

# Metabolitos Secundarios en Tejido de Nogal Pecanero Dañado por el Barrenador Ambrosial (*Euplatypus segnis* Chapuis) y Hongos Asociados

Ramón Alvidrez-Villarreal<sup>1</sup>, Francisco Daniel Hernández-Castillo<sup>1\*</sup>, Oswaldo García-Martínez<sup>1</sup>, Rosalinda Mendoza-Villarreal<sup>2</sup>, Raúl Rodríguez-Herrera<sup>3</sup>, Cristóbal Noé Aguilar-González<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro No. 1923, Colonia Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México. E-mail: Fdanielhc@hotmail.com (\*Autor responsable). <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Blvd. V. Carranza y José Cárdenas s/n, C.P. 25000, Saltillo, Coah., México.

## Abstract

The ambrosial pinhole borer (*Euplatypus segnis* Chapuis) is associated to *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Botryodiplodia theobromae* which cause regressive death in pecan trees [*Carya illinoensis* (Wangenh.)]. In some regions of northern Mexico it has been estimated that, due to this combination of insects and phytopathogenic fungi, general losses in pecan yields go far more than 20%. It has also been observed that some trees manage to survive with, and without, chemical treatment. The objective of this assay was to determine some of the biochemical changes (content of N, raw protein, terpenes, condensate and hydrolyzable tannins, cellulose, lignin and silica) that occur in the trees of Western cultivars colonized by this complex. Three healthy, and 3 damaged trees, of 3 orchards were sampled and analyzed in 3 municipalities in the Mexican state of Coahuila. The results were analyzed under a completely randomized nested design; for mean comparison a Tukey test ( $P < 0.05$ ) was applied. The results indicated that the content of terpenes, hydrolyzable tannins, cellulose, lignin, and silica increased significantly in the damaged trees, as compared to the healthy ones, thus it can be concluded that these components increase as a chemical defensive answer of the pecan tree to the invasion of insect, and to the enzymatic action of the associated phytopathogenic fungi

**Key words:** *Carya illinoensis*, ambrosial pinhole borer, characterization, identification.

## Resumen

El insecto barrenador ambrosial *Euplatypus segnis* Chapuis esta asociado a *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Botryodiplodia theobromae* los cuales provocan muerte regresiva en nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh.)]. En algunas regiones del norte de México se han llegado a estimar pérdidas de más del 20 % en la producción, por esta combinación de insectos y hongos fitopatógenos. Asimismo se ha observado que algunos árboles logran sobrevivir con, y sin, tratamiento químico. El objetivo de este estudio fue determinar algunos de los cambios bioquímicos (contenido de N, proteína cruda, terpenos, taninos condensados e hidrolizables, celulosa, lignina y sílice) que ocurren en los árboles del cultivar Western colonizado por este complejo. Se analizaron tres árboles sanos y tres dañados de tres huertas muestreadas en tres municipios del estado de Coahuila. Para el análisis de las respuestas se utilizó un diseño anidado, se realizó la prueba de comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Los resultados indicaron que el contenido de terpenos, taninos hidrolizables, celulosa, lignina, y sílice aumentaron significativamente en los árboles dañados, en comparación de los sanos, esto permite inferir que estos componentes aumentan como una respuesta química de defensa del nogal pecanero a la invasión del insecto, y a la acción enzimática de los hongos fitopatógenos asociados.

**Palabras clave:** *Carya illinoensis*, barrenador ambrosial, caracterización, identificación.

## Introducción

En los municipios de Parras, Torreón, y General Cepeda, en el sur del estado de Coahuila, México, se producen 19,345 ton anuales de nuez pecanera [*Carya*

*illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], con una densidad de 525,060 árboles. En el 20 % de la superficie se ha reportado la presencia del barrenador ambrosial *Euplatypus segnis* Chapuis, que ha ocasionado pérdidas

en la producción de hasta 773.82 ton. (CESAVECO, 2006). El insecto está asociado a los hongos; *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Botryodiplodia theobromae* que, en pruebas de patogenicidad, demostraron ser fitopatógenos en árboles de nogal de la variedad Western bajo condiciones de invernadero (Alvídrez, 2007). Los síntomas observados en campo en árboles colonizados fueron; orificios de entrada con aserrín, excreciones líquidas de color cristalino-rojizo, que se tornan a café oscuro, y un olor penetrante. Al desprender la corteza se distinguieron orificios de 2 mm de diámetro, y manchas necróticas con diversas tonalidades en forma de punta de diamante. También se apreciaron síntomas de pérdida de turgencia, amarillamiento, caída de hojas, muerte parcial de ramas, y muerte total del árbol, en lapsos de tiempo relativamente cortos (tres meses a un año), sin embargo es importante mencionar que algunos de ellos logran sobrevivir con, y sin, ningún tratamiento. Esto hace pensar que se presentan cambios bioquímicos o estructurales, o ambos a la vez como mecanismos de defensa de los árboles, pudiendo ser constitutivas, o inducidas, por la presencia de patógenos (Vivanco, 2005). En este sentido las coníferas presentan ambos mecanismos bioquímicos de defensa contra el ataque de insectos y la infección de patógenos (Berryman, 1972; Christiansen *et al.*, 1993).

Aunque los terpenos están asociados más comúnmente a especies de coníferas, también se han detectado en otras plantas, incluyendo angiospermas (Zwenger *et al.*, 2008). Eyles *et al.* (2003) reportan un aumento de compuestos polifenólicos, incluso taninos hidrolizables, proantocianidinas (taninos condensados), y glicósidos flavonoides en el xilema de árboles de *Eucalyptus globulus* (Labill) y *Eucalyptus nitens* (Maiden), 17 meses después de ser lesionado artificialmente, y señalan que el variado rango de metabolitos secundarios descubiertos en la herida de la madera, es una respuesta a su reparación. El ataque fúngico sobre la celulosa en las paredes celulares reduce la flexibilidad y la resistencia, mientras que la degradación de la lignina afecta la resistencia a la compresión de la madera, de hecho una pérdida significativa de esta resistencia ya ocurre incluso antes de que la pudrición sea detectada en la madera (Wilcox, 1978). Por otra parte, no existen reportes de que la celulosa tenga relación con la defensa contra patógenos, sin embargo los datos eso sugieren. Wainhouse *et al.* (1998) confirmaron la importancia de la lignina como una barrera mecánica de defensa desarrollada en los árboles, dado que cuando el barrenador *Dendroctonus micans* se estableció en abetos noruegos, había una relación negativa entre la cantidad de lignina, y el tamaño de la galería de adultos. Así mismo algunas biomoléculas como aldehídos, terpenos,

ésteres monoterpénoides, ésteres de cianohidrina, cianohidrininas, sesquiterpenos, aceites esenciales, furanos, alcaloides, y compuestos fenólicos (taninos) están presentes, de manera natural, en plantas, y han mostrado actividad insecticida o fitotóxica, en el control de plagas (Vázquez *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue determinar algunos de los cambios bioquímicos que presentan los árboles de nogal pecanero dañados por la presencia del barrenador ambrosial *Euplatypus segnis*, y los hongos asociados a este.

## Materiales y Métodos

### Zona de estudio

La colecta de tejido vegetal de árboles de nogal pecanero enfermo y sano se realizó en tres municipios del estado de Coahuila: Parras de la Fuente (25° 22' N, 102° 11' W; altitud de 1520 msnm) General Cepeda (25° 22' N, 101° 28' W; altitud de 1470 msnm), y Torreón (25° 42' N, 103° 27' W; altitud de 1120 msnm). Se muestrearon tres huertas por municipio, y en cada una de ellas se seleccionaron tres árboles de la variedad, de 20 años de edad, dañados en fase 3, esto es 50 % de área foliar dañada, de 25 a 50 orificios de entrada, y presencia de aserrín en la base del tallo, y tres árboles sanos. Las muestras de madera sana y dañada para los análisis químicos de cada árbol de nogal se obtuvieron de la primera troza cortada a 0.30 m y a 2.60 m del suelo de acuerdo con la norma TAPPI T 257-os 76. En este estudio las rodajas se cortaron de 2 cm debido a que los diámetros de las trozas fueron menores a los que especifica la norma, además de considerarse material para imprevistos. Se obtuvo madera del centro y las otras dos aproximadamente a 15 cm de cada cabezal (inferior y superior), de ellas se realizaron las determinaciones bioquímicas, que incluyen al N, proteína cruda, terpenos, taninos condensados e hidrolizables, celulosa, lignina y sílice. Las muestras se trasladaron al laboratorio en bolsas de polietileno de 20 kg, con el fin de evitar su deshidratación y la dispersión de insectos (larvas y adultos). Posteriormente, las rodajas se descortezaron y secaron en estufa de circulación forzada a 60 °C. Luego se astillaron y molieron en un molino tipo Wiley, y se pasaron a través de una malla No. 40 durante 48 h; enseguida se guardaron a temperatura ambiente en recipientes opacos para evitar la exposición directa a la luz (Honorato-Salazar, 1998).

### Extracción de polifenoles

Se colocaron 5 g de polvo de cada una de las muestras de madera sana y enferma en matraces Erlen Meyer (1000 mL) con 20 mL de acetona al 70 % (relación 1:4). Los matraces se forraron con papel aluminio para evitar la

exposición de la luz. Se montó un sistema de reflujo a una temperatura de 60 °C por 12 h. Una vez terminado el reflujo, se filtró con tela de tul, el extracto recuperado se centrifugó por 10 min a 3500 rpm. Al extracto se le retiró el solvente con un rotavapor (Yamato res540) en el que se mantuvo una temperatura de 60 °C, evitando la exposición a la luz.

### Determinación de Metabolitos Secundarios

**Taninos hidrolizables.** Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de ácido gálico, a una concentración 0.4 g L<sup>-1</sup>. Se etiquetaron cinco tubos de ensayo del 0 al 4, y se añadieron a cada tubo- 0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mL de la solución estándar, posteriormente se agregó a cada uno 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0 mL de agua destilada respectivamente. Enseguida se añadieron 400 µL de los extractos recuperados de las muestras de madera sana y enferma diluida en un tubo de ensayo (extractos en dilución 1:100), al que se le adicionaron 400 µL del reactivo comercial Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar por 5 min. Después se adicionaron 400 µL de carbonato de sodio (0.01 M), se agitó, y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente se diluyó con 2 mL de agua destilada, enseguida se tomó lectura en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Spectronic, Biomate3) a 725 nm para determinar fenoles totales. Los cálculos se realizaron con los datos de las lecturas de las muestras y aplicando la ecuación  $Y = 5.235X - 0.0256$ , obtenida en la curva patrón ( $R^2 = 9991$ ). El ensayo se realizó por triplicado (Ventura-Sobrevilla, 2006).

**Taninos condensados.** Se preparó una curva patrón utilizando una solución estándar de catequina a una concentración 1 g L<sup>-1</sup>. Se etiquetaron cinco tubos de ensayo del 0 al 4, se les depositó a cada uno 0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mL de la solución estándar, respectivamente, y se añadió, 0.75, 0.50, 0.25 y 0 mL de agua destilada. A los tubos con muestra se les agregó 500 µL de la muestra diluida en un tubo de ensayo (16 x 150), al que se le adicionó 3 mL de HCl-butanol al 10 %, luego se le adicionaron 100 µL de reactivo férrico. Estos tubos se sellaron para evitar la evaporación del NC1-butanol. Después se colocó 1h en baño maría con agua hirviendo a 100 °C, se dejó enfriar, y se tomó lectura en un espectrofotómetro UV/Visible (Thermo Spectronic, Biomate3) a 460 nm de absorbancia. Para cuantificar taninos condensados en los extractos de las muestras de madera sana y enferma, primero se hizo una dilución 1:100 y después se procedió de igual manera que para la curva patrón; tomando de aquí 500 µL para transferirlos a los tubos con rosca, y se le agregó el HCl-butanol y reactivo férrico, para después ponerlos en baño maría a 100 °C por 1 h. Las lecturas obtenidas de las muestras fueron calculadas por la ecuación  $Y = 1.6102X$

- 0.329, obtenida en la curva patrón ( $R^2 = 9967$ ). Dicho ensayo se realizó por triplicado (Ventura-Sobrevilla, 2006).

**N y Proteína Cruda.** Se pesaron 5 g por muestra en papel filtro, se colocaron en un matraz Kjeldhal, se agregaron 5 perlas de vidrio, y una cucharada de mezcla reactiva de Se, como catalizador, más 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, y se colocó en un digestor hasta observar el cambio de tonalidad de café oscuro a verde claro. Para la destilación, en un matraz se agregaron 300 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 5 granallas de zinc, 110 mL de Na OH al 45 %. En un Matraz Erlen Mayer de 500ml se adicionaron 50 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 4 %, más 5 gotas de indicador mixto y se destiló hasta recuperar 300 mL. La titulación se realizó en bureta graduada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.11173N. La determinación del N se obtuvo de la digestión húmeda de la materia orgánica y de la cuantificación del amoníaco producido a partir del N. Considerando que el N sólo proviene de las proteínas y que estas lo contienen en aproximadamente un 16 %, se estimó su concentración en porcentaje. Para cuantificar la proteína cruda se multiplico el % de N<sub>2</sub> por el factor de proteína 6.25.

**Terpenos.** Se colocaron 2 g de muestra de madera sana, y enferma, por dedal de extracción que se introdujo en un extractor Soxhlet, se montó el equipo con matraces de cuello esmerilado previamente pesados sobre manto eléctrico, agregando hexano. La extracción se realizó por 12 h y luego se eliminó el solvente en mufla, enfriando después en campana de secado, y se pesaron los matraces. El porcentaje de extracto en hexano, correspondiente al contenido de terpenos por muestra se calculó mediante la diferencia con el peso inicial (Muñoz *et al.*, 2004).

**Lignina, Celulosa y Sílice.** Se peso 1 g de cada una de las muestras de madera molida de nogal sano y dañado, dentro de un vaso Berzelius de 600 ml, se añadieron 200 ml de solución ácido detergente y 2 ml de decahidronaftaleno, y posteriormente se calentaron sobre parrillas hasta ebullición por 1 h. La solución se filtro a través de vacío sobre un crisol de capa porosa previamente tarado. El residuo sólido se lavó dos veces con agua destilada caliente, enseguida se lavo con 50 mL de acetona hasta desaparecer el color, se eliminó el residuo de solvente y enseguida se colocó en una estufa de secado a 105 °C, durante 12 h, posteriormente las muestras se colocaron en una campana de secado por 30 min, para obtener la fibra ácido detergente (FAD), que se colocó en crisoles sobre una caja petri con agua fría, y se le agregó 25 mL de solución combinada de permanganato de potasio, al menos cinco veces durante 90 min. Los crisoles de capa porosa se filtraron sobre un embudo de vacío hasta eliminar la solución de permanganato. Los crisoles se depositaron sobre cajas petri y se les añadió solución desmineralizadora hasta la mitad del volumen del crisol, dejando actuar la

solución por 5 min. El proceso se repitió dos veces, hasta que el residuo quedo blanquecino, enseguida se lavó dos veces con alcohol al 70 %, y se secaron los crisoles a 105 °C, dejándose enfriar en desecador para obtener el peso de la lignina. Las muestras de la determinación de lignina se incineraron en una mufla a 570 °C, dejándose enfriar en desecador para obtener el peso de la celulosa a la que se le agregó ácido bórico al 48 % y se lavaron con acetona, se incineraron en mufla a 570 °C, dejándose enfriar en desecador para obtener el peso del sílice (Van Soest and Wine, 1988). Se utilizó un diseño anidado completamente al azar; donde las huertas están anidadas en los municipios; las repeticiones con anidamiento en municipios por huerta; el estado fisiológico por municipios, y estado fisiológico por huerta anidada en los municipios. Se realizó un ANOVA y comparación de medias utilizando la prueba de Tukey  $P < 0.05$  (SAS para Windows, V8)

### Resultados y Discusión

Los resultados de los análisis químicos de madera de nogal sana y dañada entre municipios (Cuadro 1) indican que no existió diferencia significativa en el contenido de N y proteína cruda, terpenos, taninos condensados, y sílice. La concentración de taninos hidrolizables fue más alta para Torreón (1.02 me/cat), seguido por General Cepeda y Parras. Los valores de celulosa fueron superiores en Torreón y Parras en relación a General Cepeda.

**Cuadro 1.** Composición bioquímica de árboles de nogal pecanero muestreados en tres diferentes municipios del estado de Coahuila.

Municipios	N (%)	Pc (%)	T (%)	TC (me/ac. gal)	TH (me/cat)	C (%)	L (%)	S (%)
Torreón	0.55484 a	3.4678 a	3.8928 a	0.81619 a	1.01965 a	62.142 a	14.8311 ab	1.14714 a
Parras	0.52610 a	3.2881 a	4.9817 a	0.82553 a	0.87363 c	61.639 a	13.6483 b	1.17007 a
G. Cepeda	0.55537 a	3.4711 a	4.2272 a	0.79769 a	0.97114 b	57.102 b	15.4994 a	1.17108 a

Medias con literales distintas en la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ ); N= nitrógeno; Pc= proteína cruda; T= terpenos; TC= taninos condensados; TH= taninos hidrolizables; C= celulosa; L= lignina y S= sílice.

El contenido de lignina (Cuadro 1), fue mayor en General Cepeda (15.49 %) que en Parras (13.64 %). Las huertas muestreadas en los tres municipios mostraron niveles de manejo agroecológico clave: como es la mejora de la calidad del suelo por la incorporación de materia orgánica y el manejo de la fertilidad. Estas condiciones inducen una mayor resistencia de las plantas a los insectos plaga (Phelan *et al.*, 1995).

Los valores de la composición química de árboles enfermos y sanos (Cuadro 2), indicaron que la concentración de nitrógeno (N) no fue significativa, lo que sugiere un nivel de fertilización similar en las huertas muestreadas. En este sentido las prácticas de fertilización pueden tener efectos indirectos en la

resistencia o susceptibilidad de las plantas a los insectos plaga y a las enfermedades, al cambiar la composición de nutrientes en los árboles. Por otro lado el N total ha sido considerado un factor nutricional crítico que modifica la abundancia y el comportamiento de los insectos (Mattson, 1980).

El nivel proteína cruda (Pc), en árboles sanos (3.38 %) y dañados (3.43 %), fue similar (Cuadro 2). Torres *et al.* (2005) mencionan que los diferentes periodos de lluvia aumentan significativamente el contenido y producción de proteína en la biomasa disponible (% PC/kg ha<sup>-1</sup>) y no disponible; Las defensas químicas basado en proteína en los árboles incluyen las enzimas como el quitinasas y glucanasas que pueden degradar los componentes del organismos invasor. Los inhibidores de las enzimas interfieren con la habilidad del organismo de utilizar recursos del tejido invadido. Otras enzimas inducibles como la peroxidasas y lacasas pueden hacer las paredes celulares más duras a través de la promoción de lignificación, afectando directamente el organismo del invasor. Las defensas basado en proteína pueden ser favorablemente específicas a un organismo particular, pero sólo un subconjunto pequeño de ellas pueden regularse durante el ataque de un hongo patógeno específico, ejemplo de ello es el abeto de Noruega (Hietala *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2004).

**Cuadro 2.** Composición bioquímica de árboles de nogal pecanero, enfermos y sanos, muestreados en tres diferentes municipios del estado de Coahuila.

Estado Fisiológico	N (%)	Pc (%)
Sano	0.54144 a	3.384 a
Enfermo	0.54943 a	3.434 a

Medias con literales distintas en la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ ). 1= sano; 2 = dañado; N= Nitrógeno; Pc = proteína cruda

Los terpenos aumentaron significativamente en los árboles de nogal pecanero atacados por el complejo insecto barrenador-hongos (Cuadro 3) como ocurre en especies

de coníferas (Zwenger *et al.* 2008). Trapp y Croteau (2001) determinaron que aumentar las concentraciones de terpenos es una respuesta del hospedero a los insectos cuando taladran y socavan en el tejido de los árboles. Los terpenos también han demostrado inhibir el desarrollo del patógeno (Klepzig *et al.*, 1996). Aunque hay una respuesta inducida a la invasión de insectos, la biosíntesis de terpenos toma tiempo y ocurre después de que los barrenadores han transportado las hifas a la madera y el patógeno se establece, la distribución de terpenos puede variar dentro de una especie (Semiz *et al.*, 2007). Thompson *et al.* (2006) encontraron altas concentraciones de terpenos en el xilema y bajas en el floema, así como niveles moderados en la savia de la madera en el análisis de muestras de árboles. Kessler y Baldwin (2001) demostraron que los insectos herbívoros pueden inducir la emisión de terpenos de una planta, y también hacen que la planta emita señales para atraer especies predatoras. Estos experimentos proporcionan no solamente la evidencia del gran alcance del rol de los terpenos para la defensa de la planta, sino también dan un modelo de coevolución entre plantas, ácaros, e insectos.

Los taninos condensados (Cuadro 3) se redujeron en árboles enfermos. Alonso *et al.* (2001) refieren que en plantas de *Calluna vulgaris* los aumentos en las concentraciones de Nitrógeno, promueven disminución en compuestos fenólicos totales y en los niveles de taninos condensados.

La concentración de taninos hidrolizables aumentó considerablemente en la madera enferma en relación a la madera sana (Cuadro 3), esto es una respuesta de las plantas ante el complejo insecto-patógeno, dado que los compuestos tánicos desempeñan una función relevante en los mecanismos de resistencia a los organismos patógenos, debido a sus propiedades antifúngicas (Singh y Kim, 1997; Rocha *et al.*, 2001; Encinas *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2001). Eyles *et al.* (2003) mencionan que la madera que desarrolló el xilema lesionado artificialmente, después de 17 meses, en árboles de *Eucalyptus globulus* (Labill) y *Eucalyptus nitens* (Maiden), fue analizado anatómicamente y químicamente, encontrando un aumento de compuestos polifenólicos, incluyendo taninos hidrolizables, taninos condensados, glicósidos y flavonoides, los autores consideraron que el diverso rango de metabolitos secundarios descubiertos en la herida de la madera es una respuesta de reparación. Los taninos muestran un rol importante en los mecanismos de protección de la planta contra insectos, hongos de pudrición, o como agente alelopático, estos reaccionan rápidamente con otras biomoléculas formando productos complejos con proteínas (estructurales y catalíticas), almidón, sustancias pécticas y celulosas. Así se tiene que el ataque enzimático derivado

del metabolismo de hongos, o bacterias hospedados en la madera, puede ser inactivado o disminuido sustancialmente ante la presencia de taninos. (González, 1996). Algunos de estos compuestos bioactivos como son los taninos y terpenos, juegan un papel importante de manera natural en los mecanismos de defensa de frutales y hortalizas (Cowan, 1999; Howard *et al.*, 2000; Lombardi-Boccia *et al.* 2004).

**Cuadro 3.** Composición bioquímica de árboles de nogal pecanero enfermos y sanos, muestreados en tres diferentes Municipios del estado de Coahuila.

Estado Fisiológico	T (%)	TC (me/ac. gal)	TH (me/cat)
Sano	2.5122 b	0.89883 a	0.84736 b
Enfermo	6.2222 a	0.72744 b	1.06226 a

Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes ( $P < 0,05$ ). 1= sano; 2 = dañado. T= terpenos; TC= taninos condensados; TH= taninos hidrolizables.

El contenido de celulosa tuvo incrementos significativos en la madera de los árboles enfermos en relación de la sana (Cuadro 4), siendo la celulosa el polisacárido de mayor proporción en la madera, es la sustancia más importante producida por este organismo vivo, siendo el principal componente de la pared celular (Fengel, 1984). La celulosa es la responsable de determinadas propiedades físicas y mecánicas de las maderas por constituir el material de sostén del árbol, dándole resistencia y tenacidad (Coronel, 1994). El ataque fúngico sobre la celulosa de las paredes celulares reduce la flexibilidad del árbol, mientras que la degradación de la lignina afecta a la resistencia a la compresión de la madera. Una pérdida significativa de esta resistencia ocurre antes de que la pudrición sea detectada en la madera (Wilcox, 1978). No existe reporte de que la celulosa tenga relación con aspectos de defensa contra patógenos, sin embargo, eso sugieren los datos.

La concentración de lignina aumentó considerablemente en árboles de nogal atacados por el insecto (Cuadro 4), Wainhouse *et al.* (1990) mencionan que el aumento de lignina tiene un efecto en los insectos barrenadores de madera, con una reducción en la supervivencia larval, proporción de peso y crecimiento del insecto, así como construcción de las galerías estrechas y deformes, los adultos ovipositaron menos en los árboles con alto contenido de lignina. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies, pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos, cuando están sujetos a daño físico y se manifiesta durante la defensa con acumulación de lignina en grandes cantidades, de forma localizada en los tejidos

atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Wainhouse *et al.* (1998) confirman la importancia de la lignina como una barrera mecánica de defensa desarrollada en los árboles, dado que cuando el barrenador *Dendroctonus micans* se estableció en abetos noruegos, había una relación negativa entre la cantidad de lignina, y el tamaño de la galería de adultos, quienes excavaron galerías más grandes en los árboles, con una baja concentración de lignina. Cuando *Ascoalyx abietina* de manera natural infectó madera de abetos elegantes de noruega, se acumularon compuestos fenólicos en la pared celular, y grandes volúmenes de lignina total. Cvikrova *et al.* (2006). Cuando *Pinus banksiana* fue atacado por el hongo *Gremmeniella abietina*, este invadió la corteza del tallo, las células del floema y el cambium vascular; los tejidos ligno-suberizados que producen los árboles enfermos, confinan al patógeno dentro del área afectada, siendo la primera demostración de un mecanismo anatómico en defensa de una coníferas, (Simard *et al.*, 2001). Los árboles genéticamente modificados con poca lignina aumentan la destrucción de bosques y formas de vida y son más susceptibles, no solo a daños por tormentas, sino también a ataques de insectos, hongos, y bacterias (Van *et al.*, 2004).

**Cuadro 4.** Contenido de componentes estructurales de la madera de árboles de nogal pecanero enfermos y sanos muestreados en tres diferentes Municipios del estado de Coahuila.

Estado Fisiológico	C (%)	L (%)	S (%)
Sano	58.808 b	10.1244 b	0.78473 b
Enfermo	61.781 a	19.1948 a	1.54080 a

Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes (P<0,05). 1 = sano; 2 = dañado. C = celulosa; L = lignina y S= sílice

Asimismo, en este estudio se observa que el silicio se incrementa significativamente en madera enferma con respecto a la sana (Cuadro 4). El Si forma agregados insolubles (fitolitos) y solubles (polímeros del ácido ortosilícico), entrelazados con celulosa y componentes de la pared celular, haciéndolas resistentes y flexibles, con lo que protegen al tejido contra la acción del agua, del aire y los microorganismos (Quero, 2007). Los fisiólogos vegetales no consideran al Si como un elemento esencial para las plantas; sin embargo, se ha reportado que la

presencia de sílice beneficia los cultivos, por inducción de resistencia y protección contra diversos factores ambientales bióticos y abióticos atribuido en parte a su acumulación y polimerización en las paredes celulares, lo cual constituye una barrera mecánica contra el ataque de patógenos e insectos (Epstein, 1999). El Si activa una serie de genes defensivos en arroz, trigo, y maíz; se confirma que algunos insectos predadores (Coleoptera: Coccinellidae) se alimentan más en plantas con mayores niveles de Si, lo que implica que las plantas suplementadas con Si liberan compuestos volátiles para atraer a los enemigos naturales de las plagas. Esto genera, consecuentemente, un decremento en la preferencia de los insectos por las plantas (Batista *et al.*, 2005). Así mismo (Vázquez *et al.*, 2007) encontraron que algunas biomoléculas como aldehídos, terpenos, ésteres monoterpénoides, ésteres de cianohidrina, cianohidrininas, sesquiterpenos, aceites esenciales, furanos, alcaloides, y compuestos fenólicos (taninos) presentes de manera natural en plantas, probados en diferentes bioensayos, mostraron actividad insecticida, o fitotóxica, en control de plagas.

### Conclusiones

La concentración de terpenos, taninos hidrolizables, celulosa, lignina, y sílice aumentaron significativamente en árboles enfermos, esto permite inferir que el aumento de estos componentes es una respuesta de defensa bioquímica del hospedero a la invasión del insecto, y a la acción enzimática de los hongos fitopatógenos asociados. Los resultados confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a la expresión, o represión, de genes cuyos productos participan en las diferentes vías metabólicas que participan en la defensa.

Estos genes, llamados genes de defensa, conforman la base de la resistencia horizontal o poligénica conocida por los fitopatólogos y mejoradores de plantas. Los mecanismos de defensa de la resistencia horizontal, sean estos la producción de fitoalexinas, metabolitos secundarios, proteínas PR, deposición de lignina, reacción hipersensible o SAR; son los responsables de actuar en detrimento del patógeno invasor. En otras palabras, la defensa en plantas es básicamente poligénica. Por otro lado, los genes R conforman la base de la resistencia vertical o monogénica u oligogénica. A pesar de lo que sugiere su nombre, los genes R no son directamente responsables de la resistencia, sino que actúan como receptores de las señales (proteínas Avr) originadas del patógeno. Esto conlleva a la activación de diferentes cascadas de señales que, en última instancia, inician la expresión de genes responsables

de los mecanismos de defensa

### Literatura Citada

- Alonso, I., Hartley, S.E., Thurlow, M. 2001. Competition between heather and grasses on Scottish moorlands: Interacting effects of nutrient enrichment and grazing regime. *J. Vegetation Sci.* 12: 249-260.
- Alvírez, V. R. 2007. Capacidad patogénica de los hongos aislados del barrenador ambrosial (*Euplatypus segnis*) (Chapuis) (Coleoptera: Platypodidae) y tejido vegetal del nogal pecanero (*Carya illinoensis*) Koch y sus metabolitos secundarios. Tesis Postgrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Batista, G.F., Campos, M.J., Donizete, S.C., Marcos, G. M. 2005. Resistance induction in wheat plants by silicon and aphids. *Sci. Agric.* 62: 547-551.
- Berryman, A.A. 1972. Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. *BioScience* 22:598-602.
- CESAVECO. 2006. Comité estatal de sanidad vegetal del estado de Coahuila. Boletín, 158.
- Coronel, E. O. 1994. Fundamentos de las propiedades físicas y mecánicas de las maderas. Primera Parte. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. p.13-28.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiol. Rev.* 10, 564-5
- Christiansen, E. Fjone, G. 1993. Pruning enhances the susceptibility of *Picea abies* to infection by the bark beetle-transmitted bluestain fungus, *Ophiostoma polonicum*. *Scand. J. For. Res.* 8(82): 235-245.
- Cvikrova, M., Mala J., Hrubcova, M., Eder, J. 2006. Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascocalyx abietina* infected Norway spruces. *Plant Sci.* 170 563–570.
- Encinas, O., Velásquez, J. Rojas, L. 2000. Applications of biopreservatives from naturally durable woods in the preservation of caribbean pine. Documento impreso. ULA. 62p.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641-664.
- Eyles, A., Davies, N. W., Mohammed, C. 2003. Wound wood formation in *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*: anatomy and chemistry. *Can. J. For. Res.* 33(12): 2331–2339
- Fengel, D., Wegener, G. 1984. “Wood Chemistry, Ultrastructure Reaction”, Walter de Gruyter, Berlín, Germany. pp: 2-220.
- González-Laredo, R. F. 1996. Preservación de madera con taninos. *Madera y Bosques* 2(2): 67-73 67.
- Hietala, A.M., Kvaalen, H., Schmidt, A., Jøhnk, N., Solheim, H., Fossdal, C.G. 2004. Temporal and spatial profiles of chitinase expression by Norway spruce in response to bark colonization by *Heterobasidion annosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3948–3953.
- Honorato-Salazar, J. A., Hernández-Pérez, J. 1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del Estado de Puebla. *Madera y Bosques* 4(2): 79-93.
- Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H., Villalon, B. 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1713-1720.
- Kessler, A., Baldwin, T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emission in nature. *Science* 291: 2141-2144.
- Klepzig, D. D., Smalley, E. B., Raffa, K. F. 1996. Combined chemical defenses against an insect-fungal complex. *J. Chem. Ecol.* 22 (8): 1367-1388.
- Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., Capelloni, M. 2004. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 52, 90-94
- Mattson, W.J. Jr. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11: 119-161.
- Morita, S., Yasaki, Y. Johnson, G.C. 2001. Mycelium growth promotion by water extractives from inner bark of radiate pine (*Pinus radiata*, Don.). *Holzforchung* 55(2): 155-158.
- Muñoz-Concha, D., Vogel H. y Razmilic I. 2004. Variation of chemical compounds in leaves of *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) populations in Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77: 43-50.
- Nagy, N.E., Fossdal, C.G., Krokene P, Krekling T., Lønneborg A., Solheim H. 2004. Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiol.* 24: 505–515.
- Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 369-389.
- Phelan, P.L., Mason, J.F., Stinner, B. R. 1995. Soil fertility management and host preference by European borer. *Ecosyst. Environ.* 56; 1-8
- Quero, G. E. 2007. Silicio en la protección de las plantas. División de Investigación, Instituto Tecnológico Supe-

- rior de Uruapan. Protección y Nutrición de Hortalizas y Frutas. 5 (26)
- Rocha, B.V., Nobuo, A.S. 2001. Avalicao dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maiden como preservativo de madeira. Rev. Arvore 25(2): 245-256.
- Semiz, G., Heijari, J., Isik, K., Holopainen, J.K. 2007. Variation in needle terpenoids among *Pinus sylvestris* L (Pinaceae) provenances from Turkey. Biochem. Syst. Ecol. 35: 652-661.
- Simard, M., Rioux D., y Laflamme, G. 2001. Formation of Ligno-Suberized Tissues in Jack Pine Resistant to the European Race of *Gremmeniella abietina*. Biochem. Cell Biol. 91 (12): 1128-1140.
- Singh, A.P. Kim, Y.S., 1997. Biodegradation of wood in wet environments: a review. The International Research Group of Wood Preservation. Document No. IRG/WP 97-10217.
- Thompson, A., Cooper, J., Ingram, L.L. 2006. Distribution of terpenes in heartwood and sapwood of loblolly pine. Forest Prod. J. 56:7-8.
- Torres, R. A. Chacón E., Armas S. Espinoza F. 2005. Efecto de los patrones de siembra sobre la producción de proteína cruda en bancos de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. Zootecnia Trop. 23(1):27-38.
- Trapp, S. Croteau, R., 2001, Defensive Resin Biosynthesis in Conifers. Annu. Rev. Plant Biol. 52: 689-724.
- Van F. K. Beardmore, T. 2004. Current status and environmental impact of transgenic forest trees. Can. J. For. Res. 1163-1180.
- Van Soest, P. J. and R. H. Wine. 1988. Determination of lignin, cellulose and silice in Acid-Detergent Fiber with Permanganate. 5 Assoc. Official Annals Chem. 51: 780.
- Vázquez, L., A. Pérez, F., L. Díaz S., R. 2007. Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. Cienc. Tecnol. Aliment. 5(4) 306-313.
- Ventura-Sobrevilla, J. M. 2006. Biodegradación de taninos presentes en extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.) y hojases (*Flouencia cernua* D.C.) mediante fermentación en estado sólido usando *Aspergillus niger* PSH. Tesis de Maestría en Ciencia del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Vivanco, J. M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V. M. Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia 10 (8) 68-75.
- Wainhouse, D., Ashburner R., Ward, E. Boswell, R. 1998. The Effect of Lignin and Bark Wounding on Susceptibility of Spruce Trees to *Dendroctonus micans*. J. Chem. Ecol. 24 (9)
- Wainhouse, D. Cross, D. J. and Howell, R. S. 1990. The role of lignin as a defence against the spruce bark beetle *Dendroctonus micans*: effect on larvae and adults. Oecologia 85 (2)
- Wilcox, W.W. 1978. Review of the literature on the effects of early stages of decay on wood strength. Wood and Fiber 9:252-257.
- Zwenger, S. y Basu, C. 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnol. Molecular Biol. Rev. 3 (1): 1-7.
-