especies de encino del Jardín Botánico Universitario (con presencia de adultos de *M. mexicanus*) y se les aplicaron las pruebas indicadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Pruebas fitoquímicas efectuadas con hojas de *Quercus grahamii* y *Quercus sartorii*.

| Prueba | Metabolito identificado |
|--|--------------------------------|
| KOH/H₂O | Cumarinas |
| Shinoda | Flavonoides |
| KMnO₄ | Isoprenos insaturados |
| Ac₂O/H₂SO₄ | Esteroides/Terpenos |
| KOH/EtOH | Lactonas |
| Molish | Azúcares reductores |
| Dragendorff | Alcaloides |
| Salkowski | Colesteroles |
| Meyer | Sesquiterpenlactonas |
| Espuma | Saponinas |

Se empleó el método de hidrodestilación con un sistema tipo Clevenger modificado (Figura 5). El condensador de rosario se acopló a un re-circulador marca Witeg®, a una temperatura de -15 °C. Los 100 g de material foliar se dejaron a punto de ebullición y todo el sistema se programó por 4 h para cada muestra. Una vez obtenido el aceite esencial y el extracto en líquido, los COVs se capturaron utilizando lavados con diclorometano; después de que este se evaporó, se preparó una solución madre a 5.0 mg/ml para su análisis por CG-EM.

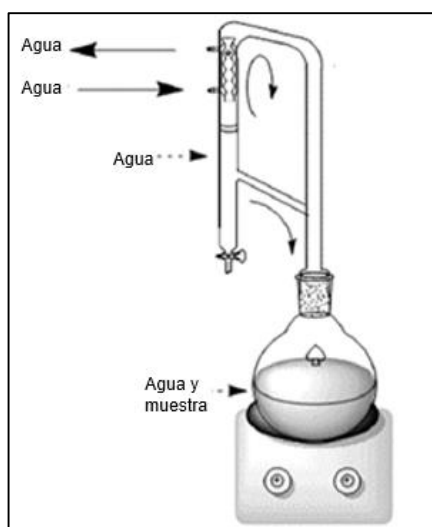


Figura 5. Sistema de hidrodestilación tipo Clevenger. Tomado de Samadi *et al.* (2016).

Para la programación del CG se tomó como referencia el trabajo de Nieves-Silva y Romero-López (2019). Para la separación y análisis de los compuestos se utilizó una columna DB5-MS (30 m, 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μ m de espesor de la película). La temperatura del equipo fue de 300 °C inyector, 70 °C de temperatura inicial con incremento de 3 °C/min, hasta llegar a 280 °C. Como gas acarreador se utilizó hidrógeno (1 mL/min) y el inyector en modo splitless. Por otro lado, se empleó un espectrómetro de masas Agilent 5975C en modo SCAN (50 a 400 UMA). La identificación de los compuestos se efectuó mediante la biblioteca Wiley-NIST Ed 11-2017 tomando en cuenta los compuestos con una similitud de espectros mayor a 95%.

8.4 Acoplamiento molecular

El tipo de acoplamiento molecular que se implementó fue el de “unión proteína-ligando”. Estos últimos se tomaron a partir de los compuestos del perfil químico de ambas especies de *Quercus*. Como proteínas de unión a olores se utilizaron las proteínas HELEOBP1, HELEOBP3 y HELEOBP4 previamente identificadas en *H. elegans*, especie filogenéticamente cercana con *M. mexicanus* (Hunt, 2007, Cherman y Morón, 2014). Se analizó la energía de afinidad para determinar la capacidad de la interacción con cada ligando, así como la conformación tridimensional, para determinar los sitios de unión a las proteínas. Asimismo, se estimaron los residuos aminoacídicos presentes en la proteína junto con cada ligando, con lo cual es posible determinar la naturaleza de las interacciones y la distancia entre estas. Para todo lo anterior se emplearon los programas AutoDock Vina®, y Discovery Studio®.

8.4 Análisis estadísticos

Para evaluar los compuestos presentes en los perfiles químicos, se analizó el porcentaje de la abundancia de los mismos obtenidos en la época de verano para las dos especies de encino como variable de respuesta, mediante pruebas de análisis de varianza junto con modelos aditivos generalizados. El modelo completo considerado fue el porcentaje de los compuestos para cada especie (dos niveles) en la temporada de verano. El programa estadístico utilizado fue R® versión 3.6.1 (R Core Team, 2019) junto con el paquete “gam”.

9. Resultados y Discusión

9.1 Análisis fitoquímicos

Efectuadas las pruebas fitoquímicas por triplicado y con base en la escala de intensidad, se obtuvieron los resultados para las hojas de ambas especies de encinos (Cuadro 2). Las pruebas que dieron positivo para *Q. sartorii* fueron las correspondientes a flavonoides, isoprenos, esteroides y sesquiterpenos, mientras que las pruebas con resultado negativo fueron a cumarinas, lactonas, azúcares reductores, alcaloides, colesterol y saponinas. Para *Q. grahamii* se obtuvieron resultados positivos a las pruebas de cumarinas (Figura 6), flavonoides, isoprenos, esteroides, lactonas y sesquiterpenos, dando negativo a azúcares reductores, alcaloides, colesteroles y saponinas.

Cuadro 2. Metabolitos secundarios determinados para las especies de encinos bajo estudio.

| Compuestos | <i>Quercus sartorii</i> | <i>Quercus grahamii</i> |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cumarinas | - | + |
| Flavonoides | + | + |
| Isoprenos | + | + |
| Esteroides | + | + |
| Lactonas | - | + |
| Azúcares reductores | - | - |
| Alcaloides | - | - |
| Colesteroles | - | - |
| Sesquiterpenlactonas | + | + |
| Saponinas | - | - |

+ Presencia
- Ausencia

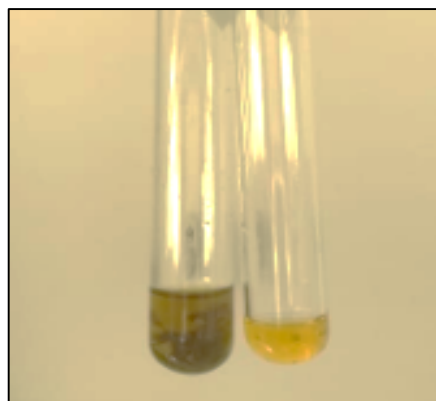


Figura 6. Prueba de KOH/H₂O para la identificación de cumarinas en *Q. grahamii*. Se muestra el cambio de color a amarillo de la muestra, indicando positivo a la presencia de cumarinas.

Dados los resultados obtenidos con los análisis fitoquímicos, los COVs comunes en plantas con actividad repelente o atrayente para insectos, son los flavonoides, que poseen un amplio espectro de actividades químicas y biológicas que incluyen propiedades de eliminación de radicales y también funcionan como auxinas que estimulan la germinación (Ikan, 1991). Además, han sido reportados en otras especies de encinos como *Quercus ilex* (L.) (Meziti *et al.*, 2019). Los encinos son conocidos por su gran cantidad de taninos, los cuales se utilizan en la industria para curtir pieles y estos mismos son producidos a través de la vía del acetato; se forman a partir de unidades de isoprenos, encontrados también en el análisis fitoquímico tanto para *Q. grahamii* como para *Q. sartorii*. Estos mismos COVs se han reportado como asociados a la defensa contra insectos fitófagos (Vaca-Sánchez *et al.*, 2016). Las lactonas sesquiterpénicas son comunes en especies de la familia *Asteraceae*; sin embargo, el perfil fitoquímico indica presencia en *Q. grahamii*. Estas lactonas son COVs con funciones antimicrobianas, antifúngicas y citotóxicas (Ruiz-Reyez y Suarez, 2015). Precisamente, los sesquiterpenos presentes en ambas especies de encino son COVs que se han reportado en hojas de *Quercus robur* (L.) como atrayentes y en algunas circunstancias ambientales como repelentes de insectos fitófagos; tal es el caso de la polilla *Tortix viridana* L. (Ghirardo *et al.*, 2020). Es importante mencionar que, al no haber encontrado alcaloides y saponinas dentro de los perfiles fitoquímicos, es posible que se pueda establecer la interacción entre *M. mexicanus* y los encinos, ya que los alcaloides y saponinas son compuestos volátiles sumamente tóxicos para las especies que los consumen; ambos son considerados parte del sistema de defensa de las plantas, sobre todo contra insectos fitófagos, ya que se les caracteriza por su sabor amargo (Hussain *et al.*, 2019).

Las cumarinas son metabolitos secundarios que se caracterizan por presentarse en plantas de *Asteraceae*, por lo que no se esperaba en la fitoquímica de *Q. grahamii* y *Q. sartorii*. Sin embargo, se sugiere que la aparición en *Q. grahamii* es por tratarse de un subproducto de la ruta biosintética de los fenilpropanoides (Vaca-Sánchez *et al.*, 2016). Los esteroides y colesteroles son productos comúnmente encontrados en los tejidos maderables de varias especies de encinos como en *Quercus sebifera* (Trel.) y *Quercus tinkhami* (C.H. Muller) (Bárcenas-Pazos *et al.*, 2008).

9.2 Recolecta de material y extracción de COVs

Se recolectaron las hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii* en las temporadas descritas anteriormente, tomando como base los 300 g indicados para cada corte y separando 100 g para la extracción de COVs (Figura 7) para el posterior análisis por CG-EM. Con esto se aseguró que la técnica por arrastre de vapor con el dispositivo Clavenger modificado extrajera la mayor cantidad de metabolitos secundarios posible, tal y como lo mencionan Müberra *et al.* (2008). Estos autores compararon las técnicas de extracción por arrastre de vapor, reafirmando que esta metodología funciona incluso solo dejando 3 h el material vegetal en el equipo. En este caso, por ser plantas con hojas de textura coriácea, se dejaron un total de 4 h para asegurar una extracción consistente.

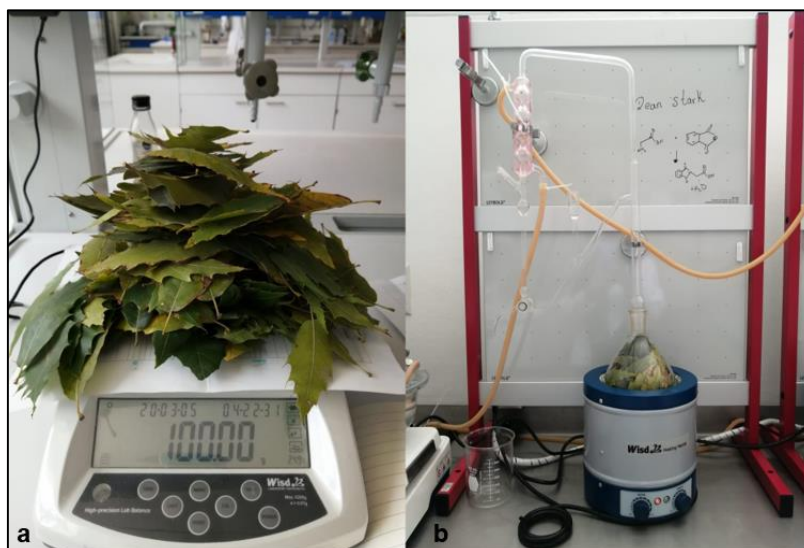


Figura 7. Proceso de extracción fundamentado en la destilación por arrastre de vapor, a) Pesado de material foliar (100g); b) Sistema de hidrodestilación Clavenger. (Foto B.M)

9.3 CG-EM

Una vez que se obtuvieron las extracciones de todos los cortes correspondientes a las tres temporadas definidas, se procedió a llevar las muestras al CG-EM. En el cromatograma de *Q. sartorii* se observa en el eje de las abscisas el tiempo que tardó la muestra en ser procesada o tiempo de retención que va de 0 a 60 min, representando la separación de compuestos de la mezcla, mientras que en el eje de las ordenadas se registra la información de la intensidad de la señal (mV).

Las alturas de los picos son proporcionales a la concentración del compuesto separado de la mezcla. Además, en las tres temporadas, la mayoría de los compuestos fueron detectados en un intervalo de 0 a 35 min. En los cromatogramas se registran varios picos cortos, es decir, compuestos de menor abundancia. Esto puede deberse a los cambios metabólicos propios de una temporada para los árboles, como ya ha sido reportado en estudios como el de Wang *et al.* (2016) en donde se menciona que los encinos de *Quercus variabilis* (Blume) disminuyen la emisión de COVs que pueden atraer o repeler insectos (por ejemplo, dependiendo de una temporada donde estos invertebrados se encuentren en poblaciones altas o bajas para una interacción ecológica adecuada, como en invierno). Pero pudiera ser también por el inicio de aparición de brotes de hojas nuevas para los encinos y esto repercute en la producción y liberación de COVs, favoreciendo distintas interacciones ecológicas (Niinemets *et al.*, 2004). Finalmente, como resultado se obtuvo para *Q. sartinii* la identificación de once compuestos principales con una representatividad mayor al 1% (Figura 8).

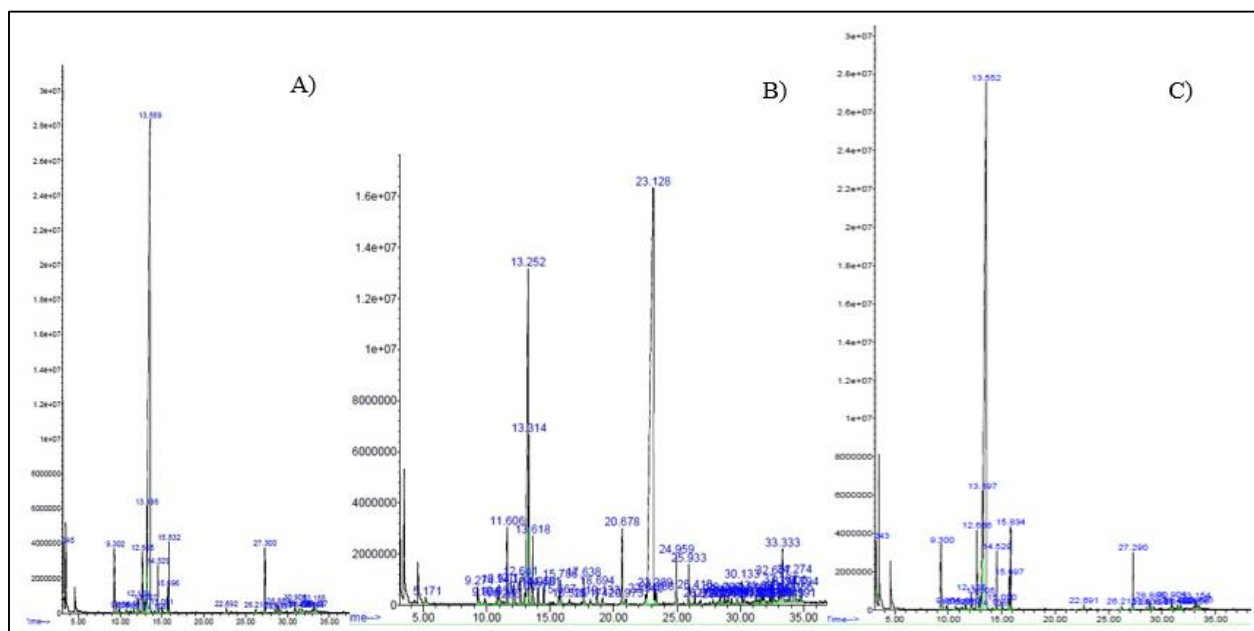


Figura 8. Cromatogramas generados a partir de los extractos de hojas de *Quercus sartinii*. Temporada indicada en A) invierno, B) primavera y C) verano, con un intervalo total de 0 a 60 min (tiempo de retención).

Cuadro 3. Compuestos presentes en el perfil químico de los extractos de hojas de *Q. sartorii*. Se enlistan los promedios del porcentaje de abundancia dentro de la muestra en cada temporada. Además, se etiquetan los nombres de los compuestos con palabras más cortas referidas entre comillas.

| Compuesto | Temporadas | | |
|---|------------|-----------|--------|
| | Invierno | Primavera | Verano |
| α pineno "alpi" | 4.15 | 0.79 | 1.91 |
| 2-metil-5- (1-metiletil) -biciclo [3.1.0] hex-2-eno "bihex" | 1.67 | 0 | 0 |
| 1-metil-4- (1-metiletil) -1,3-ci- clohexadieno "13cyc" | 6.26 | 0 | 0 |
| D-limoneno "dlim" | 5.94 | 14.48 | 17.79 |
| β mirceno "bmir" | 63.17 | 3.53 | 5.95 |
| 1-metil-4- (1-metiletil) -1,4-ci- clohexadieno "14cyc" | 3.60 | 0 | 0 |
| 2-metilisoborneol "2met" | 3.16 | 0 | 0 |
| 4-careno "4car" | 3.55 | 0 | 0 |
| 2-metil-5- (1-metiletenil) (S) -2-ci- clohexen-1-ona "2cyc" | 0 | 52.74 | 48.08 |
| 6,6-dimetil-2-metileno (1S) biciclo [3.1.1] heptano "bihep" | 0 | 3.91 | 3.74 |
| Acetato de mentilo "men" | 0 | 2.88 | 2.14 |

En la Figura 9a se ven representados los compuestos con sus respectivas abundancias en la temporada de verano, ya que es la de interés biológico; las medias que se encuentran en valor 0 representan los compuestos que no se detectaron en la temporada. Se denota a **2cyc** como el compuesto más representativo de la temporada de verano.

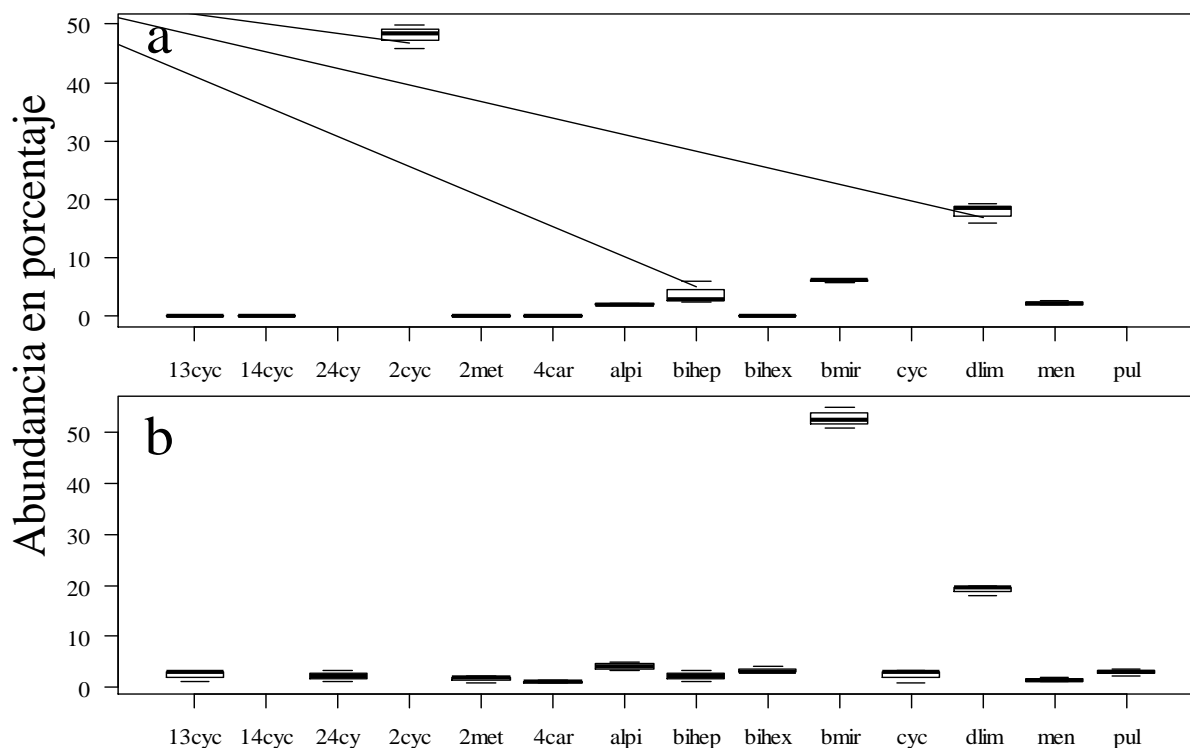


Figura 9. Gráfica de cajas y bigotes de *Q. sartorii* y *Q. grahamii*. Se muestra la abundancia de los compuestos en la temporada de verano.

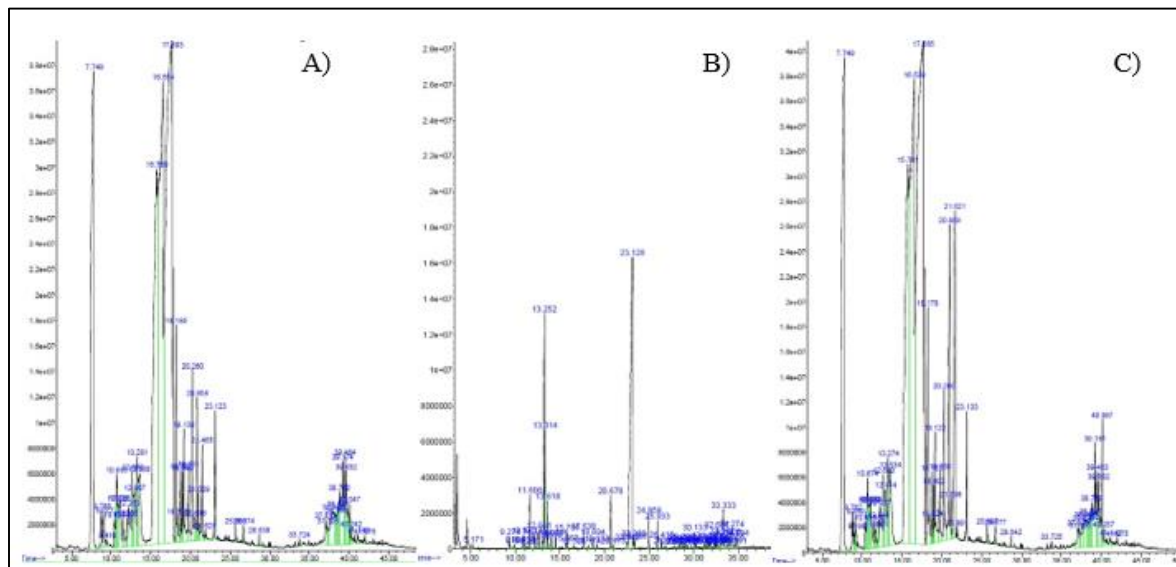


Figura 10. Cromatogramas generados a partir de los extractos de hojas de *Quercus grahamii*. Temporada indicada en A) invierno, B) primavera y C) verano, con un intervalo total de 0 a 60 min (tiempo de retención).

En el cromatograma de *Q. grahamii* (Figura 10) se pueden notar, al igual que en el de *Q. sartorii*, los cambios en la cantidad y altura de los picos, propio de cambios metabólicos dependientes de cada temporada como se explicó anteriormente; sin embargo, en estos cromatogramas se puede observar la diferencia de intensidad o tamaño de los picos, es decir, que para esta especie de encinos la emisión de COVs es mayor en las temporadas de invierno y verano en contraste con *Q. sarotrii*. Para *Q. grahamii* se detectaron un total de doce compuestos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Compuestos presentes en el perfil químico de los extractos de hojas de *Q. grahamii*. Se enlistan los promedios de abundancia dentro de la muestra de cada temporada. Además, se reetiquetan los nombres de los compuestos con los referidos entre comillas.

| Compuesto | Temporadas | | |
|---|------------|-----------|--------|
| | Invierno | Primavera | Verano |
| α pineno "alpi" | 0.99 | 3.03 | 3.37 |
| 2-metil-5- (1-metiletil) -biciclo [3.1.0] hex-2-eno "bihex" | 2.47 | 2.18 | 3.37 |
| 1-metil-4- (1-metiletil) -1,3-ci- clohexadieno "13cyc" | 1.15 | 2.38 | 2.32 |
| D-limoneno "dlim" | 15.90 | 18.10 | 19.09 |
| β -mirceno "bmir" | 52.61 | 48.14 | 52.86 |
| 2-metil-5- (1-metiletetil) -, trans, ciclohexanona "cyc" | 2.74 | 4.32 | 2.34 |
| 2-metilisoborneol "2met" | 1.09 | 1.66 | 1.60 |
| 4-careno "4car" | 1.46 | 2.36 | 1.01 |
| 2,6,6-trimetil-2,4-ciclohepta- dien-1-ona "24cyc" | 1.21 | 1.39 | 2.20 |
| Pulegona "pul" | 0 | 1.20 | 2.98 |
| 6,6-dimetil-2-metileno (1S) bi- ciclo [3.1.1] heptano "bihep" | 3.16 | 3.85 | 2.13 |
| Acetato de mentilo "men" | 1.76 | 0.13 | 1.46 |

En la Figura 9b se ven representados los compuestos detectados para *Q. grahamii* con sus respectivas abundancias en la temporada de verano, ya que es la de interés biológico. Se denota a **bmir** como el compuesto más representativo de la temporada de verano.

Se realizaron análisis estadísticos exploratorios y análisis de varianza junto con un modelo aditivo generalizado para determinar diferencias entre la abundancia de los compuestos que presentan en verano ambas especies, ya que es la temporada de interés biológico por la presencia de adultos de *M. mexicanus* en el medio. Con esta información podemos determinar que, de los 9 compuestos que comparten, **alpi**, **bihex**, **13cyc**, **2met**, **4car** y **men**, presentan diferencias en la abundancia para ambas especies, mientras que **dlim**, **bmir** y **bihep** no difieren (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza con modelo lineal generalizado.


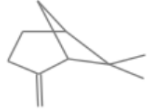
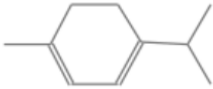
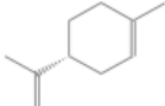
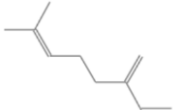
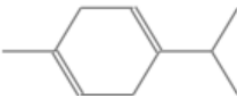
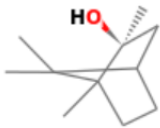
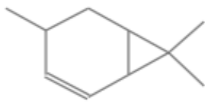
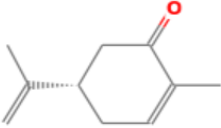
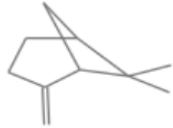
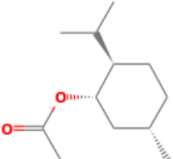
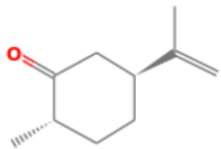
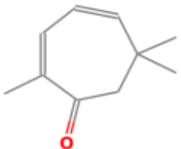
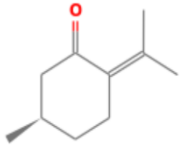
| Volátil | GL | Suma de cuadrados | Media de la suma de cuadrados | F | P |
|--------------|----|-------------------|-------------------------------|--------|-----------|
| bmir | 1 | 3300.4 | 3300.4 | 1601.7 | 2.329e-06 |
| residuales | 4 | 8.2 | 2.1 | | |
| alpi | 1 | 7.3704 | 7.3704 | 19.091 | 0.01197 |
| residuales | 4 | 1.5443 | 0.3861 | | |
| bihex | 1 | 17.0691 | 17.0691 | 123.27 | 0.0003744 |
| residuales | 4 | 0.5539 | 0.1385 | | |
| 13cyc | 1 | 8.0736 | 8.0736 | 12.356 | 0.02456 |
| residuales | 4 | 2.6136 | 0.6534 | | |
| dlim | 1 | 2.5350 | 2.5350 | 1.1884 | 0.3369 |
| residuales | 4 | 8.5328 | 2.1332 | | |
| 2met | 1 | 3.8560 | 3.8560 | 15.044 | 0.01786 |
| residuales | 4 | 1.0253 | 0.2563 | | |
| 4car | 1 | 1.54027 | 1.54027 | 50.974 | 0.002036 |
| residuales | 4 | 0.12087 | 0.03022 | | |
| bihep | 1 | 3.8882 | 3.8882 | 1.4895 | 0.2893 |
| residuales | 4 | 10.4415 | 2.6104 | | |
| men | 1 | 0.70042 | 0.70042 | 2.7585 | 0.1721 |
| residuales | 4 | 1.01567 | 0.25392 | | |

Ambas especies de encino comparten nueve compuestos los cuales son **alpi**, **bihex**, **13cyc**, **dlim**, **bmir**, **2met**, **4car**, **bihep**, y **men**. Teniendo *Q. sartorii* como exclusivo a **14cyc** y **2cyc**, mientras que *Q. grahamii* tiene como moléculas exclusivas a **cyc**, **24cyc** y **pul** (Cuadro 6).

Los compuestos **alpi**, **bmir** y **dlim** reportados en el perfil químico de *Q. sartorii* y *Q. grahamii* concuerdan con reportes de la presencia y liberación de estos COVs en otras especies de encino, como en *Q. suber*. Se sabe además que estos compuestos monoterpénicos varían en cantidad de liberación durante distintas temporadas del año y en su concentración, incluso en diferentes horas del día (Pio *et al.*, 2005). Esto concuerda con la variación de la presencia y abundancia de ambos compuestos en todas las temporadas de recolecta establecidas en el presente estudio. Es preciso señalar que Sánchez-Osorio (2008) detectó α -pineno, β -pineno, sabineno, limoneno y mirceno en hojas de *Q. suber*, explicando que a bajas concentraciones de limoneno (**dlim**) no había una infestación significativa de insectos. No obstante, esto es contradictorio con la interacción entre *M. mexicanus* y *Q. sartorii*, porque en la temporada de verano es cuando hubo una liberación mayor de este compuesto, lo cual podría estar favoreciendo la atracción. Nieves-Silva y Romero-López (2019) generaron el perfil químico del azumiate, planta hospedera de los adultos de *M. nigripes*. Al igual a lo encontrado en las hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii*, estos autores citaron α pineno y β - pineno como parte de los COVs de hojas de *B. salicifolia*, a los cuales se les atribuye la atracción de esa especie de coleópteros. Esto podría estar sucediendo con los adultos de *M. mexicanus*.

En cuanto al compuesto acetato de mentilo (**men**) que también se presenta en todas las temporadas de muestreo, no se manifiesta su presencia en otras especies de *Quercus*, pero sí destaca su importancia medicinal, ya que es común encontrar este compuesto en altas cantidades en plantas como *Mentha piperita* (L.) (menta) (Calapai *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Estructuras bidimensionales de los compuestos presentes en el perfil químico de los extractos de hojas de *Q. grahamii* y *Q. sartorii*.

| | |
|---|---|
|  |  |
| <p>α-pineno "alpi"</p> | <p>2-metil-5- (1-metiletil) -biciclo [3.1.0] hex-2-eno "bihex"</p> |
|  |  |
| <p>1-metil-4- (1-metiletil) -1,3-ciclohexadieno "13cyc"</p> | <p>D-Limoneno "dlim"</p> |
|  |  |
| <p>β-mirceno "bmir"</p> | <p>1-metil-4- (1-metiletil) -1,4-ciclohexadieno "14cyc"</p> |
|  |  |
| <p>2-metilisoborneol "2met"</p> | <p>4-careno "4car"</p> |
|  |  |
| <p>2-metil-5- (1-metiletenil) (S) -2-ciclohexen-1-ona "cyc"</p> | <p>6,6-dimetil-2-metileno (1S) biciclo [3.1.1] heptano "bihep"</p> |
|  |  |
| <p>Acetato de mentilo "men"</p> | <p>2-metil-5- (1-metiletenil) -, trans, ciclohexanona "2cyc"</p> |
|  |  |
| <p>2,6,6-trimetil-2,4-cicloheptadien-1-ona "24cyc"</p> | <p>Pulegona "pul"</p> |

No se han encontrado reportes para especies de *Quercus* que presenten **4car**; sin embargo, Meeningen *et al.* (2017) informan sobre la presencia del terpeno 3-careno en *Q. robur*. La coincidencia se puede deber a la detección de similitud por isomería por parte de la biblioteca utilizada en el espectro de masas (Figura 11).

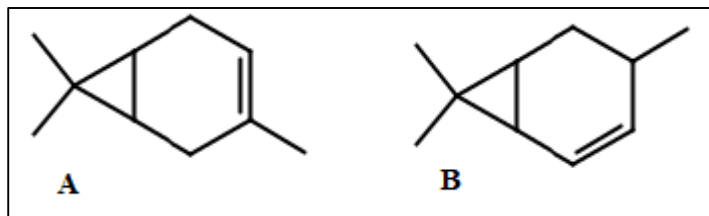


Figura 11. A) 3 careno y B) 4 careno

Tanto **4car**, **2met**, **14cyc**, **13cyc** y **bihex** fueron los compuestos que solo se presentaron en la temporada de invierno para *Q. sartorii* y no se les atribuye alguna actividad biológica relacionada con atracción o repelencia de insectos fitófagos, salvo **bihex**, al cual se le atribuyen actividades larvicidas en *Aedes aegypti* L. (mosquito de la fiebre amarilla) (Sefeer y Elumalai, 2018) y si está presente en el perfil químico de verano de *Q. grahamii*. Algunos reportes de estos compuestos los refieren más a actividad metabólica y aplicaciones farmacéuticas (Li *et al.*, 2010), lo que concuerda con que no se presenten en la etapa de emergencia de adultos de *M. mexicanus*. Al **2cyc** tampoco se le refiere con actividad biológica en insectos fitófagos a pesar de estar presente tanto en la temporada de primavera como de verano. Se destaca la situación del **bihep** (también conocido como β -pineno en conjunto con α - pineno), ya que es un componente generalmente empleado en actividades de control biológico contra adultos de los coleópteros *Dendroctonus mexicanus* Hopkins; además se sabe que este compuesto forma parte del perfil químico de sus plantas hospederas, entre ellas especies de bosques de coníferas (Díaz-Núñez *et al.*, 2006). El compuesto **24cyc**, que es solo del perfil químico de *Q. grahamii*, también es denominado como eucarvol y ha sido reportado en especies como el almendro *Prunus dulcis* (Mill) (De la Fuente, 2007). Sin embargo, no se encuentra reportado para especies de encino. Este compuesto tiene referencias farmacéuticas ya que se utiliza como componente de pastillas para el tratamiento de enfermedades digestivas relacionadas con síndrome de intestino irritable y no se reportan interacciones ecológicas (Hübner y Moser, 2002).

Melissa officinalis (L.) es comúnmente conocida como “limoncillo” y es una planta que cuenta en su perfil químico con el metabolito **cyc**. No hay registros de este para alguna especie de encino, pero se conoce que forma parte del aceite esencial de esta planta y que tiene propiedades antibacteriales (Jafari, 2006). Finalmente, **pul** es un terpeno al igual que todas las moléculas obtenidas ha sido reportado para *Quercus brantii* var. *persica* (Jaub. & Spach); sin embargo, este se ha extraído de zonas maderables del encino y no de las estructuras foliares, presentando actividad antimicrobiana (Karimian *et al.*, 2020).

9.4 Acoplamiento molecular

9.4.1 Selección de OBPs

Se realizó una búsqueda bibliográfica donde se describieran OBPs de especies filogenéticamente emparentadas con *M. mexicanus* para su análisis con las catorce moléculas ligando de los perfiles químicos de ambas especies de encino. Esta búsqueda dio como resultado la elección de las proteínas HELEOBP descritas por González-González *et al.* (2016) para *H. elegans* (Figura 12a), el cual es también un miembro de la familia Melolonthidae. Estos coleópteros cuentan con estructuras antenales similares a las de *M. mexicanus* como la forma característica laminada, dividida en lámina proximal, lamina media y lamina distal (Figura 12b), además de las mismas células especializadas para la quimio-recepción como las sensilas tricoideas, basicónicas y placoideas (Figuras 13 y 14) (Mutis *et al.*, 2014; Martínez-Bonilla *et al.*, 2015).

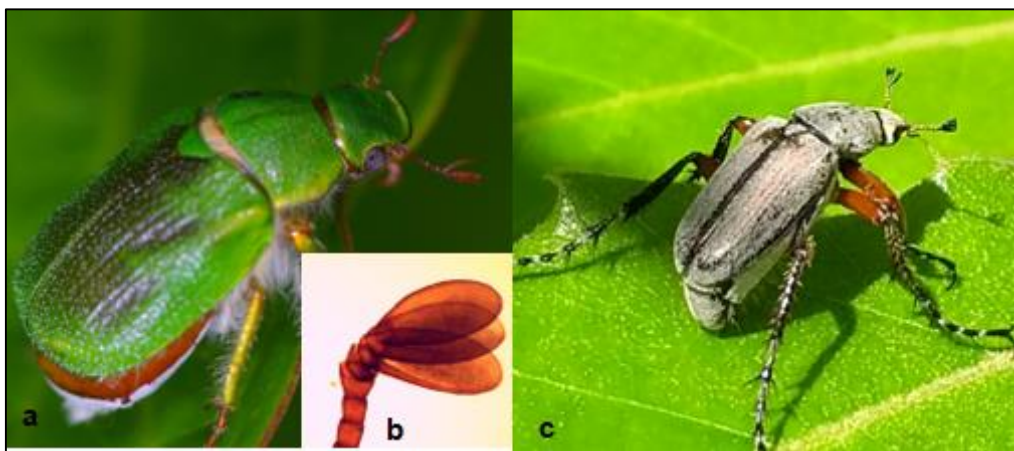


Figura 12. Se observa en a) *H. elegans* (Foto: Ernesto Cisternas), b) estructura antenal laminar presente en ambas especies y c) *M. mexicanus*.

Estas células placoideas son las más referidas en cuestión de quimio-recepción siendo constituyentes principales del sistema sensorial olfativo de los escarabajos y en las mismas es donde podemos localizar las OBPs. Se sabe además que tanto para especies de *M. mexicanus* como de *H. elegans* las células placoideas se encuentran en mayor abundancia en las antenas de los machos que de las hembras, lo cual indica que tienen la capacidad de encontrar y reconocer las feromonas de una pareja conespecífica y los volátiles característicos de su planta hospedante (Mutis, 2014).

Las OBPs elegidas para el presente trabajo fueron la HELEOBP1, HELEOBP3 y HELEOBP4 por sus características distintivas tanto en abundancia entre machos y hembras como en presencia en zonas bucales o antenales de los escarabajos, lo cual permite inferir algunos patrones de comportamiento en la interacción encino-escarabajo. La HELEOBP1 se encuentra de manera natural más asociada a antenas y se halla en porcentajes iguales tanto para hembras como para machos. La HELEOBP3 se encuentra en zonas antenales, pero es asociada más a hembras que a machos; esto pudiera explicar ciertos comportamientos asociados a hembras de Melolonthidae como la búsqueda de sitios de alimentación en las plantas hospederas y sitios de oviposición (González-González *et al.*, 2019). Finalmente, la HELEOBP4 está más asociada a zonas bucales, aunque también puede encontrarse en las antenas. Además, es una OBP referida en mayor proporción en antenas de machos que de hembras, lo que pudiera estar relacionado con la identificación de volátiles de plantas hospederas y de feromonas sexuales (González-González *et al.* 2016).

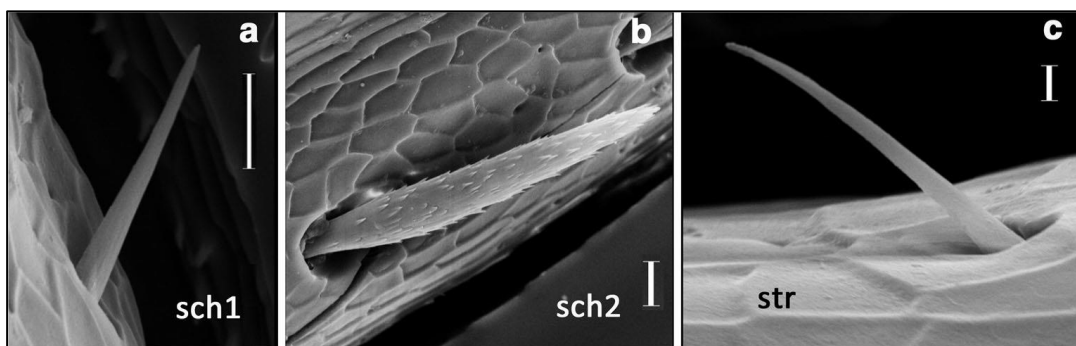


Figura 13. Sensilas de *H. elegans*. Se observan a) quimiorreceptores quéticos, b) tricoideos y c) placoideos (Mutis *et al.*, 2014).

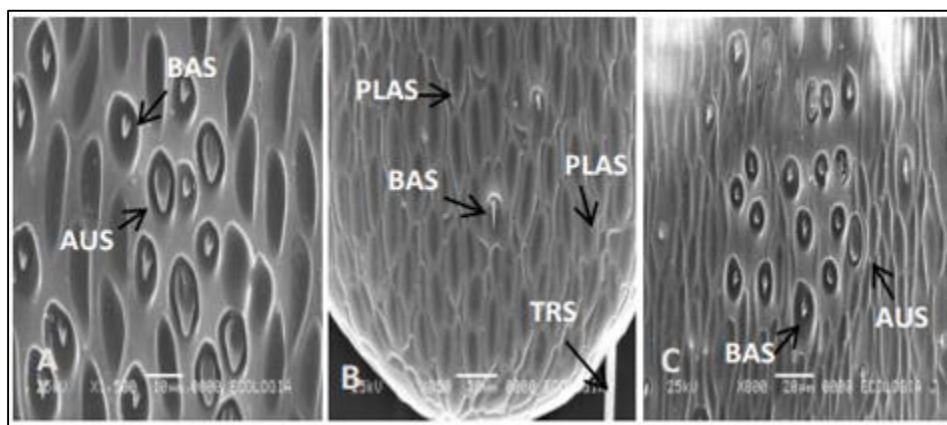


Figura 14. Sensilas de *M. mexicanus*. Se observan A) sensilas auricólicas (AUS) y basicónicas (BAS). B) Placoideos (PLAS), tricoideos (TRS) y BAS. C) Superficie de la cara interna de la lamela proximal (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015).

9.4.2 Análisis energético

Una vez definidas las OBPs a trabajar, se llevó a cabo el proceso del Docking para las catorce moléculas que componen los perfiles químicos de ambas especies de encino. El docking se realizó con 100 repeticiones de cada proteína con cada molécula y se eligieron las que obtuvieron mejor energía de acoplamiento (kcal/mol) utilizando los programas AutoDock Vina[®].

En la Figura 15 se puede observar los 14 compuestos detectados en las especies de encino y la energía de afinidad que obtuvieron al realizar el docking con la HELEOBP1. En cuanto a energía de afinidad **pul** del perfil de *Q. grahamii*, es la que cuenta con una mayor interacción con la proteína y no la comparte con *Q. sartorii* lo que convierte esta interacción en específica; sin embargo, relacionando esta molécula con su abundancia en la época de verano no es la más representativa. Para *Q. grahamii* la molécula con mayor abundancia es el **bmir** con un 52.86% en la temporada de verano (que es la de interés biológico) y con esta primera OBP tiene una energía de afinidad del -6.5 kcal/mol, por lo que se intuye que esta podría ser la molécula más relevante en cuestión de abundancia. El **14cyc** es un compuesto presente únicamente para *Q. sartorii* y cuenta con una energía de acoplamiento de -6.6 kcal/mol, aunque este compuesto no se encuentra presente en la temporada de verano, lo que pudiera sugerir que este compuesto sirve de atrayente para insectos que se encuentren en las temporadas de invierno y primavera y formen parte de otras interacciones biológicas. El compuesto más abundante para *Q. sartorii* en la temporada de verano

es **2cyc** además que no lo comparte con el perfil de *Q. grahamii*; esto indica que puede ser un compuesto relevante además de específico para la interacción con *M. mexicanus*. Aunado a esto, cuenta con la mejor energía de acoplamiento de -6.7 kcal/mol.

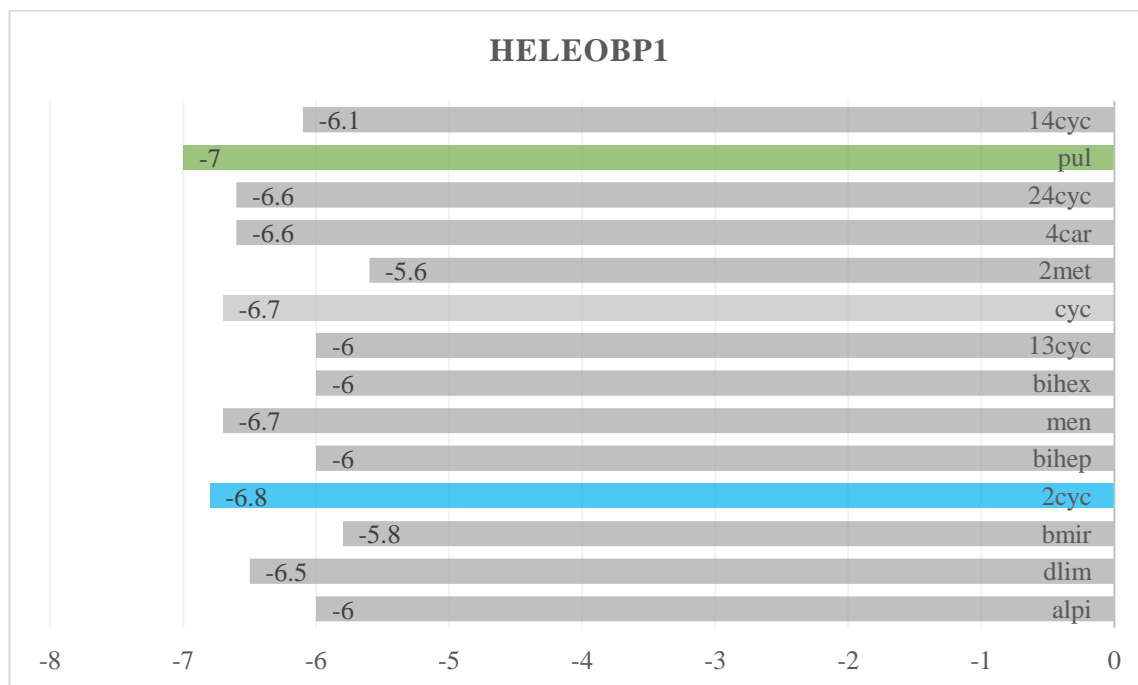


Figura 15. Acoplamiento molecular con HELEOBP1. Docking entre los compuestos de los perfiles químicos de ambas especies de *Quercus*. Se resalta pul (verde) con mayor energía de acoplamiento para *Q. grahamii* y 2cyc (azul) con mayor energía de acoplamiento para *Q. sartorii*.

Para la HELEOBP3 (Figura 16), el compuesto con mayor energía de acoplamiento es **men**, el cual se encuentra presente en ambos perfiles de las especies bajo estudio. Sin embargo, en lo referente a su abundancia en la temporada de verano, es el sexto más abundante para *Q. sartorii* lo que pudiera indicar que a bajas concentraciones es perfectamente detectable por el insecto dado el acoplamiento receptor-ligando. En cambio, para *Q. grahamii* es el noveno en abundancia durante verano, pudiendo ser que para ambas especies a bajas concentraciones esta proteína puede acoplarse a **men**. Es importante resaltar que **2cyc** es el segundo compuesto con mayor energía de acoplamiento con esta OBP reforzando que es específico solo para *Q. sartorii* y relevante para la interacción con *M. mexicanus*.



Figura 16. Acoplamiento molecular con HELEOBP3. Docking entre los compuestos de los perfiles químicos de ambas especies de *Quercus*. Se resalta **men** (verde) con mayor energía de acoplamiento para *Q. grahamii* y *Q. sartorii*. Como segundo compuesto con mayor energía de acoplamiento se encuentra **2cyc** (azul) único para *Q. sartorii*.

Para la HELEOBP4 (Figura 17) el compuesto con mayor afinidad fue **cyc** que es único del perfil químico de *Q. grahamii* y el quinto en abundancia, lo que indica que es específico de la especie y podría ser importante para la relación con *M. mexicanus* a pesar de su baja concentración en el ambiente. El **4car** el segundo con mejor energía de afinidad con esta OBP sin embargo se encuentra en abundancia baja para *Q. grahamii* y no se presenta este compuesto en la temporada de verano en el perfil de *Q. sartorii*. Pasa lo mismo con el compuesto **2met**, el cual no se encuentra en verano para *Q. sartorii* pero si en bajas concentraciones para *Q. grahamii*, entonces se puede sugerir que este compuesto a bajas concentraciones es perfectamente detectable por esta OBP. Finalmente, **2cyc** vuelve a contar con una buena energía de afinidad con esta OBP confirmando que puede ser un compuesto sumamente relevante en la interacción entre *M. mexicanus* con *Q. sartorii*

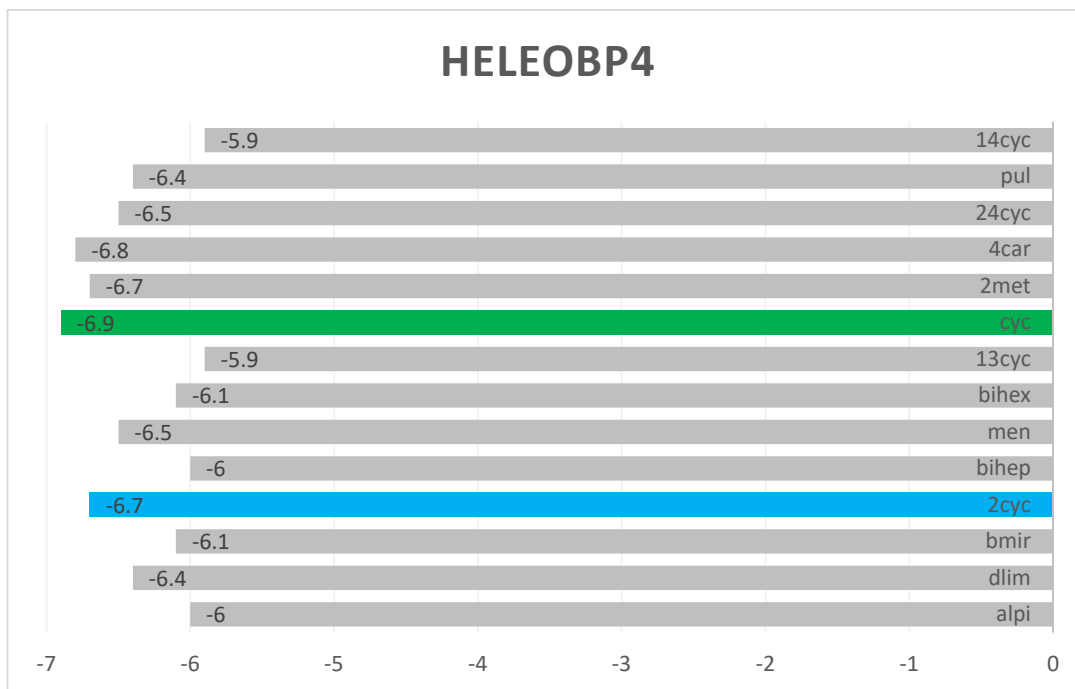


Figura 17. Acoplamiento molecular con HELEOBP4. Docking entre los compuestos de los perfiles químicos de ambas especies de *Quercus*. Se resalta **cyc** (verde) con mayor energía de acoplamiento para *Q. grahamii*. Finamente empatados **2met** y **2cyc** (azul) siendo este último único para *Q. sartorii*.

Con todo lo anterior, se infiere que, en cuestión de energía de acoplamiento para la HELEOBP1, las moléculas con mayor relevancia fueron **pul** para *Q. grahamii* y **2cyc** para *Q. sartorii*. En estudios *in vivo* podríamos verificar si esta molécula causa un comportamiento de atracción y agregación en individuos de *M. mexicanus*, tanto hembras como machos. Para la HELEOBP3 las moléculas con mayor relevancia fueron para *Q. grahamii* **men** y para *Q. sartorii* la **2cyc**. Con estas moléculas en bioensayos se podría esperar comportamientos como búsqueda de sitios de oviposición y alimentación por parte de las hembras y que serían detectadas en mayor proporción por hembras que por machos. Finalmente, para la HELEOBP4 las moléculas con mayor relevancia fueron para *Q. grahamii* la **cyc** y para *Q. sartorii* nuevamente **2cyc**. Con esto se esperaría que en individuos de *M. mexicanus* desencadenen comportamientos de atracción y agregación en mayor medida para machos que para hembras.

Todas las moléculas obtenidas en el perfil químico de ambas especies de *Quercus* son del grupo de los terpenos y como se menciona en el estudio de González-González *et al.* (2016), se

sugiere el uso de derivados del isopreno para tratar poblaciones de plagas como por ejemplo las especies de Melolonthidae, ya que tienen una alta energía de acoplamiento con las OBPs reportadas.

9.4.3 Análisis secuencial

Aunado al acoplamiento molecular se realizó un análisis de alineamiento entre las secuencias de las tres OBPs bajo estudio. En este se pueden localizar zonas altamente conservadas, lo que sugiere que estas mismas proteínas pueden presentarse en las antenas de *M. mexicanus*, encontrando aminoácidos con propiedades químicas similares en las mismas posiciones. Esto es importante porque explica el tipo de interacción que puede surgir entre las OBPs y los ligandos. (Figura 18).

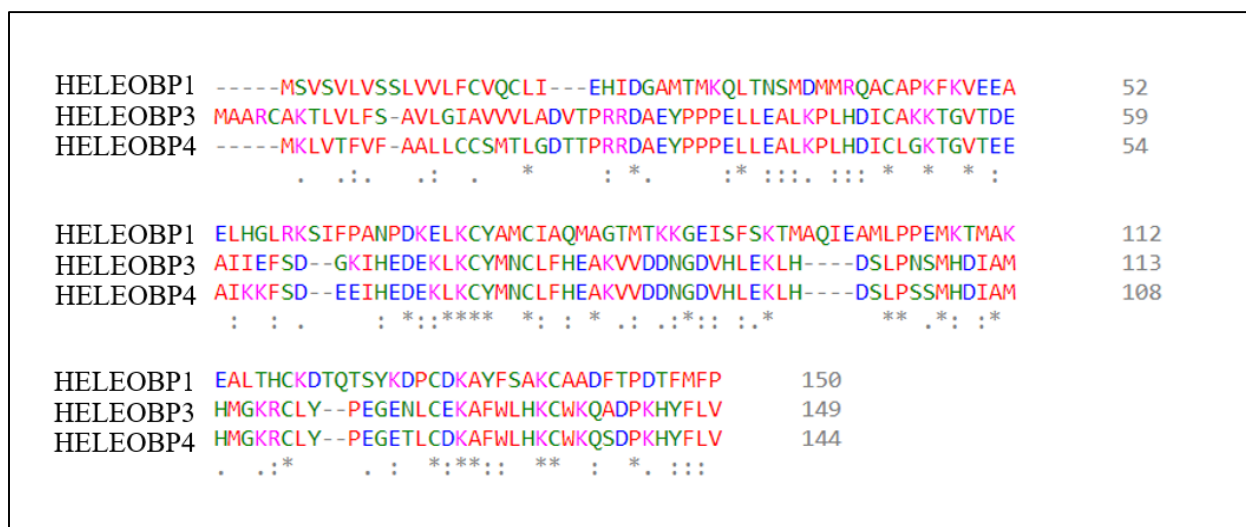


Figura 18. Alineamiento. Se observa el alineamiento entre las tres OBP bajo estudio, donde los colores significan: rojo: interacción hidrofóbica y aromáticos; azul: interacción acida; magenta, interacción básica; H; verde: interacción con hidroxilo; gris: aminoácido inusual. Los símbolos significan: (*) posición de residuo altamente conservada, (:) indica conservación entre grupos con propiedades altamente similares y (.) indica conservación entre grupos con propiedades levemente similares.

Como porcentajes de similitud se obtuvo que la HELEOBP1 concuerda en 21.85% con la HELEOBP3 y 81.82% con la HELEOBP4, mientras que la HELEOBP3 concuerda en 24.71% con la HELEOBP4; el alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa Clustal®.

9.4.4 Análisis de residuos aminoacídicos

Como parte del análisis de acoplamiento molecular, se llevaron a cabo revisiones en diagramas 2D donde se observan los residuos aminoacídicos de las OBPS que participan en el acoplamiento con cada ligando (Figuras 19 a la 30). En cada diagrama se puede observar los aminoácidos con la interacción química que los une a los ligandos señalados en distintos colores.

Para la HELEOBP1 se registraron un total de 19 residuos aminoacídicos (Cuadro 7). El que tuvo mayor número de interacción, es decir que se encuentra participando en la unión proteína-ligando de las catorce moléculas es la TRP114, la mayoría por unión alquímica. Seguido de este en trece interacciones se encuentra la PHE123, por unión de Vander Waals o alquímicas. Esto nos muestra zonas conservadas importantes para la unión de ligandos. Como se menciona en el estudio de Zhuang *et al.* (2014).

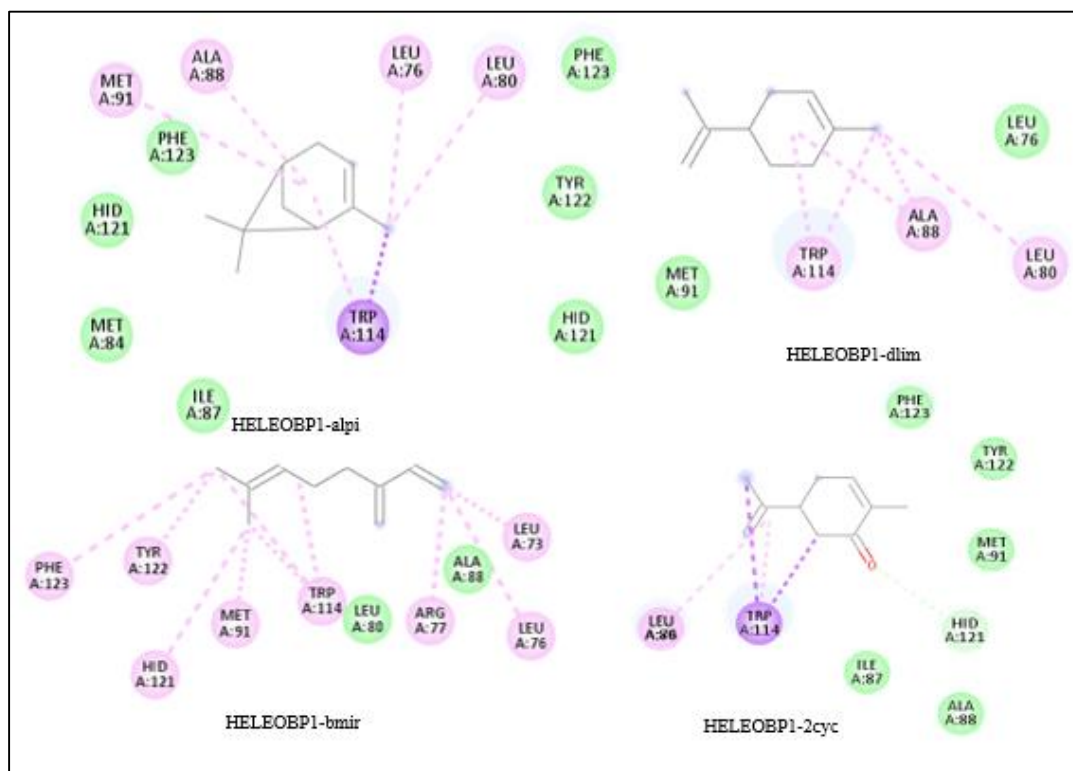


Figura 19. Interacción 2D HELEOBP1 con alpi, dlim, bmir, 2cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquímicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

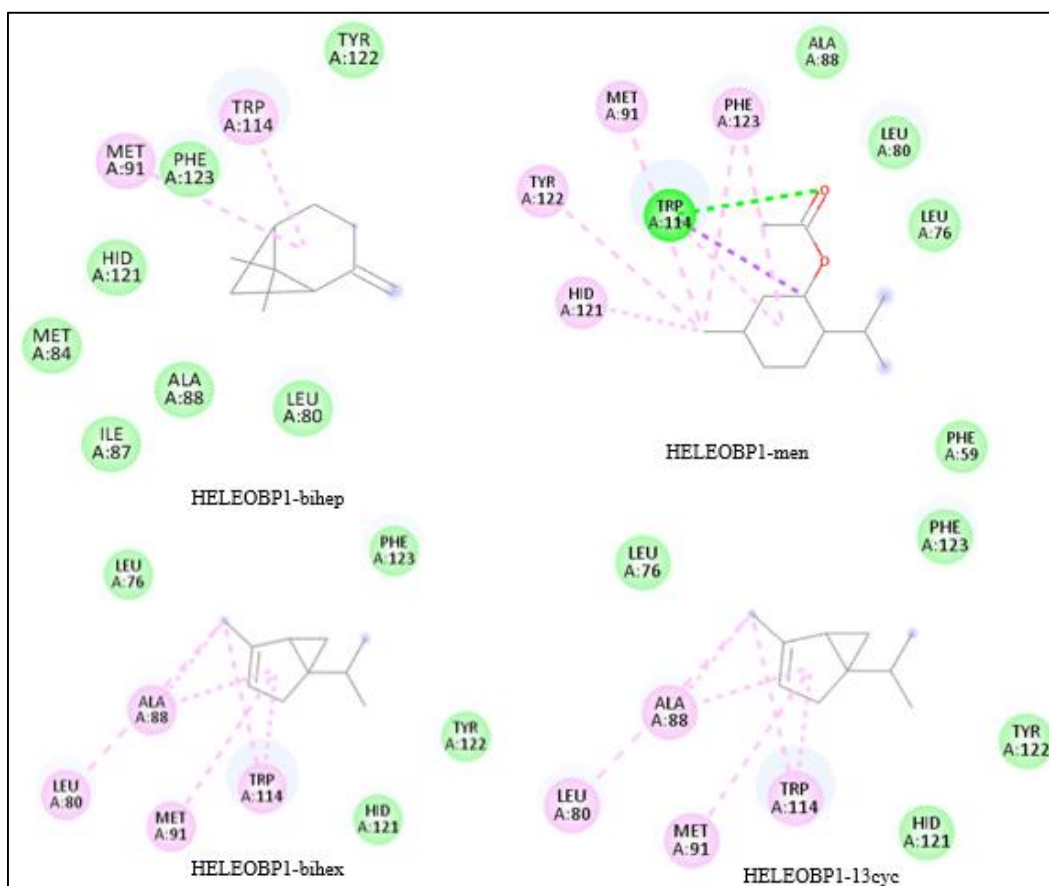


Figura 20. Interacción 2D HELEOBP1 con bihep, men, bihex, 13cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, verde intenso) enlace de hidrógeno, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

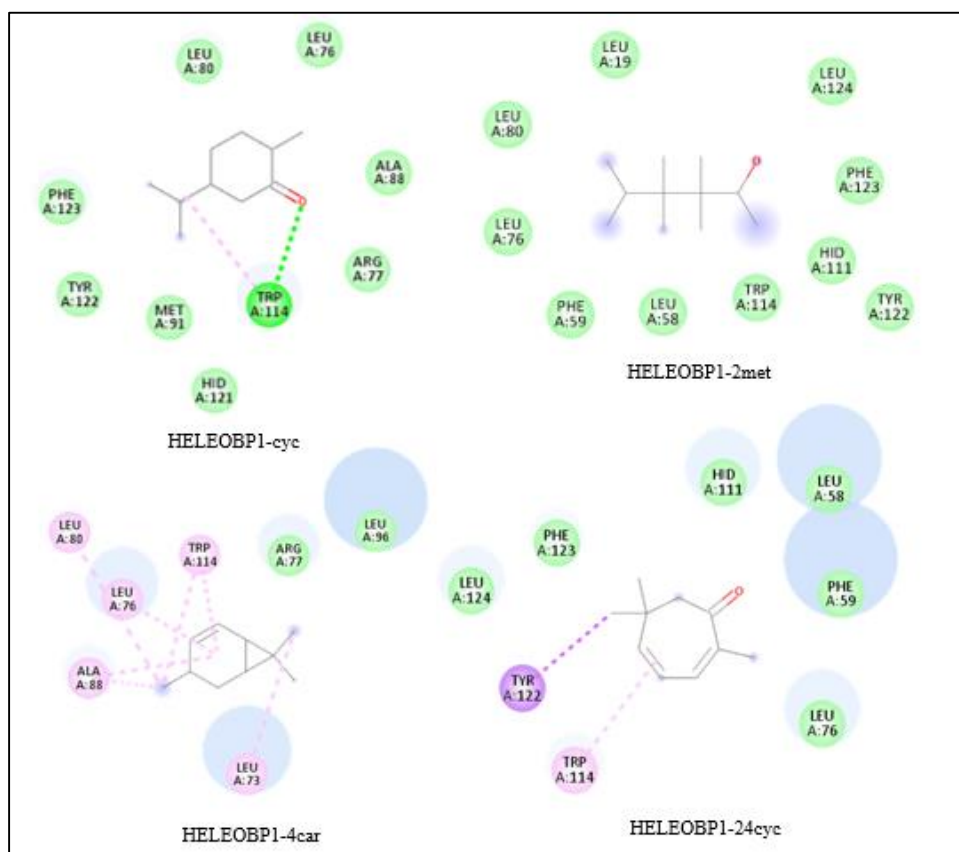


Figura 21. Interacción 2D HELEOBP1 con cyc, 2met, 4car y 24cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, verde intenso) enlace de hidrógeno, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

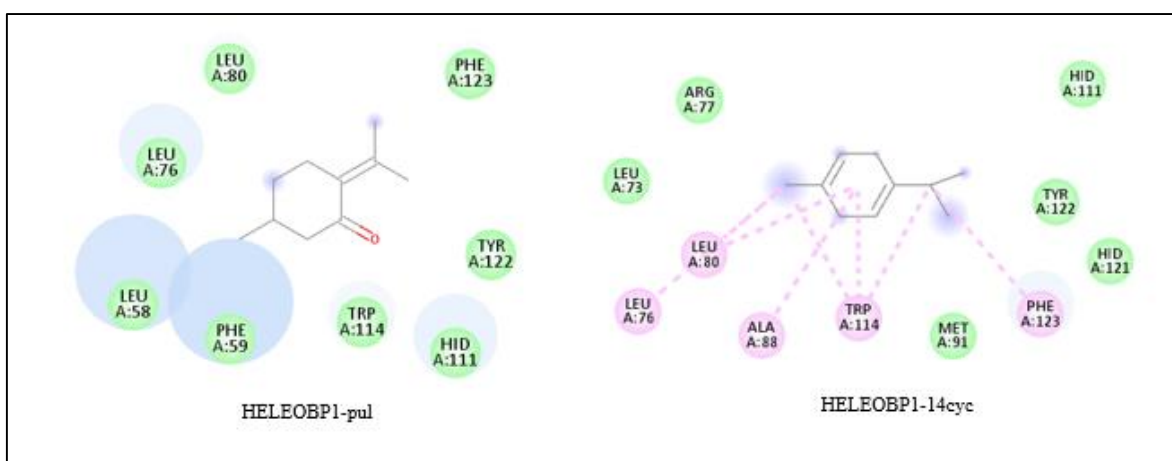


Figura 22. Interacción 2D HELEOBP1 con pul y 14cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

Cuadro 7 Residuos aminoacídicos con los que interactúan cada compuesto de especies de *Quercus* con la HELEOBP1.

| Ligando | Aminoácidos |
|----------------|--|
| alpi | ALA88, LEU76, PHE123, LEU80, MET91, HID121, MET84, ILE87, TRP114 |
| dlim | PHE123, TYR122, MET91, HID121, TRP14, ALA88, LEU80, LEU76 |
| bmir | PHE123, TYR122, MET91, HID121, TRP14, ALA88, LEU80, LEU76, LEU73, ARG77 |
| 2cyc | PHE123, TYR122, MET91, HID121, TRP14, ALA88, LEU76, ILE87 |
| bihep | TYR122, TRP114, PHE123, MET 91, HID121, MET84, ALA88, LEU80, ILE87 |
| men | TYR122, MET91, PHE123, ALA88, LEU80, LEU76, TRP114, HID121, PHE59 |
| bihex | LEU76, PHE123, ALA88, LEU80, MET91, TRP114, HID121, TYR122 |
| 13cyc | ALA88, ARG77, LEU73, LEU76, LEU80, TRP114, PHE123, HID111, TYR122, HID121, MET91 |
| cyc | LEU76, LEU80, ALA88, ARG77, TRP114, MET91, HID121, TYR122, PHE123 |
| 2met | LEU19, LEU80, LEU76, PHE59, LEU58, TRP114, HID11, TYR122, PHE123, LEU124 |
| car | LEU80, LEU76, TRP114, ARG77, LEU96, ALA88, LEU73 |
| 24cyc | LEU124, PHE123, HID111, LEU58, PHE59, TYR122, TRP114, LEU76 |
| pul | LEU80, PHE123, LEU76, LEU58, PHE59, TRP114, HID111, TYR122 |
| 14cyc | ARG77, LEU73, HID111, LEU80, LEU76, ALA88, TRP114, MET91, PHE123, HID121, TYR122 |

Para la HELEOBP3 se registraron 27 aminoácidos (Cuadro 8), de los cuales concuerda en la PHE123 y ALA88 con la HELEOBP1. Los demás se encuentran en distintas posiciones, pero cuentan con las mismas características químicas como la apolaridad y que en su mayoría las interacciones que se pueden observar en los esquemas son de tipo alquílicas y de van der Waals. El aminoácido que interactuó con los 14 ligandos es THR69, el cual es de naturaleza polar, seguido por la PHE121. Se puede dilucidar que la diferencia tan drástica en los residuos de aminoácidos que interactúan en la HELEOBP1 con la HELEOBP3 viene desde la diferencia de secuencias de aminoácidos entre ambas proteínas, ya que como se mencionó en el análisis secuencial solo coinciden en un 21.85%.

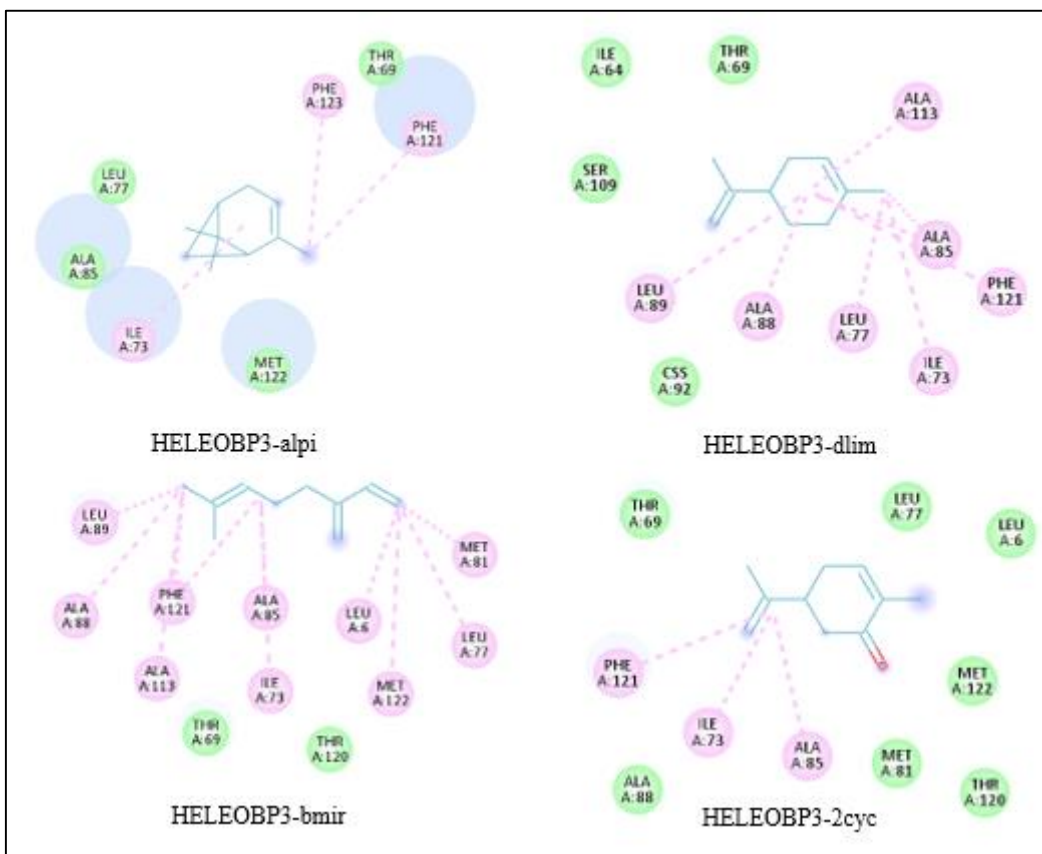


Figura 23. Interacción 2D HELEOBP3 con alpi, dlim, bmir, 2cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

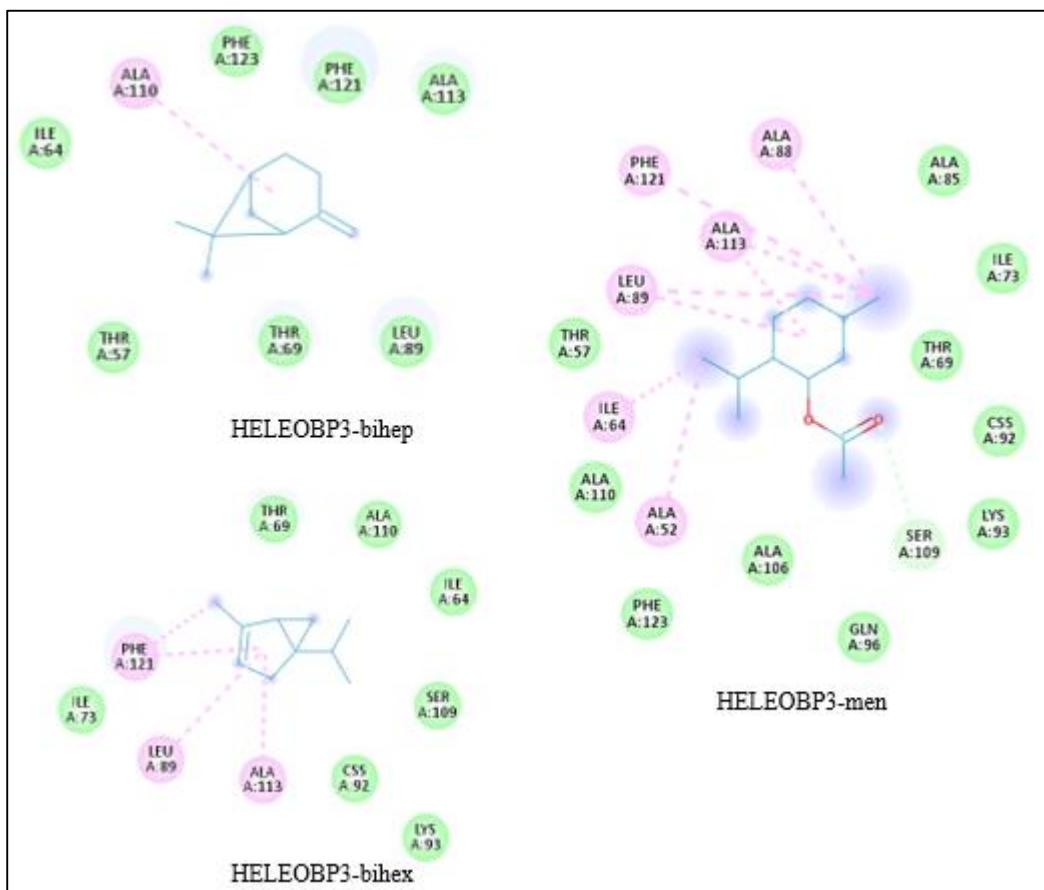


Figura 24. Interacción 2D HELEOBP3 con bihep, men y bihex. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

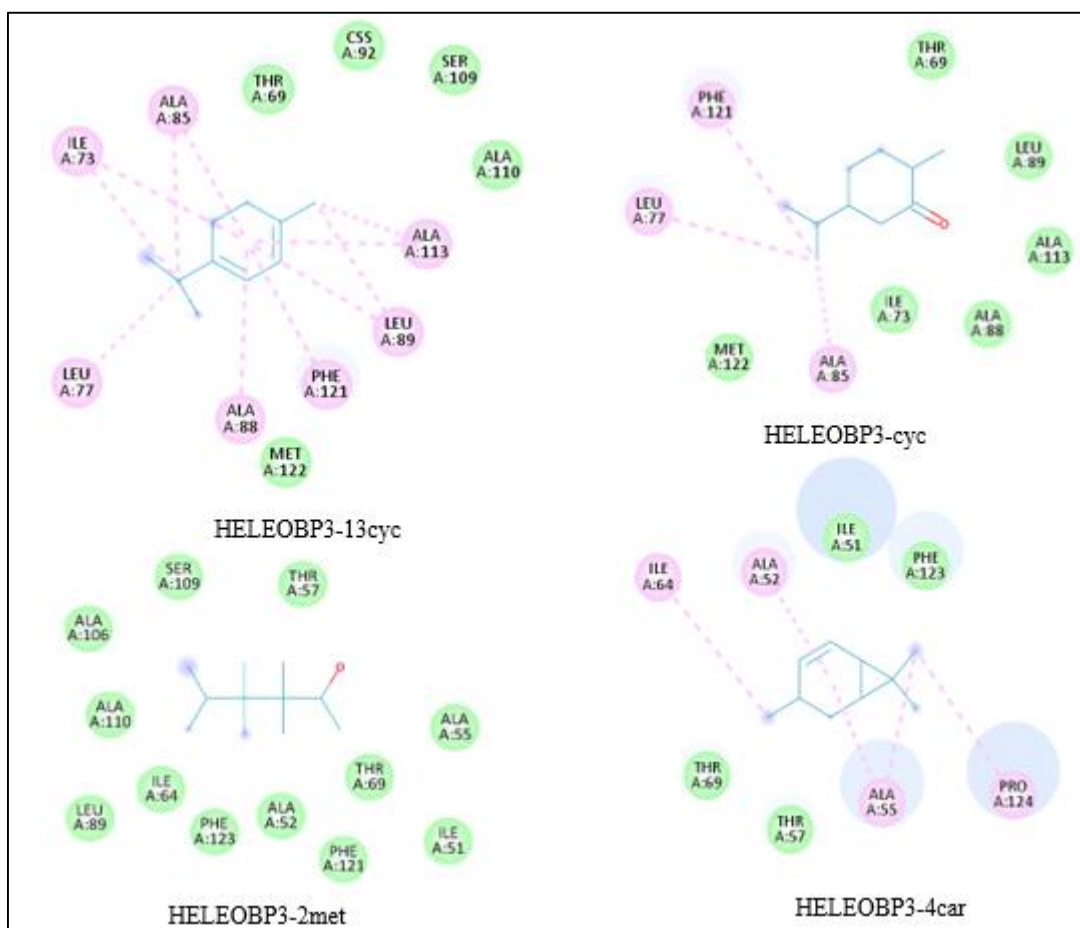


Figura 25. Interacción 2D HELEOBP3 con 13cyc, cyc, 2met y 4car. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

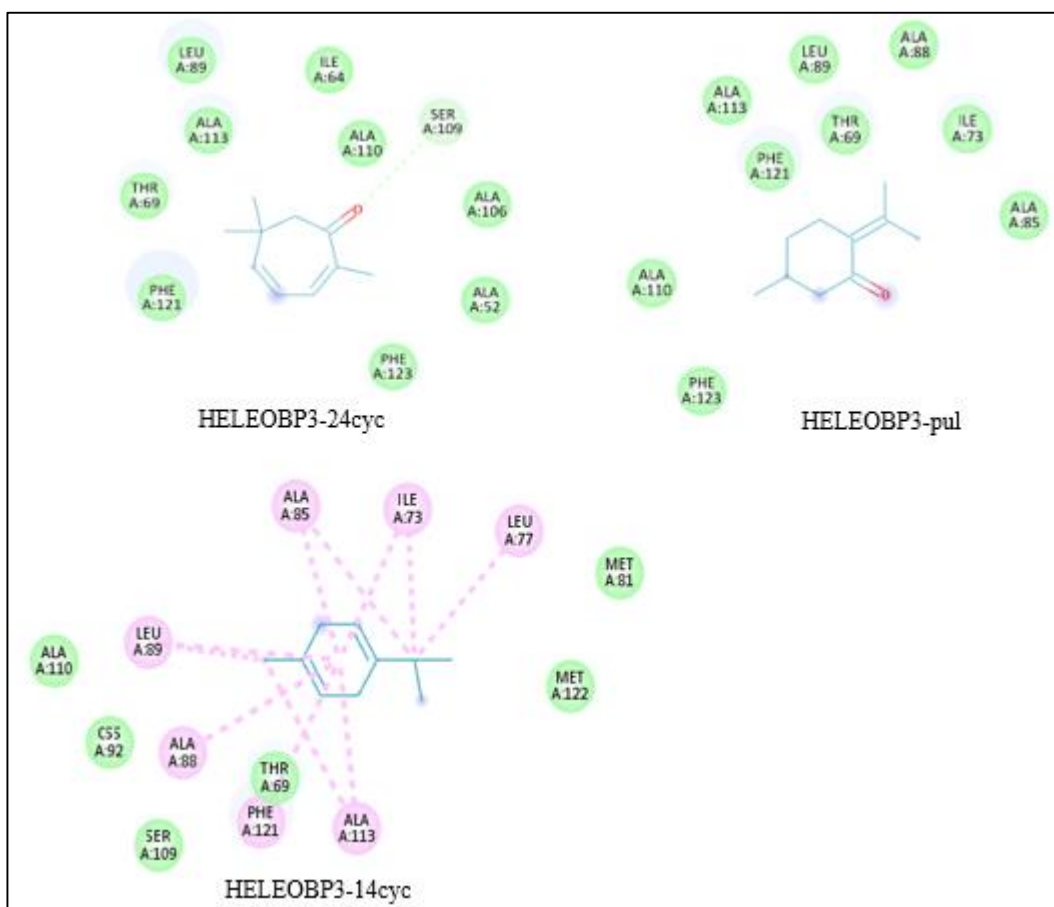


Figura 26. Interacción 2D HELEOBP3 con 24cyc, pul y 14cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

Cuadro 8. Residuos aminoacídicos con los que interactúan cada compuesto de especies de *Quercus* con la HELEOBP3

| Ligando | Aminoácidos |
|---------|--|
| alpi | THR69, PHE121, PHE123, LEU77, ALA85, ILE73, MET22 |
| dlim | ILE64, THR69, SER109, ALA113, ALA85, PHE121, LEU89, ALA88, LEU77, ILE73, CSS92 |
| bmir | LEU89, ALA88, PHE121, ALA113, ALA85, ILE73, THR69, THR120, MET122, LEU6, LEU77, MET82 |
| 2cyc | THR69, PHE121, ILE73, ALA88, ALA85, MET81, THR120, MET122, LEU6, LEU77 |
| bihep | ALA110, PHE123, PHE121, ALA113, ILE64, THR57, THR69, LEU89 |
| men | ALA88, PHE121, ALA113, ALA85, OLE73, LEU89, THR57, OLE64, THR69, OLE64, ALA110, ALA52, ALA106, PHE123, GLIN96, SER109, LYS93 |
| bihex | THR69, ALA110, ILE64, PHE121, ILE73, LEU89, ALA113, CSS92, LYS93, SER109 |

| | |
|--------------|--|
| 13cyc | ILE73, ALA85, THR69, CSS92, SER109, ALA110, ALA113, LEU89, PHE121, ALA88, MET122, LEU77 |
| cyc | THR69, LEU89, ALA113, ALA88, ILE73, ALA85, MET122, LEU77, PHE121 |
| 2met | SER109, THR57, ALA106, ALA110, ILE64, LEU89, PHE123, ALA52, PHE121, THR69, ALA55, ILE51 |
| car | ILE64, ALA52, ILE51, PHE123, THR69, THR57, ALA55, PRO124 |
| 24cyc | LEU89, ILE64, ALA110, SER109, ALA106, ALA52, PHE123, PHE121, THR69, ALA113 |
| pul | LEU89, ALA88, PHE121, ALA113, ALA85, THR69, ALA110, PHE123, ILE73 |
| 14cyc | ALA85, ILE73, LEU77, MET81, MET122, LEU89, ALA110, CSS92, ALA88, THR69, ALA113, PHE121, SER109 |

Para la HELEOBP4 se reportan 28 residuos aminoacídicos que interactúan con los ligandos (Cuadro 9). Esto coincide con la HELEOBP1 con 19 y con la HELEOBP3 con 2. Además, cuenta con 9 uniones en posiciones diferentes a las otras OBPs. Esto se puede analizar desde la secuencia, ya que cuenta con un 81.82% de similitud con la HELEOBP1. El aminoácido con más interacciones con los ligandos fue la TRP114 que se encuentra en todas las interacciones excepto con **pul** y **24cyc**. En los esquemas se puede observar que también son las uniones alquílicas y de van der Waals las más relevantes para el acoplamiento.

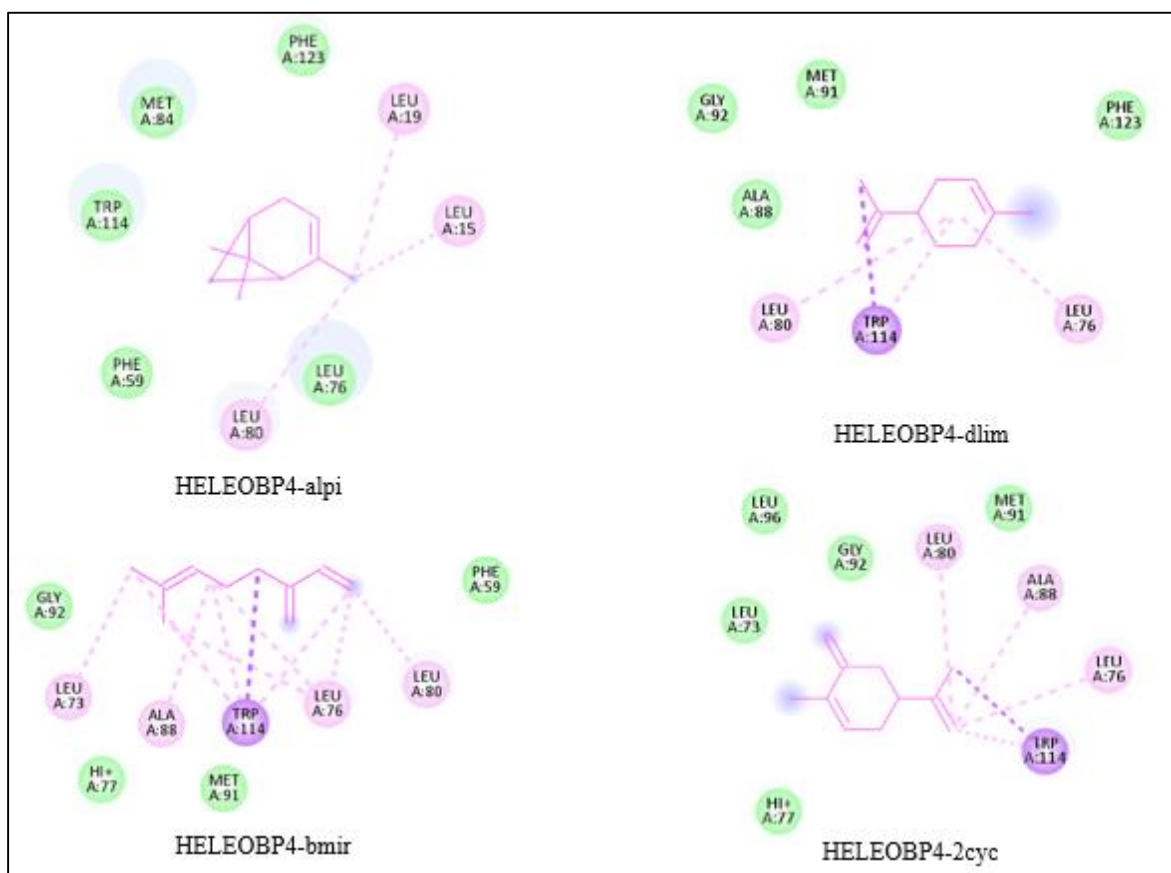


Figura 27. Interacción 2D HELEOBP4 alpi, dlim, bmir y 2cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

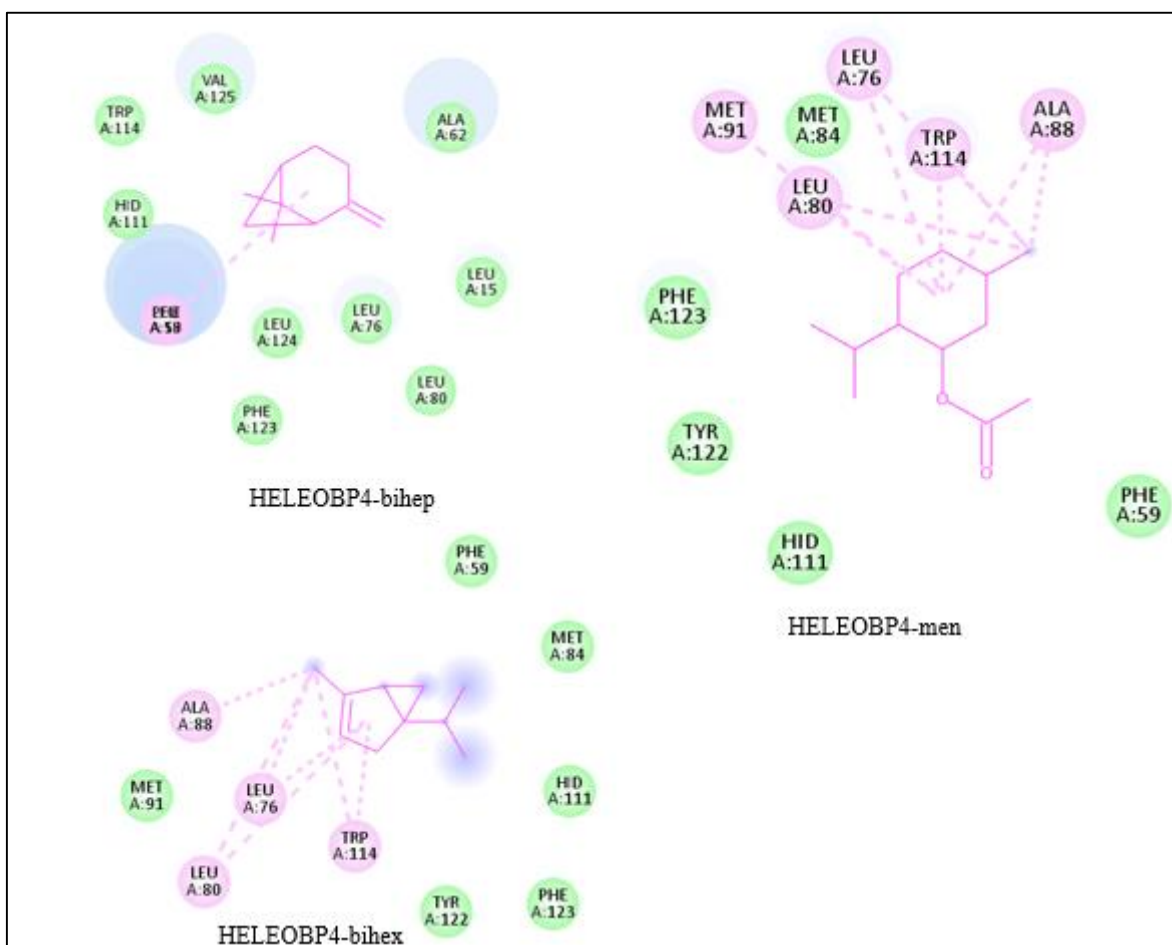


Figura 28. Interacción 2D HELEOBP4 con bihep, men y bihex. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

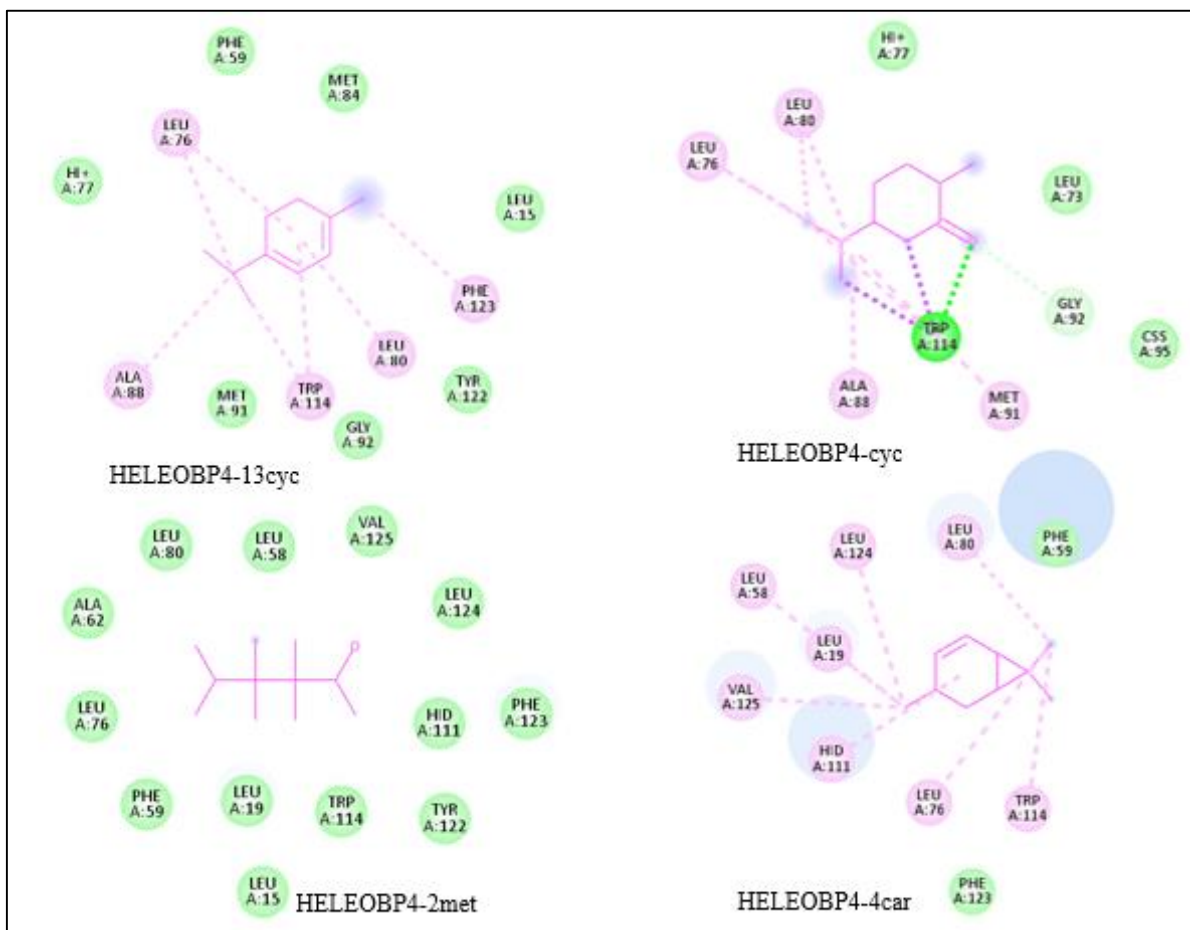


Figura 29. Interacción 2D HELEOBP4 con 13cyc, cyc, 2met y 4car. Los colores indican interacciones de tipo: verde) vander Waals, verde intenso) enlace de hidrógeno, morado) pi-sigma, rosa) alquílicas y azul) carbón-hidrógeno. El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

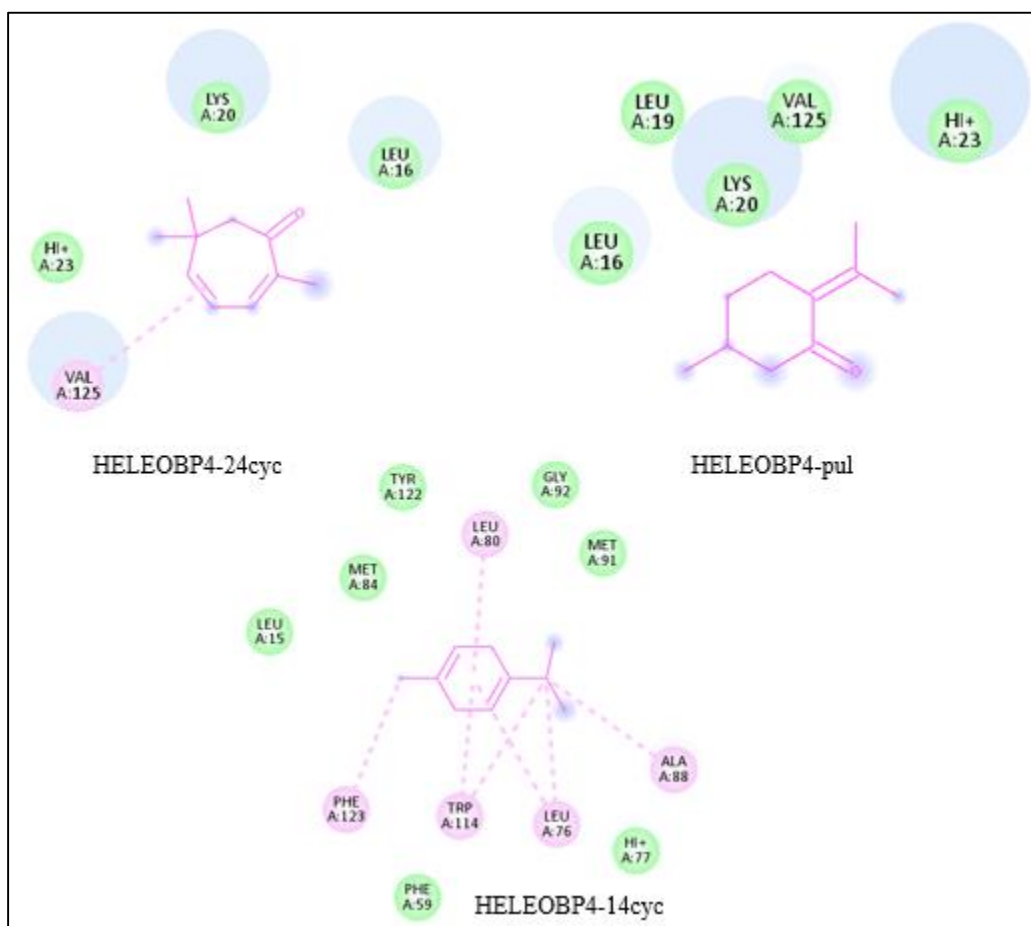


Figura 30. Interacción 2D HELEOBP4 con 24cyc, pul y 14cyc. Los colores indican interacciones de tipo: verde (Vander Waals), verde intenso (enlace de hidrógeno), morado (pi-sigma), rosa (alquílicas) y azul (carbón-hidrógeno). El halo azul indica el aminoácido con mayor energía de atracción.

Cuadro 9 Residuos aminoacídicos con los que interactúa cada compuesto de especies de *Quercus* con la HELEOBP4.

| Ligando | Aminoácidos |
|---------|--|
| alpi | MET84, PHE123, LEU19, LEU15, TRP114, PHE59, LEU80, LEU76 |
| dlim | GLY92, MET91, PHE123, ALA88, LEU80, TRP114, LEU76 |
| bmir | GLY92, LEU73, ALA88, HIS77, MET91, TRP114, LEU76, LEU80, PHE59 |
| 2cyc | LEU96, LEU73, GLY92, LEU80, MET91, ALA88, LEU76, TRP114, HIS77 |
| bihep | VAL124, TRP114, HID, LEU58, LEU124, LEU76, LEU15, PHE123, LEU80 |
| men | LEU76, ALA88, MET91, MET84, TRP114, LEU80, PHE123, TYR122, HID111, PHE59 |
| bihex | PHE59, MET84, HID111, PHE123, TYR122, ALA88, LEU76, TRP114, LEU80, MET91 |
| 13cyc | PHE59, MET84, LEU15, LEU76, HIS77, ALA88, MET91, TRP114, GLY92, LEY80, TYR122, PHE123, LEU15 |

| | |
|--------------|---|
| cyc | HIS77, LEU80, LEU76, LEU73, TRP114, ALA88, MET91, CSS95, GLY92 |
| 2met | LEU58, LEU80, VAL125, LEU124, LEU76, PHE59, LEU19, TRP114, TYR122, HID111, PHE123, LEU15, ALA62 |
| car | PHE59, LEU80, LEU124, LEU58, LEU19, VAL125, HID111, LEU76, TRP114, PHE123 |
| 24cyc | LYS20, LEU16, HIS23, VAL125 |
| pul | LEU19, VAL125, LYS20, LEU16, HIS23 |
| 14cyc | TYR122, GLY92, LEU80, MET84, LEU15, MET91, PHE123, TRP114, LEU76, LA88, HIS77, PHE59 |

La mayoría de los aminoácidos presentes en las interacciones corresponden a la clasificación de no polares. Estos confieren estabilidad a las estructuras proteicas mediante el establecimiento de interacciones hidrofóbicas; por tanto, suelen ubicarse en el centro de las proteínas con estructura terciaria (Karp, 2011). Dentro de esta categoría encontramos a los aminoácidos ALA, GLY, ILE, LEU, MET, PHE, PRO, TRP y VAL.

10. Conclusiones

- El perfil químico de ambas especies de encino está conformado principalmente por terpenos, de la clasificación de los monoterpenos y sesquiterpenos.
- El COV más relevante en la interacción entre *M. mexicanus* con *Q. sartorii* es **2cyc**, tanto por abundancia como por energía de acoplamiento, mientras que los COVs más relevantes en la interacción entre *M. mexicanus* con *Q. grahamii* son **bmir** por abundancia y **pul** por energía de acoplamiento.
- Las uniones alquílicas y de Van der Waals tienen la mayor contribución en la unión de los compuestos de las especies de *Quercus* bajo estudio con las HELEOBPs.
- Las OBP analizadas tienen la capacidad de acoplarse con los COVs reportados de ambas especies de encinos.
- La interacción entre adultos de *M. mexicanus* con *Q. grahamii* y *Q. sartorii* se establece por la liberación de terpenos, principales COVs extraídos de las hojas de ambas especies vegetales.

11. Literatura citada

- Aragón, A., Morón, M.A., Rodríguez-Velázquez, S.Y., Cortés-Meza, A.N., Zarázua-Carvajal, M. and Damián-Huato, M.Á. (2010). Description of the larvae of three species of *Macroductylus* Dejean (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae) from Mexico with notes on the reproductive behavior of *Macroductylus ocreatus* Bates. *The Coleopterist Bulletin*, 64 (3), 193-200.
- Arce-Pérez, R. y Morón, M.A. (2000). Taxonomía y distribución de las especies de *Macroductylus* Latreille (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana*, 79, 123–239.
- Baldelomar, M., Viana, M. L., & Telles, F. J. (2018). El rol de los compuestos orgánicos volátiles florales en las interacciones planta-insecto. *Oecologia Australis*, 22(4).
- Bárceñas-Pazos, G. M., Ríos-Villa, R., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., & Honorato-Salazar, J. A. (2008). Composición química y densidad básica relativa de la madera de dos especies arbustivas de encino blanco de la Sierra de Álvarez, SLP, México. *Madera y bosques*, 14(3), 81-94.
- Cabrera, D. M., Terrazas, T. y Chávez, F. Z. (2003). Arquitectura foliar y anatomía de la corteza y la madera de *Quercus sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (73), 63-72.
- Calapai, G., Minciullo, P. L., Miroddi, M., Chinou, I., Gangemi, S., & Schmidt, R. J. (2016). Contact dermatitis as an adverse reaction to some topically used European herbal medicinal products—P art 3: *Mentha*× *piperita*–*Solanum dulcamara*. *Contact dermatitis*, 74(3), 131-144.
- Cherman, M. A. y Morón, M. Á. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1), 201-220.
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., & Renou, M. (2019). Insect odorscapes: from plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in physiology*, 10, 972.
- De la Fuente, E., Sanz, M. L., Martínez-Castro, I., Sanz, J., & Ruiz-Matute, A. I. (2007). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105(1), 84-93.
- Dethier, V. G. (1954). Evolution of feeding preferences in phytophagous insects. *Evolution*, 33-54.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 586-608.

- Fan, J., Francis, F., Liu, Y., Chen, J. L., & Cheng, D. F. (2011). An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genet. Mol. Res*, *10*(4), 3056-3069.
- Ghirardo, A., Heller, W., Fladung, M., SCHNITZLER, J. P., & Schroeder, H. (2012). Function of defensive volatiles in pedunculate oak (*Quercus robur*) is tricked by the moth *Tortrix viridana*. *Plant, cell & environment*, *35*(12), 2192-2207.
- González-González A, Rubio-Meléndez ME, Ballesteros GI, Ramírez CC, Palma-Millanao R. (2019). Sex- and tissue-specific expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in adults of the scarab beetle *Hylamorpha elegans* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae) PeerJ 7:e7054 <https://doi.org/10.7717/peerj.7054>.
- González-González, A., Palma-Millanao, R., Yáñez, O., Rojas, M., Mutis, A., Venthur, H. and Ramírez, C. C. (2016). Virtual screening of plant volatile compounds reveals a high affinity of *Hylamorpha elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) odorant-binding proteins for sesquiterpenes from its native host. *Journal of Insect Science*, *16*(1).
- Hübner, W. D., & Moser, E. H. (2002). Charcoal tablets in the treatment of patients with irritable bowel syndrome. *Advances in therapy*, *19*(5), 245-252.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., St John, O., Wild, R., & Balke, M. Caterino Mc, Gomez-Zurita J., Ribera I., Barraclough Tg, Bocakova M., Bocak L. & Vogler Ap 2007: A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, *318*, 1913-1916.
- Hussain, M., Debnath, B., Qasim, M., Bamisile, B. S., Islam, W., Hameed, M. S., and Qiu, D. (2019). Role of saponins in plant defense against specialist herbivores. *Molecules*, *24*(11), 2067.
- Jafari, N. K., & Sani, A. M. (2016). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Melissa officinalis* leaves. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, *11*, 367-372.
- Jerome, D. (2018). *Quercus sartorii*. *The IUCN Red List of Threatened Species*: e.T89251896A89251912.
- Karimian, M., Najafi, R., Jaimand, K., Hatami, F., Abbasi, N., & Jalali Ghalousangh, A. (2020). Extraction and Identification of phytochemicals in Iranian oak (*Quercus brantii* var. *persica*) Collected in Arghavan Valley, Ilam County by HS-SPME and GC-MS. *Journal of Medicinal plants and By-product*, *9* (Special), 81-86.

- Karp G. (2011). *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos*, Sexta edición, México: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kosar, M., Özek, T., Göger, F., Kürkcüoğlu, M., & Hüsnü Can Baser, K. (2005). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary metabolites. *Pharmaceutical Biology*, 43(6), 491-495.
- Lang, A. L. A. (2000). *Ecología química*. Plaza y Valdés.
- Li, R., Chen, W. C., Wang, W. P., Tian, W. Y., & Zhang, X. G. (2010). Analysis of the essential oil of magnolia and its effect on antioxidant enzyme activity, sCD40L and phosphorylate-activate Akt protein levels in gastric cancer mice. *Medicinal chemistry research*, 19(9), 1203-1209.
- Luna-José L., Espinosa, L. M. y Aguilar, B. R. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (72), 107-117.
- Luna-José, A. D., Espinosa, L. M., & Aguilar, B. R. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (72), 107-117.
- Marín-Loaiza, J. C. y Céspedes, C. L. (2007). Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 327-351.
- Meeningen, Y. V., Schurgers, G., Rinnan, R., and Holst, T. (2017). Isoprenoid emission response to changing light conditions of English oak, European beech and Norway spruce. *Biogeosciences*, 14 (18), 4045-4060.
- Moctezuma-Vega B. X. y Romero-López A. A. (2020). Patrones de comportamiento de *Mactodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) sobre Hojas de encinos. 4to Congreso Nacional de Investigación Interdisciplinaria. Ciudad de México, México, 150-152.
- Moctezuma-Vega, B. X. (2019). Obtención del código de barras de ADN de especies de *Quercus* (Fagaceae) hospederas de adultos de *Macroductylus* (Coleoptera: Melolonthidae). Tesis de grado. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla Pue.
- Mutis, A., Palma, R., Parra, L., Alvear, M., Isaacs, R., Morón, M., & Quiroz, A. (2014). Morphology and distribution of sensilla on the antennae of *Hylamorpha elegans* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae). *Neotropical entomology*, 43(3), 260-265.
- Nieves-Silva, E. & Romero-López, A.A. (2019). Chemical profile of the volatiles of *Baccharis salicifolia* (Asteraceae) and interaction with *Macroductylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Agronómica*, 68(3).

- Nieves-Silva, E. y Romero-López A.A. (2016). Olfatómetro portátil para el estudio de interacciones en “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) y plantas. *Entomología mexicana*. 3, 515-522.
- Niinemets, Ü., Loreto, F., & Reichstein, M. (2004). Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends in Plant Science*, 9(4), 180-186.
- Nixon, K.C. (1993) Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annales des Sciences Forestières* 50: 25–34.
- Nixon, K.C., 1993. The genus *Quercus* in Mexico. In: Ramammorthy, T.R., Bye, R., Lot, A., y Fa, J., 1993. Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. *Oxford University Press*. 812
- Núñez, V. D., Martínez, G. S., & Gillette, N. E. (2006). Respuesta de *Dendroctonus mexicanus* (Hopkins) a dos isómeros ópticos de verbenona. *Agrociencia*, 40(3), 349-354.
- Osorio, I. S., Martín, R. T., Nevado, L. D., and Pantoja, G. L. (2008). Application of the electroantennography (EAG) of olfactory stimuli in the cork oak (*Quercus suber* L.) woodborer *Prinobius germari* Dejean (Coleoptera, Cerambycidae). In *Suberwood: New challenges for the integration of cork oak forests and products* (pp. 247-257).
- Pio, C. A., Silva, P. A., Cerqueira, M. A., & Nunes, T. V. (2005). Diurnal and seasonal emissions of volatile organic compounds from cork oak (*Quercus suber*) trees. *Atmospheric Environment*, 39(10), 1817-1827.
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2019). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(S1), 65-87.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Romero-López A. A., Aragón, A. y Arzuffi, R. (2007). Estudio comparativo del comportamiento sexual de cuatro especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae). En: E. G. Estrada, A. Equihua, C. Luna y J. L. Rosas-Acevedo (Eds.) *Entomología mexicana*. Vol. 6. Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología. México. pp. 275- 281.
- Romero-López, A. A., Martínez-Bonilla, K. y Tafoya-Rangel R. (2018). Respuesta antenográfica de machos de *Phyllophaga macrocera* y *Cyclocephala lunulata* (Coleoptera: Melolonthidae) a extractos corporales de hembras. *Diversidad, ecología y manejo de insectos rizófagos*. 103-115.

- Romero-López, A.A. (2016) Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: a una década de distancia. *Dugesiana*, 23(1): 59-73.
- Romero-Rangel, S. (2006). Revisión taxonómica del complejo Acutifoliae de *Quercus* (Fagaceae) con énfasis en su representación en México. *Acta Botánica Mexicana*, (76), 1-45.
- Ruiz-Reyes, E., & Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 9-24.
- Ruther, J., Reinecke, A. and Hilker, M. (2002). Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time-dependent bouquets and novel function of (z)-3-hexen-1ol as a sexual kairomone. *Ecological Entomology*. 27, 76-83.
- Sabás-Rosales, J. L., Sosa-Ramírez, J. y Luna-Ruíz, J.D.J. (2015). Diversidad, distribución y caracterización básica del hábitat de los encinos (*Quercus*: Fagaceae) del Estado de San Luis Potosí, México. *Botanical Sciences*, 93(4), 881-897.
- Samadi, M., Abidin, Z. Z., Yunus, R., Biak, D. R. A., Yoshida, H., & Lok, E. H. (2017). Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 216-222.
- Sánchez-Osorio I., Domínguez N. L., López P. G., Tapias M. R. y Sánchez-Rodas N. D. (2008). Perfil de emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs) foliares en alcornos infestados por *Cerambyx welensii* Küster (Coleoptera: *Cerambycidae*). *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 26, 59-65.
- Sarmiento Pérez, O. I. (2017). Cinética de extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* L. mediante hidrodestilación y calentamiento ohmico asistido por hidrodestilación.
- Sefeer, K. P., & Elumalai, K. (2018). Larvicidal activity of plant oil, *Origanum majorana* L. against the selected mosquito larvae and GC-MS analysis of its phytochemical compounds. *Ann. Entomol.* 2018a, 36(02), 01-05.
- Sosa-Ramírez, J., Moreno-Rico, O., Sánchez-Martínez, G., Siqueiros-Delgado, M. E. y Díaz-Núñez, V. (2011). Ecología y fitosanidad de los encinos (*Quercus* spp.) en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Madera y bosques*, 17(3), 49-63.
- Uribe-Salas, M. D., Rocha-Ramírez, V., Gregorio-Cipriano, R., Fernández-Pavia, S. P., & Alvarado-Rosales, D. (2019). Declinamiento y muerte de los encinos (*Quercus* spp.) en México, estado actual del conocimiento. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 13(1), 50-59.

- Vaca-Sánchez, M. S., González-Rodríguez, A., Maldonado-López, Y., Fernandes, W. G. y Cuevas-Reyes, P. (2016). Importancia de los taninos en especies del género *Quercus* como metabolitos secundarios asociados a defensa contra insectos herbívoros. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 18(1), 10-20.
- Valencia, S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (75), 33-53.
- Valencia-Avilés, E., Figueroa, I. I., Sosa Martínez, E., Bartolomé Camacho, M. C., Martínez Flores, H. E. y García Pérez, M. E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas.
- Wang, B., Guan, L., Zhong, T., Li, K., Yin, J., & Cao, Y. (2013). Potential cooperations between odorant-binding proteins of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS One*, 8(12), e84795.
- Wenzell, K. and Kenny, L. 2015. *Quercus acutifolia*. *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Xu, H., & Turlings, T. C. (2018). Plant volatiles as mate-finding cues for insects. *Trends in plant science*, 23(2), 100-111.
- Yuriev, E., & Ramsland, P. A. (2013). Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *Journal of Molecular Recognition*, 26(5), 215-239.
- Zhuang, X., Wang, Q., Wang, B., Zhong, T., Cao, Y., Li, K., & Yin, J. (2014). Prediction of the key binding site of odorant-binding protein of *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect molecular biology*, 23(3), 381-390.

12. Anexos

Evidencias de participaciones en congresos y eventos de divulgación científica.

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorga la presente:



CONSTANCIA

A: *Blanca Xochitl Moctezuma Vega*

H. Puebla de Zaragoza a 25 de en enero de 2020
Por asistir al:

"I Coloquio de Investigación de la
Facultad de Ciencias Biológicas"

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
DIRECTOR

Dr. José Lino Zumaquero Ríos
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN



Laboratorio de Elucidación y Síntesis
en Química Orgánica



Laboratorio
de Síntesis y
Modificación
de Productos
Naturales

El Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica y
el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales

Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: Blanca Xóchitl Moctezuma Vega

Por su ponencia titulada: Interacción Planta-insecto mediada por infoquímicos:
comportamiento de "frailecillos" (Coleoptera) en torno a hojas de encinos (Fagales)
en el ciclo de conferencias virtuales impartidas del 20 de julio al 10 de agosto de 2020

Heroica Puebla de Zaragoza, a 10 de agosto de 2020

Dr. Jesús Sandoval
Ramírez

M. En C. Alan Carrasco
Carballo



EL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

a través de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería y
Ciencias Sociales y Administrativas, la Sección de Estudios de
Posgrado e Investigación y el Comité Organizador
otorgan la presente

CONSTANCIA

a

**Blanca Xochitl Moctezuma Vega y Ángel
Alonso Romero López**

por la impartición de la Ponencia Técnica

**Patrones de comportamiento de *Macroductylus
mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) sobre
hojas de encinos**

en el 4to Congreso Nacional de Investigación
Interdisciplinaria, llevado a cabo el 28, 29 y 30 de octubre de
2020.

"La Técnica al Servicio de la Patria"

DRA. MAYRA ANTONIO CRUZ
COORDINADORA GENERAL



UPIICSA
SECCIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEPTO. DE INVESTIGACIÓN

DRA. CLAUDIA ALEJANDRA HERNÁNDEZ
COMITÉ TÉCNICO



La Universidad Autónoma de Zacatecas "Francisco García Salinas"
y la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A.C.

Otorgan la presente

Constancia

A: Blanca Xochitl Moctezuma Vega*, Alan Carrasco Carballo, Angel Alonso Romero López.

Por su valiosa participación en la **PRESENTACIÓN DE CARTEL** en la **16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales Zacatecas 2021** | Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez con el **TRABAJO LIBRE: QB022 | Química y biotecnología (QB)**.

"Fitoquímica de Quercus grahamii y Quercus sartorii (Faboaceae), plantas hospederas de "trailecillos" (Coleoptera: Melolonthidae)"

que se llevó a cabo mediante la modalidad en línea (aula virtual) el día 19 al 21 de mayo de 2021.

Zacatecas, Zac., a 19 de junio de 2021



M. en C. Hiris Hiram Pacheco Garcia
Secretario Académico
Universidad Autónoma de Zacatecas
"Francisco García Salinas"



Dra. en C. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez
Presidenta de la AMPRONAT, A.C.



Dra. en C. Virginia Flores Morales
Presidenta del Comité Organizador Local
16-RINW 2021 Zacatecas

| REGISTRO INSTITUCIONAL | |
|------------------------|----------------|
| LIBRO: | 5 |
| FOLIO: | 115 |
| FOLIO: | 4078 |
| FECHA: | 19/06/2021 |
| VALOR CURRICULAR: | 14 créditos |
| CURSOS: | 0-526-1036-138 |
| | 0781-4078 |

SELLO DIGITAL

El presente documento es un archivo digital firmado digitalmente por el usuario que aparece en el campo "Firma" y es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento. Este documento es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento. Este documento es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento.

Este documento es un archivo digital firmado digitalmente por el usuario que aparece en el campo "Firma" y es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento. Este documento es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento. Este documento es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento.

Este documento es un archivo digital firmado digitalmente por el usuario que aparece en el campo "Firma" y es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento. Este documento es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento. Este documento es válido para ser utilizado como evidencia de la participación en el evento.