



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Interacción *Macroductylus mexicanus*
(Coleoptera: Melolonthidae) y
Acaciella angustissima (Fabaceae)
mediada por compuestos orgánicos
volátiles

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Noe Yamil Pages Paez

Director

Dr. Angel Alonso Romero López

Codirector

Dr. Andrés Ramírez Ponce



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Interacción *Macrodactylus mexicanus*
(Coleoptera: Melolonthidae) y
Acaciella angustissima (Fabaceae)
mediada por compuestos orgánicos
volátiles

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Noe Yamil Pages Paez

Comité Tutorial

Dr. Amando Bautista Ortega

Dr. Alan Carrasco Carballo

Hoja de financiamiento

La investigación se llevó a cabo en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), otorgando una beca de manutención al estudiante para sus estudios de maestría (número: 1140359) por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Oficio de autorización



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC)
Maestría en Ciencias Biológicas
Proceso: Posgrado CTBC
Registro: Carta Autorización de Impresión de Tesis

Código: 503-RGE-26

Revisión: 03

COORDINACIÓN MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

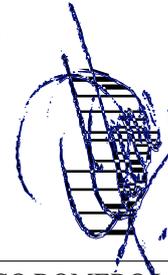
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Noe Yamil Pages Paez** realiza para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “**Interacción *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) y *Acaciella angustissima* (Fabaceae) mediada por compuestos orgánicos volátiles**”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

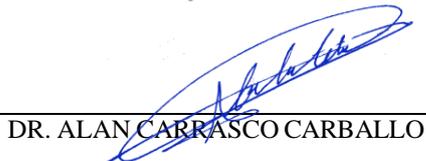
A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 13 DE OCTUBRE DEL 2023



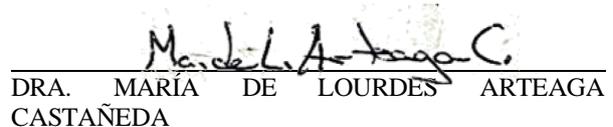
DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA



DR. ANGEL ALONSO ROMERO LÓPEZ



DR. ALAN CARRASCO CARBALLO



DRA. MARÍA DE LOURDES ARTEAGA CASTAÑEDA



DR. JORGE VÁZQUEZ PÉREZ



BUAP

**COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE**

Sirva este medio para describir el proceso de revisión del escrito de tesis “Interacción *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) y *Acaciella angustissima* (Fabaceae) mediada por compuestos orgánicos volátiles”, preparado por el estudiante **Noe Yamil Pages Paez** y con el cual aspira a obtener el grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**. Como Director de tesis, revisé el documento preparado por Pages Paez antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente, por los miembros de su Comité tutorial, quienes plasmaron también sus observaciones. En este mismo mes de octubre, el documento final de tesis se procesó con el programa “Turnitin”, mostrándose poco texto con similitudes (13%). Examinando los detalles de la búsqueda, se observó que estas similitudes se reflejan principalmente en frases que se emplean cotidianamente en el área de estudio, así como en algunos pies de figura. Dicho texto contiene las citas correspondientes que indican de dónde fue tomada la información, por lo que confirmo que el estudiante **no incurrió en ninguna práctica no deseable** al momento de la redacción del documento.

Sin más por el momento, envío saludos cordiales.

Atentamente
H. Puebla de Z., a 19 de octubre de 2023


Dr. Angel Alonso Romero López
Director de tesis
Profesor-investigador Facultad de Ciencias Biológicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

C.c.p. Archivo

Facultad de
Ciencias Biológicas

Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria, Puebla,
Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7097, 7085, 7084 y 7086

Agradecimientos

Agradezco a la UATx y al CTBC por permitirme seguir avanzando y culminar mis estudios de grado.

Agradezco al CONACyT por haberme apoyado con una beca (número: 1140359), para realizar este proyecto.

Agradezco al Dr. Angel Alonso Romero López por su gran compromiso y conocimiento que me ha brindado a lo largo de estos años, su paciencia y enseñanza ha sido clave en mi formación.

Agradezco al Dr. Andrés Ramírez Ponce por su tiempo y ayuda con el escrito.

Agradezco al Dr. Amando Bautista Ortega por su atención y conocimiento.

Agradezco al Dr. Alan Carrasco Carballo por su valioso tiempo, conocimiento, amistad e instalaciones en todo este tiempo.

Agradezco a la Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda por su tiempo para revisar el escrito

Agradezco al Dr. Jorge Vázquez Pérez por su tiempo para revisar el escrito y su apoyo

Agradecimientos a título personal

Agradezco a mis hermanas y a mi madre por su paciencia, cariño y amor. Madre, todo tu apoyo ha sido clave para que yo siga firme en mis metas, te amo.

Agradezco a mi familia completa que, pese a las circunstancias adversas, nos hemos mantenido unidos, ahora más que nunca. A todos ustedes mi cariño sincero.

Agradezco a aquellas amistades que son familia; mis queridos Crasborn, López y Juárez

Agradezco al Laboratorio de Infoquímicos y Otros Productos Bióticos y al Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica

Agradezco al Doctorando Jesús Alberto Rojas, a la Maestra en Ciencias Fernanda Salgado y a la Biol. Abigail Juárez por su gran ayuda y amistad

Agradezco a los “silvestres” por incluirme en su grupo de trabajo cuando curse mis estudios de maestría

Dedicatoria especial

Dejé estas últimas líneas de escritura porque resultaban ser las más difíciles, pero las más necesarias para concluir este proyecto que inicié con tu apoyo y cariño, y que se suponía que estaríamos reunidos al finalizarlo. Porque te debo mucho desde mis inicios y que seguiré pagando con buenas acciones y más metas aun sin estar a tu lado. Te dedico esta parte de mi vida, así como mil logros más que esperan ser vividos y escritos, y que cada uno llevará tu esencia, porque aun cuando tú ya no puedes estar físicamente a mi lado, estás en mi pensar y mi sentir cada instante. No sé qué hay más allá, pero a donde quiera que te encuentres, mi mayor admiración y amor hacia ti, Lilia.

Índice

1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	3
2.1. Compuestos Orgánicos Volátiles.....	3
2.2. Interacciones planta-insecto mediadas por COV: el caso planta hospedera – adultos de Melolonthidae.....	3
2.3. Interacción entre adultos de <i>M. mexicanus</i> y sus plantas hospederas mediada por COV ..	5
2.4. Comportamiento mediado por COV en las interacciones Melolonthidae-planta	6
2.5. Recepción de COV en adultos de Melolonthidae: quimiorreceptores y OBP	6
2.6. Modelos biológicos bajo estudio	8
2.6.1. <i>Macrodactylus mexicanus</i>	8
2.6.2. <i>Acaciella angustissima</i>	9
2.7. Extracción-identificación de COV que median interacciones con adultos de <i>M. mexicanus</i>	10
2.8. Confirmación de actividad biológica para el estudio de interacciones y comunicación química de Melolonthidae y <i>Macrodactylus mexicanus</i>	11
2.8.1. Estudios <i>in silico</i>	11
2.8.2. Bioensayos en laboratorio con olfatómetro	12
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	14
5. Objetivos	14
5.1. Objetivo general.....	14
5.2. Objetivos particulares	15
6. Metodología.....	15
6.1. Obtención de insectos, hojas y flores	15
6.2. Extracción e identificación de COV de hojas y flores de <i>A. angustissima</i>	16
6.3. Bioensayos de confirmación de actividad biológica	16
6.3.1. <i>In silico</i>	16
6.3.2. Bioensayos en laboratorio	19
7. Resultados	20
7.1. Secuencia comportamental de la interacción <i>M. mexicanus</i> - <i>A. angustissima</i>	20
7.2. Extracción y CG-EM de COV de hojas y flores <i>A. angustissima</i>	20
7.3. Bioensayos de confirmación de actividad biológica	24
7.3.1. <i>In silico</i>	24

7.3.2. Docking molecular.....	29
7.3.3. Diagramas 2D de interacciones con aminoácidos.....	38
7.3.4. Bioensayos en laboratorio.....	61
8. Discusión.....	63
8.1. Descripción secuencial de la interacción entre <i>M. mexicanus</i> y <i>A. angustissima</i>	63
8.2. Extracción e identificación de COV de hojas y flores de <i>A. angustissima</i>	65
8.3. Bioensayos de confirmación biológica.....	65
8.3.1. <i>In silico</i> mediante docking molecular.....	65
8.3.2 Bioensayos en laboratorio.....	67
9. Perspectivas.....	69
10. Conclusiones.....	69
11. Literatura citada.....	70
Glosario.....	76

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras químicas de los terpenos α -pineno y mirceno, compuestos identificados en hojas de <i>Acaciella angustissima</i>	6
Figura 2. Representación de la estructura de una OBP “clásica”, observando sus seis hélices α (H- α), tres puentes de disulfuro (PD), los seis residuos de cisteína (CYS) y su respectiva posición. El * en color rojo indican la cavidad de acoplamiento con las moléculas, mientras que de color azul y gris se observan los compuestos α -pineno y β -ionona acoplados a la OBP.	8
Figura 3. Adulto de <i>Macroductylus mexicanus</i> ; mostrando las meso y metatibias rojizas.	9
Figura 4. Árbol de <i>Acaciella angustissima</i>	10
Figura 5. Sistema Clevenger modificado para extracción de Volátiles. Tomado de Pages (2021).	11
Figura 6. Olfatómetro en forma de “Y” empleado para bioensayos en laboratorio.	13
Figura 7. Zona de estudio Parque Estatal “Cerro Zapotecas” ubicado en San Pedro Cholula, en temporada de verano de 2022.	16
Figura 8. Estructura química del α -pulegona (control positivo) y mirceno (control negativo) empleadas para los acoplamientos moleculares en OBP de Melolonthidae y COV de <i>A. angustissima</i>	17
Figura 9. Representación gráfica de la secuencia de la interacción entre adultos de <i>M. mexicanus</i> y arbustos de <i>A. angustissima</i> . 1. DA=desplazamiento aéreo en dirección hacia arbustos, 2.PH=Posado en hoja, 3. DH=desplazamiento a través del envés de hoja, 4. DA=desplazamientos aleatorios a través de la hoja, 5. DT=desplazamiento a través de tallo, 6. MA=movimiento antenal; 7. DF=desplazamiento hacia flor, y 8. PF=posado en flor. Tomado de Pages-Paez y Romero-López, 2023.	20
Figura 10. Cromatograma de compuestos químicos obtenidos de hojas y flores de <i>Acaciella angustissima</i> que se recolectaron en la temporada de verano del 2022 en el Cerro Zapotecas, Puebla. En el eje de las ordenadas se muestran las abundancias de los compuestos, mientras que en el eje de las abscisas los picos cromatográficos y tiempos de retención en minutos para cada compuesto.	22
Figura 11. Alineamiento de secuencias de OBP de Melolonthidae y OBP homólogas de insectos señalando con “*” los residuos de cisteínas conservados y observando la tendencia de los seis residuos de las OBP.....	24
Figura 12. Porcentaje de identidad de 41.46 % entre 6JMP (<i>C. pallens</i>) con AZZ86674.1 (<i>H. oblita</i>).	25
Figura 13. Porcentaje de identidad de 28.95% entre 4Z45 (<i>N. ribisnigri</i>) con AVM18965.1 (<i>H. parallela</i>).	25
Figura 14. Porcentaje de identidad de 25.41 % entre 6QQ4 (<i>D. melanogaster</i>) con AKI84360.1 (<i>H. parallela</i>).....	26

Figura 15. Dendograma basado en las secuencias de aminoácidos de las OBP de Melolonthidae y de OBP homólogas. Representación de insectos tomada de Google imágenes.....	27
Figura 16. Modelado de OBP AZL87166.1 <i>Holotrichia oblita</i> con la plantilla 2L2C <i>Culex quinquefasciatus</i> y de AZZ86674.1 <i>H. oblita</i> con 6JMP <i>Chrysopa pallens</i> .	28
Figura 17. Modelado de OBP AVM18965.1 <i>H. parallela</i> con la plantilla 4Z45 <i>Nasonovia ribisnigri</i> , AVM18961.1 <i>H. parallela</i> con 6HHE <i>Ceratitis capitata</i> y AKI84360.1 <i>H. parallela</i> con 6QQ4 <i>Drosophila melanogaster</i>	28
Figura 18. Modelado de OBP AMR98356.1 <i>Hylamorpha elegans</i> con la plantilla 3K1E <i>Aedes aegypti</i> , AMR98355.1, <i>H. elegans</i> con 5DIC <i>Phormia regina</i> y AMR98353.1 <i>H. elegans</i> con 6QQ4 <i>Drosophila melanogaster</i>	29
Figura 19. A) OBP AZL87166.1 <i>H. oblita</i> con la plantilla 2L2C <i>C. quinquefasciatus</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa al ciclo,2.....	31
Figura 20. A) OBP AZZ86674.1 <i>H. oblita</i> con 6JMP <i>C. pallens</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici (2.2.1).	32
Figura 21. A) OBP AVM18965.1 <i>H. parallela</i> con la plantilla 4Z45 <i>N. ribisnigri</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici [2.2.1]......	33
Figura 22. A) OBP AVM18961.1 <i>H. parallela</i> con 6HHE <i>C. capitata</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici (2.2.1).	34
Figura 23. A) OBP AKI84360.1 <i>H. parallela</i> con 6QQ4 <i>D. melanogaster</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa al Eug.	35
Figura 24. A) OBP AMR98356.1 <i>H. elegans</i> con la plantilla 3K1E <i>A. aegypti</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici [2.2.1]......	36
Figura 25. A) OBP AMR98355.1, <i>H. elegans</i> con 5DIC <i>P. Regina</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Con valor más negativo se observa al Eug.	37
Figura 26. A) OBP AMR98353.1 <i>H. elegans</i> con 6QQ4 <i>D. melanogaster</i> y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Con valor más negativo se observa al (+)-4-car.....	38
Figura 27. Interacciones aminoacídicas de la OBP AZL87166.1 <i>H. oblita</i> con la plantilla 2L2C <i>C. quinquefasciatus</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: Enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales y halos grises: exposición al disolvente.	40
Figura 28. Interacciones aminoacídicas de la OBP AZZ86674.1 <i>H. oblita</i> con 6JMP <i>C. pallens</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción”; verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga	

negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y flecha verde: interacción π - π	43
Figura 29. Interacciones aminoacídicas de la OBP AVM18965.1 <i>H. parallela</i> con la plantilla 4Z45 <i>N. ribisnigri</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción”; verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y crema: interacción con glicina.	46
Figura 30. Interacciones aminoacídicas de la OBP AVM18961.1 <i>H. parallela</i> con 6HHE <i>C. capitata</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: Enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y flecha verde: interacción π - π	49
Figura 31. Interacciones aminoacídicas de la OBP AKI84360.1 <i>H. parallela</i> con 6QQ4 <i>D. melanogaster</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente.	51
Figura 32. Interacciones aminoacídicas de la OBP AMR98356.1 <i>H. elegans</i> con la plantilla 3K1E <i>A. aegypti</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente.	54
Figura 33. Interacciones aminoacídicas de la OBP AMR98355.1, <i>H. elegans</i> con 5DIC <i>P. Regina</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y flecha verde: interacción π - π	56
Figura 34. Interacciones aminoacídicas de la OBP AMR98353.1 <i>H. elegans</i> con 6QQ4 <i>D. melanogaster</i> para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente.	59
Figura 35. Respuestas positivas de adultos de <i>Macrodactylus mexicanus</i> hacia el macerado de hojas y flores de <i>Acaciella angustissima</i> contra el control. Chi-cuadrada*. Diferencias estadísticas significativas con respecto al control. n=30. MH+FAa = macerado de hojas y flores de <i>A. angustissima</i> ; C= control.	61
Figura 36. Adulto de <i>Macrodactylus mexicanus</i> dirigiéndose al estímulo de macerado de hojas y flores de <i>Acaciella angustissima</i> en olfatómetro.	62
Figura 37. Respuestas de adultos de <i>Macrodactylus mexicanus</i> por sexos hacia el tratamiento MH+FAa = macerado de hojas y flores de <i>Acaciella angustissima</i> y a C= control.	63
Figura 38. Etapas de la comunicación química de insectos que respalda el esquema que detona la interacción entre adultos de <i>Macrodactylus mexicanus</i> y los arbustos de	

Acaciella angustissima en su hábitat. Se representa desde la liberación de compuestos por parte de un “emisor” ancestral en el que el receptor ancestral no cuenta aún con quimiorreceptores antenales hasta que un emisor que envía “información” a través de “mensajes” provoca respuestas específicas y dirigidas por parte de un receptor dotado de un sistema quimiosensorial establecido. Modificado de Leonhardt *et al.* (2016)..... 64

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de los aminoácidos de acuerdo con su cadena lateral y abreviación.	17
Cuadro 2. OBP seleccionadas de las especies Melolonthidae empleadas para el alineamiento de secuencias de aminoácidos y creación de estructuras tridimensionales.....	18
Cuadro 3. OBP seleccionadas de Melolonthidae y de organismos de referencia por pares para comparación de porcentaje de identidad.	18
Cuadro 4. Nombre, abundancia y estructura de los compuestos que conforman el perfil químico de hojas y flores de <i>Acaciella angustissima</i> recolectada en la temporada de verano del 2022 en el Cerro Zapotecas, Puebla.....	23
Cuadro 5. Porcentaje de identidad por pares de OBP con plantillas.	26
Cuadro 6. Valores energéticos (Kcal/mol) obtenidos del docking molecular por ligando-proteína.....	30
Cuadro 7. Residuos aminoacídicos de la OBP AZL87166.1 <i>Holotrichia oblita</i> con la plantilla 2L2C <i>Culex quinquefasciatus</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	41
Cuadro 8. Residuos aminoacídicos de la OBP AZZ86674.1 <i>H. oblita</i> con 6JMP <i>C. pallens</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	44
Cuadro 9. Residuos aminoacídicos de la OBP AVM18965.1 <i>H. parallela</i> con la plantilla 4Z45 <i>N. ribisnigri</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	47
Cuadro 10. Residuos aminoacídicos de la OBP AVM18965.1 <i>H. parallela</i> con la plantilla 4Z45 <i>N. ribisnigri</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	50
Cuadro 11. Residuos aminoacídicos de la OBP AKI84360.1 <i>H. parallela</i> con 6QQ4 <i>D. melanogaster</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	52
Cuadro 12. Residuos aminoacídicos de la OBP AMR98356.1 <i>H. elegans</i> con la plantilla 3K1E <i>A. aegypti</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	54
Cuadro 13. Residuos aminoacídicos de la OBP AMR98355.1, <i>H. elegans</i> con 5DIC <i>P. Regina</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	57

Cuadro 14. Residuos aminoacídicos de la OBP AMR98353.1 <i>H. elegans</i> con 6QQ4 <i>D. melanogaster</i> que interactúan con los compuestos identificados de <i>Acaciella angustissima</i>	60
Cuadro 15. Porcentaje de respuestas positivas y desplazamientos detectados en la actividad de adultos de <i>Macrodactylus mexicanus</i> hacia macerados de hojas y flores de <i>Acaciella angustissima</i> , desglosados por sexos y por tipo de respuesta en los bioensayos con olfatómetro. n=30.....	62

Resumen

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son sustancias químicas emitidas por las plantas que, bajo el contexto químico-ecológico, son los responsables de mediar las interacciones que establecen con los insectos. Los COV forman parte de actividades cruciales de los fitófagos como es la reproducción, alimentación y búsqueda de plantas hospedadoras. Por otro lado, al emplear un análisis *in silico* para estudios químico-ecológicos, se aporta conocimiento sustancial sobre las interacciones entre los insectos y las plantas, ya que sirven como primer paso para su entendimiento, además de brindar un ahorro en tiempo y capital. En este estudio se complementó la información sobre la interacción que establecen los adultos de *Macroductylus mexicanus* Burmeister (“frailecillos”) y los arbustos de *Acaciella angustissima* Mill. (Britton & Rose) (acacia). En primera instancia, se generó un perfil de los COV que forman parte de hojas y flores de esta acacia, destacando α -pineno como el compuesto más abundante de los doce que se analizaron. Simultáneamente, se llevaron a cabo los análisis *in silico* correspondientes desde la elección de secuencias de proteínas de unión a olores (OBP, por sus siglas en inglés) hasta el modelado por homología de OBP “moldes” de acuerdo con los principales volátiles de plantas registrados en la literatura para coleópteros Melolonthidae. El modelo con mayor porcentaje de identidad fue el de la OBP molde de *Chrysopa pallens* Rambur (41.46%), tomando como referencia OBP de *Holotrichia oblita* Faldermann. Con las estructuras 3D de cada una de las OBP se desarrolló el acoplamiento mediante el docking molecular para obtener los valores energéticos (Kcal/mol) y las interacciones con los residuos de aminoácidos; en este caso, destacaron leucina, isoleucina, valina y alanina con el mayor número de interacciones a este nivel. Como complemento, se establecieron bioensayos de laboratorio por olfatómetro para evidenciar que los COV liberados por macerados de hojas y flores de *A. angustissima* detonan la interacción con los adultos de *M. mexicanus*. Se registraron respuestas positivas estadísticamente significativas por parte de los adultos de esta especie hacia los macerados de hojas+flores de acacia, con respecto al control ($X^2 = 8.53$, $p < 0.05$); tales respuestas se detectaron en por lo menos el 90% de los insectos que se sometieron a las pruebas, mostrando una tendencia en donde tanto hembras como machos presentan taxias positivas hacia los estímulos. Todas estas líneas de evidencia respaldan el papel de los COV en esta interacción insecto-planta.

1. Introducción

Las interacciones bióticas se establecen entre dos o más participantes; el resultado de éstas es el beneficio o la afectación de acuerdo con el contexto (Boege y del Val, 2011). La Ecología química es una disciplina en la cual se estudian dichas interacciones desde un punto de vista químico y sus procesos de emisión y percepción entre los organismos (Acevedo, 2020). Con la evolución de los organismos, la transferencia de información aumentó su complejidad, primero detectando las sustancias químicas, pasar a ser señales y, por último, una comunicación “verdadera” (Leonhardt *et al.*, 2016) que bajo este contexto se conoce como esquema de comunicación química y que dicha transmisión de información provoca modificaciones en el comportamiento o en aspectos fisiológicos del receptor (Dicke y Sabelis, 1988; Romero-López, 2016).

Los adultos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister (“frailecillos”) forman parte de los coleópteros Melolonthidae y destacan por su importancia agrícola y ecológica (Morón *et al.*, 2014), evidenciándose que localizan a sus parejas y a sus plantas hospederas mediante los denominados compuestos orgánicos volátiles (COV) (Romero-López, 2016). Recientemente se ha demostrado que tanto hembras como machos de *M. mexicanus* presentan patrones de comportamiento relacionados con los COV liberados por hojas de especies vegetales de los géneros *Eysenhardtia* (Morales-Blancas y Romero-López, 2020), *Aesculus*, *Baccharis* y *Zea* (Romero-López, 2016). Asimismo, se ha modelado por “docking” molecular: herramienta bioinformática empleada para simular la interacción entre moléculas, la actividad biológica que detonan algunos COV de las hojas de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose (“acacia”) en adultos de *M. mexicanus*, al acoplarse con proteínas de unión a olores (OBP, por sus siglas en inglés: Odorant-binding proteins) de las antenas de otras especies de insectos (Pages-Paez, 2021). A pesar de ello, se requiere complementar la información sobre el acoplamiento molecular con OBP cercanas a *M. mexicanus* y con COV de otras estructuras vegetales, como las florales y efectuar bioensayos de confirmación biológica en laboratorio.

Por ello, en la presente investigación se pretende el estudio de la interacción que establecen los adultos de *M. mexicanus* con arbustos de *A. angustissima* a partir de los COV liberados por sus hojas y flores, desde su nivel molecular con la implementación del docking molecular. De esta manera, se podrá complementar la información sobre la comunicación química de esta especie de Melolonthidae y explorar una posible

participación de estos insectos como visitantes florales de estas acacias y otras especies vegetales distribuidas en México.

2. Antecedentes

2.1. Compuestos Orgánicos Volátiles

Las plantas destinan una gran cantidad de carbono asimilado para la producción de metabolitos secundarios, los cuales están estrechamente relacionados con funciones ecológicas. Los metabolitos secundarios se pueden clasificar en cuatro grandes grupos; alcaloides, glicósidos, compuestos fenólicos y terpenos, este último constituye el grupo más numeroso de los metabolitos secundarios. Estas sustancias son insolubles en agua y se componen de unidades llamadas isoprenos (5 átomos de carbono) y es donde se encuentran los COV (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Baldelomar *et al.*, 2018). Los COV son sustancias lipofílicas que se producen en diferentes partes de las plantas y se emiten por factores abióticos y bióticos; la mayoría son gases al ser expuestos a temperatura ambiente, además de servir como mecanismos de defensa, atracción y repelencia (Cantúa-Ayala *et al.*, 2019). Se trata de compuestos químicos que constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta (López-Luengo, 2004) y son producidos, en mayor parte, por el metabolismo secundario de especies vegetales de las familias Apiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Piperaceae, Verbenaceae y Rutaceae (Soto-Vázquez *et al.*, 2019). Dentro de estos mismos grupos de plantas existe una amplia variedad de perfiles metabólicos, lo cual es una estrategia de adaptación, pues se sabe que como defensa ante patógenos o insectos fitófagos, a éstos les es más difícil infectar o alimentarse de plantas que contienen mezclas diferentes de metabolitos secundarios. En contraste, esta variación contribuye al establecimiento de la simbiosis con otros organismos y la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, traduciéndose en efectos benéficos para las especies vegetales (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

2.2. Interacciones planta-insecto mediadas por COV: el caso planta hospedera – adultos de Melolonthidae

La ecología química es una disciplina dentro de la investigación científica que aborda el estudio de las sustancias involucradas en las interacciones intraespecíficas e interespecíficas de los organismos (Cortez, 2013). Entre dichas sustancias químicas destacan los COV, los cuales detonan los eventos ecológicos más relevantes en la naturaleza (Cantúa-Ayala *et al.*, 2019). La elección de una planta como hospedera por

parte de los insectos está relacionada con la calidad del recurso alimentario, la fecundidad y la frecuencia de oviposición (López *et al.*, 1999) a través de una secuencia comportamental en la cual el insecto distingue entre su planta hospedera y la que no lo es mediante la búsqueda, localización y aceptación del sitio (Nieves-Silva, 2019). Estas interacciones también representan ventajas reproductivas para la planta, como es el caso de los visitantes florales, proporcionando un servicio ambiental esencial para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres (Reyes-Prado *et al.*, 2019).

Los coleópteros Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014) destacan por su ciclo biológico y hábitos alimentarios, modifican sustancialmente el ambiente ya sea como “plagas” por su actividad rizofágica o como “ingenieros del ecosistema” por los beneficios que pueden brindarle al sitio en el que se desenvuelven (Morón, 2001; Romero-López *et al.*, 2010) y por las interacciones ecológicas que pueden establecer. Se ha estudiado este esquema en adultos de *Macroductylus subspinosus* F., (Heath *et al.*, 2001), *Melolontha hippocastani* F., (Ruther *et al.*, 2000, 2001, 2002) y *Melolontha melolontha* L., (Reinecke *et al.*, 2002), en los cuales se ha mencionado que su comportamiento está mediado por los COV de sus plantas hospederas, provocando principalmente respuestas de atracción (Romero-López, 2016) y observando que COV como el butirato de octilo, butirato de n-nonilo, 1-nonanol, una mezcla de ácidos valérico y hexanoico (1:1) y la mezcla ácido valérico, ácido hexanoico y butirato de octilo (1:1:1) destacan como atrayentes de estos insectos (Morales-Blancas y Romero-López, 2019). Yarden y Shani (1994), por su parte, reportaron atracción de machos y hembras de *Maladera matrida* Argaman, hacia volátiles de hojas de *Arachis hypogaea* (L.), en observaciones de campo y laboratorio. Con respecto a especies distribuidas en México, se han generado datos para adultos de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y *Phyllophaga ravidata* Blanchard, para los cuales se ha detallado su interacción con árboles de encino (*Quercus* spp.) (Romero-López *et al.*, 2007). En años recientes se sabe que los adultos de *Macroductylus nigripes* Bates establecen relaciones estrechas con los arbustos del “azumiate” *Baccharis salicifolia* (Ruíz & Pav. Pers.) por medio de COV emitidos por las hojas, observándose un vuelo dirigido de los insectos hacia ellas; además de haber identificado tres compuestos más abundantes (α -pineno, trimetilidán y ciclohexilbenceno) reportados para otras especies hospederas de este género (Nieves-Silva y Romero-López, 2019).

2.3. Interacción entre adultos de *M. mexicanus* y sus plantas hospederas mediada por COV

Los adultos del género *Macroductylus* pueden defoliar por completo a sus hospederos vegetales y causar disminución significativa en la producción de cultivos agrícolas o frutales (Serapio-Jerónimo *et al.*, 2014), aunque en algunas condiciones pueden promover un efecto de poda en diferentes árboles y arbustos, con un impacto positivo en el desarrollo de estos (Romero-López, 2016; Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020).

Los integrantes de *M. mexicanus* muestran una amplia distribución en México, localizándose en Tlaxcala, Puebla, Ciudad de México, Estado de México, Michoacán, Querétaro, Veracruz, Oaxaca, Coahuila, Morelos, Hidalgo, Durango y Jalisco. La época del año en que manifiestan su mayor actividad es de mayo a septiembre y se encuentran en climas semicálidos y templados, con altitudes que van de los 100 a los 2650 msnm (Arce-Pérez y Morón, 2012). Los adultos de esta especie se alimentan de diferentes plantas silvestres y cultivadas, principalmente de flores, hojas y frutos, mientras que las larvas prefieren las raíces de diferentes especies vegetales, formando así parte de los denominados “ensambles gallinas ciegas” (Romero-López, 2012). A la fecha se ha avanzado en el estudio de la interacción entre los adultos y algunas de sus plantas hospederas. Se sabe que los primeros acercamientos de estos insectos con las plantas se fundamentan en los COV y algunas evidencias de ello son los reportes de Nieves-Silva y Romero-López (2019) con los COV liberados por las hojas de *B. salicifolia* y de los encinos de diversas especies de *Quercus* (Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020), así como los posibles COV liberados por brotes florales del “palo dulce” *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Morales-Blancas y Romero-López, 2020).

Para el género *Acaciella*, perteneciente a la familia Leguminosae (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008), se cuenta ya con la identificación de los COV liberados por hojas de *A. angustissima*, presentando terpenos (Figura 1) como α -pineno y mirceno (Pages-Paez, 2021), los cuales son compuestos reportados como atrayentes para integrantes de Melolonthidae (Nieves-Silva y Romero-López, 2019), aunque no se ha logrado confirmar el efecto que provocan en adultos de *M. mexicanus*.

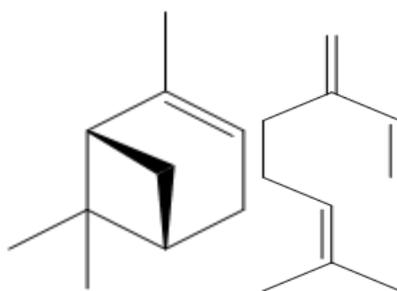


Figura 1. Estructuras químicas de los terpenos α -pineno y mirceno, compuestos identificados en hojas de *Acaciella angustissima*.

2.4. Comportamiento mediado por COV en las interacciones Melolonthidae-planta

Los COV de las plantas hospederas evocan respuestas adaptativamente favorables para sus huéspedes (López *et al.*, 1999) provocando su atracción y posteriormente el desarrollo de actividades vitales como la alimentación y reproducción. Se han llevado a cabo bioensayos para evaluar la preferencia de los insectos (Ávila-Cervantes *et al.*, 2019) y observar los comportamientos generados por los COV. Se ha recabado información en cuanto a bioensayos en laboratorio y campo para evaluar la atracción de estos. Ejemplo de ello es para *Holotrichia parallela* (Qu *et al.*, 2021), *Melolontha hippocastani* F. (Švestka, 2007), *Phyllophaga obsoleta* y *P. ravidata* (Romero-López, 2016), *M. nigripes* (Nieves-Silva y Romero-López, 2019; Nieves-Silva *et al.*, 2021) y *M. mexicanus*, en los cuales, a estos dos últimos se ha descrito el comportamiento con relación a sus plantas hospederas; *B. salicifolia* (Nieve-Silva-Romero-López, 2019), *E. polystachya* (Morales-Blancas y Romero-López, 2020), *Quercus* sp. (Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020) y *A. angustissima* (Pages-Paez y Romero-López, 2023), obteniendo resultados similares en cuanto a los patrones de comportamiento en función a los COV, siendo este un comportamiento estereotipado (Nehaniv *et al.*, 1999).

2.5. Recepción de COV en adultos de Melolonthidae: quimiorreceptores y OBP

El sistema olfativo en los insectos es de suma importancia; por ello está muy desarrollado para la detención de compuestos químicos en el ambiente, detectando y percibiendo toda la variedad de compuestos existentes en el ambiente y desencadenando en el insecto respuestas de atracción, repulsión, localización del sitio de oviposición y ubicación de plantas hospederas, entre otras (Wei *et al.*, 2019). En las antenas de estos artrópodos existen diferentes tipos de órganos sensoriales llamados sensilas o quimiorreceptores, los cuales son elementos estructurales y funcionales, importantes para la captación de información química presente en el ambiente que se transmite al sistema

nervioso central (Romero-López *et al.*, 2004) por medio de neuronas sensoriales olfativas antenales (Hansson *et al.*, 1999). Este sistema se compone de cuatro grupos principales de proteínas: de unión a olores (OBP), receptores de olores (OR), esterasas degradantes de olores (ODE) y quimiosensoriales (CSP); los COV presentes en el ambiente son captados por dichas proteínas, las cuales se unen a ellos para ser transportados por la hemolinfa a los OR ubicados en la membrana dendrítica de las neuronas sensoriales olfativas antenales, donde se produce la transducción de señales (Cilia *et al.*, 2021).

En relación con los Melolonthidae, se han llevado a cabo estudios en antenas de adultos de *P. obsoleta*, *Phyllophaga ravidata* Blanchard., *Phyllophaga opaca* Moser y *Phyllopertha diversa* Waterhouse, observando los tipos de quimiorreceptores y definiendo seis para *Phyllophaga* con base en su aspecto morfológico externo: placoideos, auriclílicos, basicónicos, celocónicos, quéticos y tricoideos (Romero-López, 2016) al igual para *M. mexicanus* y *M. nigripes*, se observó una distribución particular de los quimiorreceptores tipo celocónicos, encontrándose únicamente en las lamelas distales y medias (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015), para *Phyllopertha* se observó que la mayor parte de la superficie lamelar está cubierta por quimiorreceptores tipo placoideos de aspecto liso y un tipo en forma de pasa, y también de tipo celocónico (Hansson *et al.*, 1999). En *Hylamorpha elegans* Burmeister se observaron cuatro tipos de quimiorreceptores; tricoideos, quéticos, celocónicos y placoideos (Mutis *et al.*, 2014). En especies como *Popillia japonica* Newmann, *Anomala cuprea* Hope y *Anomala osakana* Sawada, los quimiorreceptores placoideos son los principales involucrados en la recepción de feromonas (Kim y Leal, 2000), al igual que en especies como *M. mexicanus* y *M. nigripes* (Romero-López *et al.*, 2017). Para *Phyllophaga macrocera* Bates se observó la presencia de cuatro tipos de quimiorreceptores: placoideos, auriclílicos, basicónicos y celocónicos, localizándose en la superficie interna y externa de las lamelas, a excepción de los celocónicos que son exclusivas de la parte interna (Benítez-Herrera y Romero-López, 2014).

Dentro de los quimiorreceptores, se encuentran proteínas involucradas en la percepción de olores denominadas proteínas de unión a olores (OBP, por sus siglas en inglés) (Pelosi y Maida, 1995). Las OBP “clásicas” son proteínas solubles presentes en la linfa sensilar, compuestas de 120-150 aminoácidos (aa), caracterizadas por conservar seis residuos de cisteína unidos por tres puentes de disulfuro y seis hélices alfa formando una cavidad por la cual se da la unión con el ligando y que probablemente sea la región clave

para la unión con las moléculas del exterior (Figura 2) (González-González *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2021; Cilia *et al.*, 2021). Las OBP se encuentran prácticamente en todos los insectos, se han llevado a cabo estudios de OBP en órdenes como: Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera y Coleoptera (Cilia *et al.*, 2021). La primera OBP fue caracterizada en adultos de *Antheraea polyphemus* Cramer y desde entonces se han identificado en una variedad de insectos como *Drosophila melanogaster* Meigen, *Anopheles gambiae* Giles, *Blattella germanica* L., *Apis mellifera* L., *Solenopsis invicta* Buren, y *Bombix mori* L. (Sun *et al.*, 2018).

Dentro de las OBP existen diferentes clasificaciones de acuerdo con el número de cisteínas, con cuatro cisteínas las llamadas “Minus-C” y con ocho cisteínas las “Plus-C”, así como las proteínas de unión a feromonas (PBP, por sus siglas en inglés) (Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014).

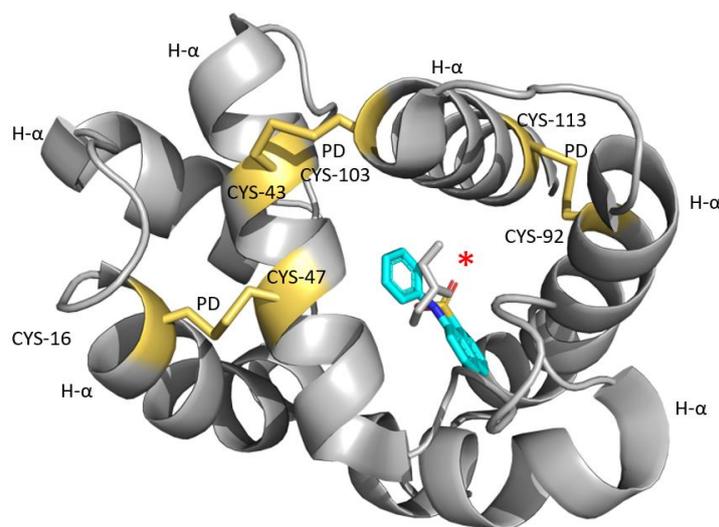


Figura 2. Representación de la estructura de una OBP “clásica”, observando sus seis hélices α (H- α), tres puentes de disulfuro (PD), los seis residuos de cisteína (CYS) y su respectiva posición. El * en color rojo indican la cavidad de acoplamiento con las moléculas, mientras que de color azul y gris se observan los compuestos α -pineno y β -ionona acoplados a la OBP.

2.6. Modelos biológicos bajo estudio

2.6.1. *Macrodactylus mexicanus*

Los adultos de esta especie presentan cabeza negra, artejos pardo-rojizos, piezas bucales negras, pronoto negro con vestidura setífera amarilla o grisácea recumbente, élitros con el integumento del disco rojizo ceniciento, meso y metatibias rojizas con los

ápices oscuros, es notoria la diferencia de abdomen entre machos y hembras, siendo más convexo y amplio que el de los machos (Arce-Pérez y Morón, 2000) (Figura 3).



Figura 3. Adulto de *Macroductylus mexicanus*; mostrando las meso y metatibias rojizas.

2.6.2. *Acaciella angustissima*

Es la especie más representativa del género *Acaciella*, tiene una distribución neotropical, se reporta como vegetación secundaria siendo frecuente en condiciones de perturbación (Rico-Alvarado y Gómez-Acevedo, 2022). Posee características de rápido crecimiento, capacidad de fijación de nitrógeno y alta acumulación de taninos en su corteza (Rincón-Rosales y Gutiérrez-Miceli, 2008). Presenta inflorescencias en fascículos conformados por cabezuelas, integradas por 10-12 flores pediceladas con simetría actinomorfa. Las flores en su mayoría son hermafroditas, constan de cáliz y corola con 5 piezas florales que incluyen 280-360 estambres con filamentos libres entre sí, pero unidos a la base (Alvarado y Gómez-Acevedo, 2022). Los árboles de *A. angustissima* carecen de espinas, nectarios y glándulas estaminales y llegan a medir hasta 12 m (Figura 4) (Rico-Arce y Bachman, 2006). De acuerdo con su fitoquímica, Pages-Paez (2021) reportó la presencia de insaturaciones y la identificación de compuestos como el β -mirceno y α -pineno descritos anteriormente como COV que juegan un papel importante dentro de las interacciones con los insectos, sirviendo como atrayentes.



Figura 4. Árbol de *Acaciella angustissima*.

2.7. Extracción-identificación de COV que median interacciones con adultos de *M. mexicanus*

Para la extracción de COV existen distintos métodos entre los que destacan: enfleurage, compresión, maceración y la hidrodestilación mediante arrastre por vapor o el Clevenger, de acuerdo con Oviedo y Orochena (2011); estos dos últimos son empleados a escala de laboratorio, siendo el método Clevenger el considerado en varios estándares internacionales como el más adecuado para la determinación del contenido total de aceite esencial de una planta aromática. Un equipo de Clevenger (Figura 5) se caracteriza por ser un sistema cerrado en donde el solvente o material extraído (en dependencia si el aceite esencial es más o menos denso que el agua) son “devueltos o retornados” al balón de destilación en un proceso que se repite hasta que se haya considerado la total extracción del aceite esencial. Esta “devolución o retorno” es lo que se conoce como cohobación (Fernández-Sánchez *et al.*, 2013). Para la identificación de los COV previamente extraídos se utiliza la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la cual permite la separación e identificación de mezclas complejas que son inyectadas en el cromatógrafo de gases, se separan en la columna cromatográfica y se obtiene la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Gutiérrez y Droguet, 2002); finalmente se acarrearán por un gas inerte, ya sea hidrógeno,

helio, nitrógeno, argón o dióxido de carbono (Ikan, 2008). Previamente, Nieves-Silva y Romero-López (2019) extrajeron los COV de hojas de *B. salicifolia* mediante microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y los identificaron mediante CG-EM, donde las sustancias químicas más abundantes fueron α -pineno, trimetilindano y ciclohexilbenceno, compuestos anteriormente reportados en otras plantas que fungen como hospederas de integrantes de Melolonthidae.

Pages-Paez (2021), ya empleó el sistema de hidrodestilación Clevenger para extraer COV foliares de *A. angustissima*, los cuales se analizaron por CG-EM. En este caso se sugirió que α -pineno y β -mirceno podrían estar involucrados en la interacción con adultos de *M. mexicanus*. Otros estudios relacionados con extracción e identificación de COV en interacción adulto *Macroductylus*-planta hospedera pertenecen a Nieves-Silva *et al.* (2021), quienes extrajeron e identificaron COV de *Prunus persica* L. Batsch por medio de headspace y CG-EM, destacando R-(+)-limoneno y (Z) 3-hexenil acetato para mediar la interacción con adultos de *M. nigripes*.

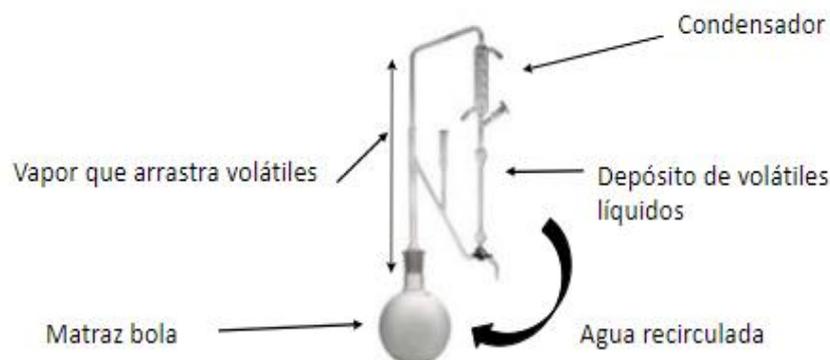


Figura 5. Sistema Clevenger modificado para extracción de Volátiles. Tomado de Pages-Paez (2021).

2.8. Confirmación de actividad biológica para el estudio de interacciones y comunicación química de Melolonthidae y *Macroductylus mexicanus*

2.8.1. Estudios *in silico*

El acoplamiento o “Docking” molecular es una herramienta bioinformática que permite estudiar la interacción entre un ligando y una proteína, además de predecir y modelar las estructuras y el comportamiento de las moléculas, por ejemplo, el complejo ligando-proteína en el cual, generalmente, la mejor pose es la reportada con menor energía en la unión (Font-Maté, 2017; Velásquez *et al.*, 2013). Estos estudios *in silico* permiten la búsqueda de moléculas candidatas mediante la selección de moléculas a partir de bases de datos (Velásquez *et al.*, 2013), denominándose “Ecología química inversa” (González-González *et al.*, 2016). Para trabajos relacionados con Docking molecular en integrantes de Melolonthidae se cuenta con evidencia para *H. elegans* con su planta hospedera *Nothofagus obliqua* (Mirbel) Oerst., donde González-González *et al.* (2016), evidenciaron OBP que presentan una gran afinidad a COV de su hospedera *N. obliqua*, exhibiendo altos valores de energía en términos de acoplamiento; esto demuestra que los residuos hidrofóbicos de las OBP interactúan más con los ligandos y que las interacciones de Van der Waals e hidrofóbicas son las más importantes. Para *Holotrichia oblita* Faldermann se sabe que las OBP en adultos hembras son esenciales para la percepción de COV emitidos por sus hospedadoras *Ulmus pumila* (L.) y *Ricinus communis* (L.), teniendo presente dos genes altamente expresados, los cuales provocan una fuerte atracción hacia ellas (Wei *et al.*, 2021). Por otra parte, para la misma especie se demostró tras ensayos con docking molecular, destacando que cuatro ligandos (Benzoato de hexilo, β -ionona, mirceno y cinamaldehído) de sus plantas hospederas tenían mejor acoplamiento en OBP, siendo el benzoato de hexilo el más afín (Zhuang *et al.*, 2014).

2.8.2. Bioensayos en laboratorio con olfatómetro

Los estudios en condiciones de laboratorio brindan la posibilidad de someter a organismos a estímulos bajo condiciones controladas y así conocer su comportamiento; la mayor parte de estos se centran en insectos de interés agronómico o de salud, como son los ácaros, los mosquitos o escarabajos (Ávila-Cervantes *et al.*, 2019). Para estudios de Ecología química, tradicionalmente se utilizan los olfatómetros, equipos que evalúan la preferencia de los organismos ante uno o varios estímulos y ver el efecto que provocan, tanto en su forma “activa” (mediante un flujo de viento para transportar de manera constante el estímulo químico) y en forma “pasiva” (sin intervención de flujo de aire al estímulo) (Romero-López, 2016; Nieves-Silva y Romero-López, 2016). Para integrantes de Melolonthidae se han efectuado estudios con adultos de *M. nigripes*, utilizando un olfatómetro de cuatro vías para evaluar las taxias positivas de estos insectos hacia

extractos vegetales de diversas fuentes vegetales (Nieves-Silva y Romero-López, 2016). Por otra parte, Morales-Blancas y Romero-López, (2020) para estudios de *M. mexicanus* y Nieves-Silva *et al.* (2021), para *M. nigripes*, emplearon un olfatómetro de vidrio de dos vías en forma de “Y” (Figura 6) conectado a un flujo de viento constante para evaluar la atracción hacia diferentes COV. García-Canales y Romero-López (2017) efectuaron pruebas con machos de *M. mexicanus* en olfatómetro, registrándose atracción hacia la cámara genital y glándulas accesorias de hembras de esta especie. Del mismo modo Pérez-Estrada (2020) empleó un olfatómetro para evaluar respuestas hacia COV bacterianos extraídos de las glándulas accesorias del aparato reproductor de hembras de esta especie.

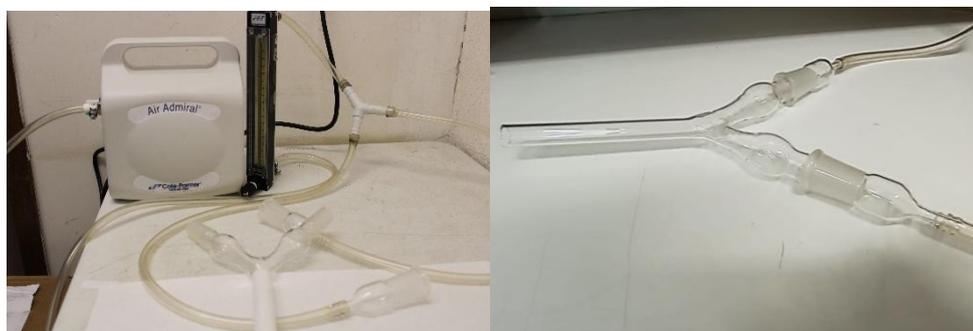


Figura 6. Olfatómetro de vidrio de dos vías en forma de “Y” empleado para bioensayos en laboratorio.

3. Justificación

Bajo el contexto químico-ecológico, las interacciones entre los insectos y las plantas son mediadas por los COV; la elección de una planta como hospedera por parte de los insectos está relacionada con la calidad del recurso alimentario, la fecundidad y la frecuencia de oviposición (López *et al.*, 1999) a través de una secuencia comportamental en la cual el insecto distingue entre su planta hospedera y la que no lo es, mediante la búsqueda, localización y aceptación del sitio (Romero-López, 2016). Estas interacciones también muestran ventajas reproductivas para la planta, como es el caso de los visitantes florales (Reyes-Prado *et al.*, 2019). Bajo este tenor, se han llevado a cabo estudios para los Coleoptera Melolonthidae pertenecientes a *Phyllophaga*, *Cyclocephala*, *Paranomala* y *Macroductylus* (Romero-López, 2016) y recientemente se cuenta con información

detallada sobre la interacción entre adultos de *M. mexicanus*, en donde se ha descrito que la actividad de estos insectos promueve el crecimiento de algunas partes aéreas de sus plantas hospederas (Romero-López, 2016; Moctezuma-Vega y Romero-López, 2020).

Para esta especie de *Macroductylus* se ha comenzado a implementar el estudio de comunicación química en diferentes niveles de análisis, incluyendo la integración de la parte molecular, modelando la actividad biológica que detonan algunos COV de las hojas de *A. angustissima* en hembras y machos al acoplarse con proteínas de unión a olores de las antenas de otras especies de insectos (Pages-Paez, 2021). Caso similar lo descrito para *Melolontha hippocastani* F., donde integran diferentes análisis para la comprensión de la búsqueda y localización de pareja mediante COV y feromonas (Ruther *et al.*, 2000). De esta manera se pretende dilucidar el rol de los COV liberados por hojas y flores de esta especie vegetal.

Se ha observado que en la interacción de *M. mexicanus* con *A. angustissima*, los COV son fundamentales, ya que son los responsables de generar respuestas comportamentales en los adultos de *M. mexicanus*. Por ello, el complementar la información de esta interacción con diferentes líneas de evidencia de actividad biológica, desde la molecular hasta la comportamental, permitirá una mayor comprensión de la interacción entre ambas especies y en particular, del esquema de comunicación química de esta especie de Melolonthidae.

4. Hipótesis

Los COV que liberan las hojas y flores de *A. angustissima* del Parque Estatal “Cerro Zapotecas” provocan la atracción en adultos de *M. mexicanus* para que se inicie la interacción con éstas.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los COV liberados por hojas y flores de *A. angustissima* en la interacción con adultos de *M. mexicanus* a través de un modelado *in silico*, así como en bioensayos de laboratorio.

5.2. Objetivos particulares

- Identificar los compuestos químicos liberados por hojas y flores de *A. angustissima*.
- Modelar *in silico* la interacción entre los COV identificados previamente y las OBP homólogas seleccionadas para los adultos de *M. mexicanus*.
- Registrar las respuestas de los insectos bajo estudio al ser expuestos a macerados de hoja+flor de la acacia bajo estudio.

6. Metodología

6.1. Obtención de insectos, hojas y flores

Los insectos y el material vegetal se recolectaron en el Parque Estatal “Cerro Zapotecas” (Figura 7), ubicado en el municipio de San Pedro Cholula a un 1.5 km de la ciudad de Puebla y colindando con los municipios San Cristóbal Tepontla, San Juan Tlautla, San Gregorio Zacapechpan, San Francisco Coapa, San Sebastián Tepalcatepec, San Diego Cuachayotla y San Agustín Calvario (Tlapa-Almonte, 2005). Se trata de un sitio en el que predomina un clima templado subhúmedo con lluvias en verano y con una temperatura media anual que fluctúa entre 18° y 20° C, con vegetación diversa de cultivos de temporada, árboles frutales, bosque de pino-encino y matorral xerófilo (Flores-Hernández, 2011). Esta actividad tuvo lugar entre mayo y agosto de 2022, lapso en el que los adultos de *M. mexicanus* llevan a cabo sus actividades alimentarias y sexuales.



Figura 7. Zona de estudio Parque Estatal “Cerro Zapotecas” ubicado en San Pedro Cholula, en temporada de verano de 2022.

6.2. Extracción e identificación de COV de hojas y flores de *A. angustissima*

Se empleó el sistema Clevenger modificado según lo sugerido por Oviedo y Orochena (2011). Se tomó de referencia la metodología empleada por Pages-Paez (2021), utilizando 100 g de material vegetal (hojas y flores) con 300 ml de agua destilada, llevando la muestra a punto de ebullición durante 4 h. Para la identificación de COV extraídos previamente, se consideró una columna DB5-MS (30 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de la película), a una temperatura de 300 °C del inyector y 70 °C de temperatura inicial, con un incremento de 31 °C/min hasta alcanzar los 280 °C. Se empleó hidrógeno como gas acarreador (1.5 mL/min) y el inyector se mantuvo en modo splitless. El espectrómetro de masas Agilent 5975C se empleó en modo SCAN (50 a 400 UMA), tomando como base la biblioteca del Wiley-Nist Ed 11-2017, en particular los compuestos químicos con una similitud de espectros mayor al 95%.

6.3. Bioensayos de confirmación de actividad biológica

6.3.1. *In silico*

Se utilizó el programa *Schodinger* para el modelado por homología de OBP de especies filogenéticamente cercanas a *M. mexicanus*. Posterior a ello, se empleó el programa AutoDock Vina con cien repeticiones por análisis de acoplamiento para obtener los valores de energía de acoplamiento en Kcal/mol para la minimización energética, la conformación más estable y la generación de diagramas 2D de las interacciones de los

residuos aminoácidos entre ligandos y proteínas (Cuadro 1). En los análisis se emplearon los compuestos identificados del perfil químico de hojas y flores de *A. Angustissima*, además de utilizar como control positivo a la α -pulegona por su alta energía de acoplamiento y como control negativo al mirceno por su baja energía de acoplamiento (Figura 8).

Cuadro 1. Clasificación de los aminoácidos de acuerdo con su cadena lateral y abreviación.

Naturaleza de los residuos de aminoácidos	
Apolares alifáticos	Glicina-GLY, Alanina-ALA, Prolina-PRO, Valina-VAL, Leucina-LEU, Isoleucina-ILE y Metionina-MET
Aromáticos	Fenilalanina-PHE, Tirosina-TYR y Triptófano-TRP
Polares sin carga	Serina-SER, Treonina-THR, Cisteína-CYS, Asparagina-ASN y Glutamina-GLN
Carga positiva	Lisina-LYS, Histidina-HIS y Arginina-ARG
Carga negativa	Ácido aspártico-ASP y Ácido glutámico-GLU

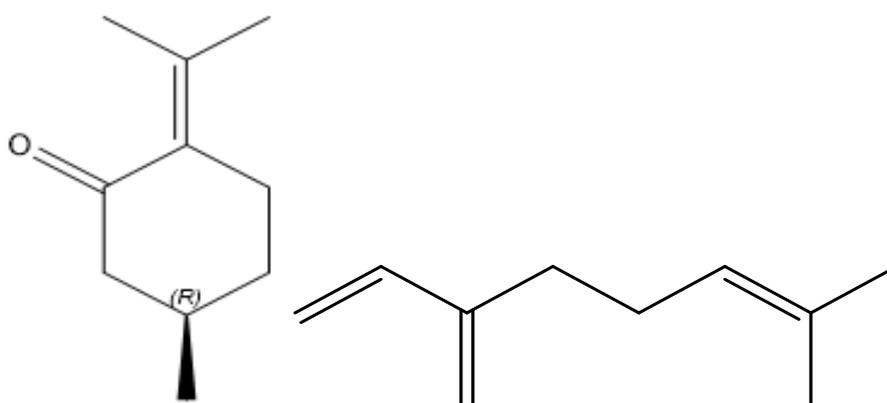


Figura 8. Estructura química del α -pulegona (control positivo) y mirceno (control negativo) empleadas para los acoplamientos moleculares en OBP de Melolonthidae y COV de *A. angustissima*.

Se seleccionaron ocho secuencias de OBP de *Holotrichia oblita* Faldermann, *Holotrichia parallela* Motschulsky e *Hylamorpha elegans* Burmeister, especies

pertenecientes a Melolonthidae como “melolóntido de referencia” y con el programa MEGA11 se compararon mediante un alineamiento múltiple MUSCLE (Kumar *et al.*, 2018) (por sus siglas en inglés) (Cuadro 2). Las secuencias se obtuvieron de las bases de datos NCBI y PDB (ambos, por sus siglas en inglés).

Cuadro 2. OBP seleccionadas de las especies Melolonthidae empleadas para el alineamiento de secuencias de aminoácidos y creación de estructuras tridimensionales.

“Melolóntido de referencia”	OBP	ID Versión NCBI
<i>Holotrichia oblita</i>	OBP 24	AZL87166.1
<i>Holotrichia oblita</i>	OBP 8	AZZ86674.1
<i>Holotrichia parallela</i>	OBP 39	AVM18965.1
<i>Holotrichia parallela</i>	OBP 35	AVM18961.1
<i>Holotrichia parallela</i>	OBP 49	AKI84360.1
<i>Hylamorpha elegans</i>	OBP 6	AMR98356.1
<i>Hylamorpha elegans</i>	OBP 4	AMR98355.1
<i>Hylamorpha elegans</i>	OBP 1	AMR98353.1

Se compararon por pares las OBP bajo estudio, usando “plantillas” mediante el programa Jalview versión 2.11.2.0 (Cuadro 3); esto con el fin de contar con el porcentaje de identidad entre secuencias y así crear una estructura tridimensional de las proteínas además de generar un dendograma para representarse de manera gráfica las similitudes entre las secuencias de OBP, empleando el programa MEGA version 11, mediante el método Neighbor-Joining.

Cuadro 3. OBP seleccionadas de Melolonthidae y de organismos de referencia por pares para comparación de porcentaje de identidad.

Código PDB	Especie de referencia	Version ID	Especie de Melolonthidae
2L2C	<i>Culex quinquefasciatus</i> Say	AZL87166.1	<i>Holotrichia oblita</i>
6JPM	<i>Chrysopa pallens</i> Rambur	AZZ86674.1	<i>Holotrichia oblita</i>

4Z45	<i>Nasonovia ribisnigri</i>	AVM18965.1	<i>Holotrichia parallela</i>
6HHE	<i>Ceratitis capitata</i>	AVM18961.1	<i>Holotrichia parallela</i>
6QQ4	<i>Drosophila melanogaster</i>	AKI84360.1	<i>Holotrichia parallela</i>
3K1E	<i>Aedes aegypti</i>	AMR98356.1	<i>Hylamorpha elegans</i>
5DIC	<i>Phormia regina</i>	AMR98355.1	<i>Hylamorpha elegans</i>
6QQ4	<i>Drosophila melanogaster</i>	AMR98353.1	<i>Hylamorpha elegans</i>

6.3.2. Bioensayos en laboratorio

Se empleó un olfatómetro en “Y” de dos vías como el empleado por Sánchez-Cruz *et al.* (2020) y conformado por un tubo central de 14 cm y con dos brazos de 13 cm cada uno, con un diámetro interior de 1.5 cm. Cada uno de los brazos está conectado con una cámara de vidrio de 6.5 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro interior y a su vez, cada lado del olfatómetro está conectado a un flujo de viento constante de 500 mL/min, regulado por un flujómetro (Cole Parmer, USA) (1 L/min en el tubo central). En ambos brazos se colocaron fragmentos de papel filtro de 5 x 2 mm con los estímulos químicos. Se maceraron hojas y flores de *A. angustissima*; de la pasta resultante se consideraron 0.10 g para cada muestra, la cual se colocó en el papel filtro para emplearse como el estímulo químico. Para el control, se impregnó el papel filtro con agua destilada. Se consideró como “respuesta positiva” cuando cada adulto de *M. mexicanus* mostró movimientos orientados hacia alguno de los estímulos e hizo contacto con el papel filtro, permaneciendo ahí por lo menos 30 s. Los estímulos se colocaron de manera aleatoria y en un horario de 11:00 a 14:00 hrs, periodo en que se ha observado que estos insectos llevan a cabo su actividad sexual y alimentaria (Romero-López, 2016). Además, se diferenciaron los distintos tipos de respuestas de los adultos de *M. mexicanus*, considerando los movimientos, actos y posturas de hembras y machos en el interior del brazo principal del olfatómetro.

Para el análisis de los datos de frecuencia de respuestas positivas, se aplicó una Ji-cuadrada con el Software Rstudio versión 4.2.1.

Previo a los resultados, se integró la parte conductual descrita por Pages-Paez y Romero-López (2023), como pieza fundamental en este estudio para un mejor entendimiento de la

interacción. Mediante observaciones se identificaron los desplazamientos y patrones comportamentales de la interacción entre *M. mexicanus* y *A. angustissima*.

7. Resultados

7.1. Secuencia comportamental de la interacción *M. mexicanus*-*A. angustissima*

Como parte importante de la interacción entre *M. mexicanus* y *A. angustissima*, se integró información sobre el comportamiento de estos insectos en campo mediante una secuencia en la cual se describieron cinco tipos de desplazamiento y tres patrones de comportamiento; esto una vez que los adultos de *M. mexicanus* emergían del suelo e iniciaban la interacción con los árboles de *A. angustissima* (Pages-Paez y Romero-López, 2023) (Figura 9).

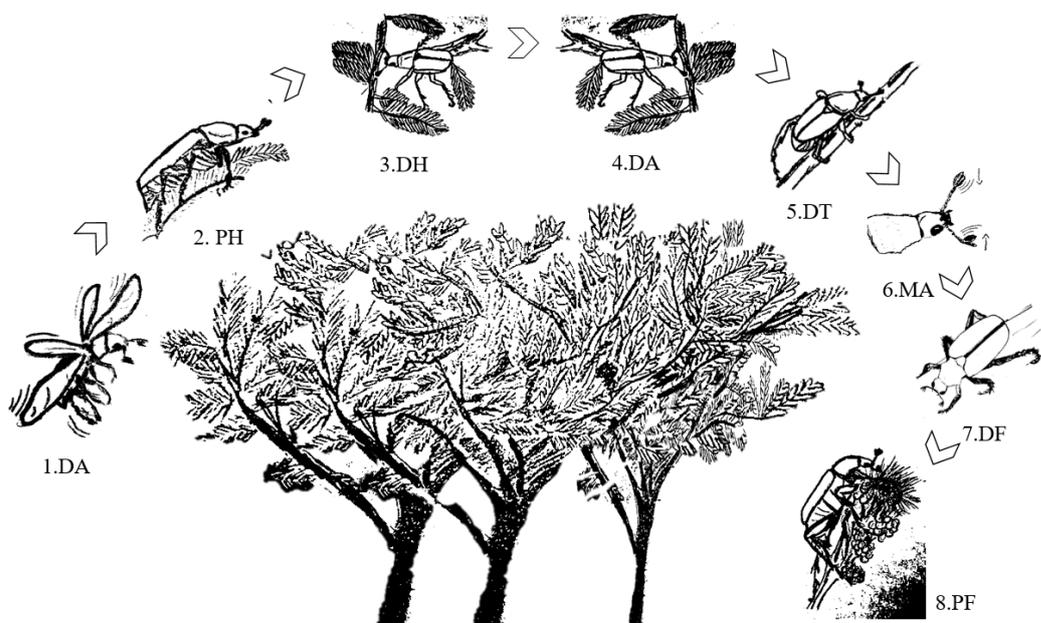


Figura 9. Representación gráfica de la secuencia de la interacción entre adultos de *M. mexicanus* y arbustos de *A. angustissima*. 1. DA=desplazamiento aéreo en dirección hacia arbustos, 2. PH=Posado en hoja, 3. DH=desplazamiento a través del envés de hoja, 4. DA=desplazamientos aleatorios a través de la hoja, 5. DT=desplazamiento a través de tallo, 6. MA=movimiento antenal; 7. DF=desplazamiento hacia flor, y 8. PF=posado en flor. Tomado de Pages-Paez y Romero-López, 2023.

7.2. Extracción y CG-EM de COV de hojas y flores *A. angustissima*

De los 0.036 g de muestra de hojas y flores de *A. angustissima*, se generó un cromatograma, en el cual se observa en el eje horizontal el tiempo de retención de los

compuestos en min y en el vertical, la abundancia (tamaño de pico) de cada compuesto. Se observan doce picos que corresponden a los compuestos identificados (Figura 10, Cuadro 4).

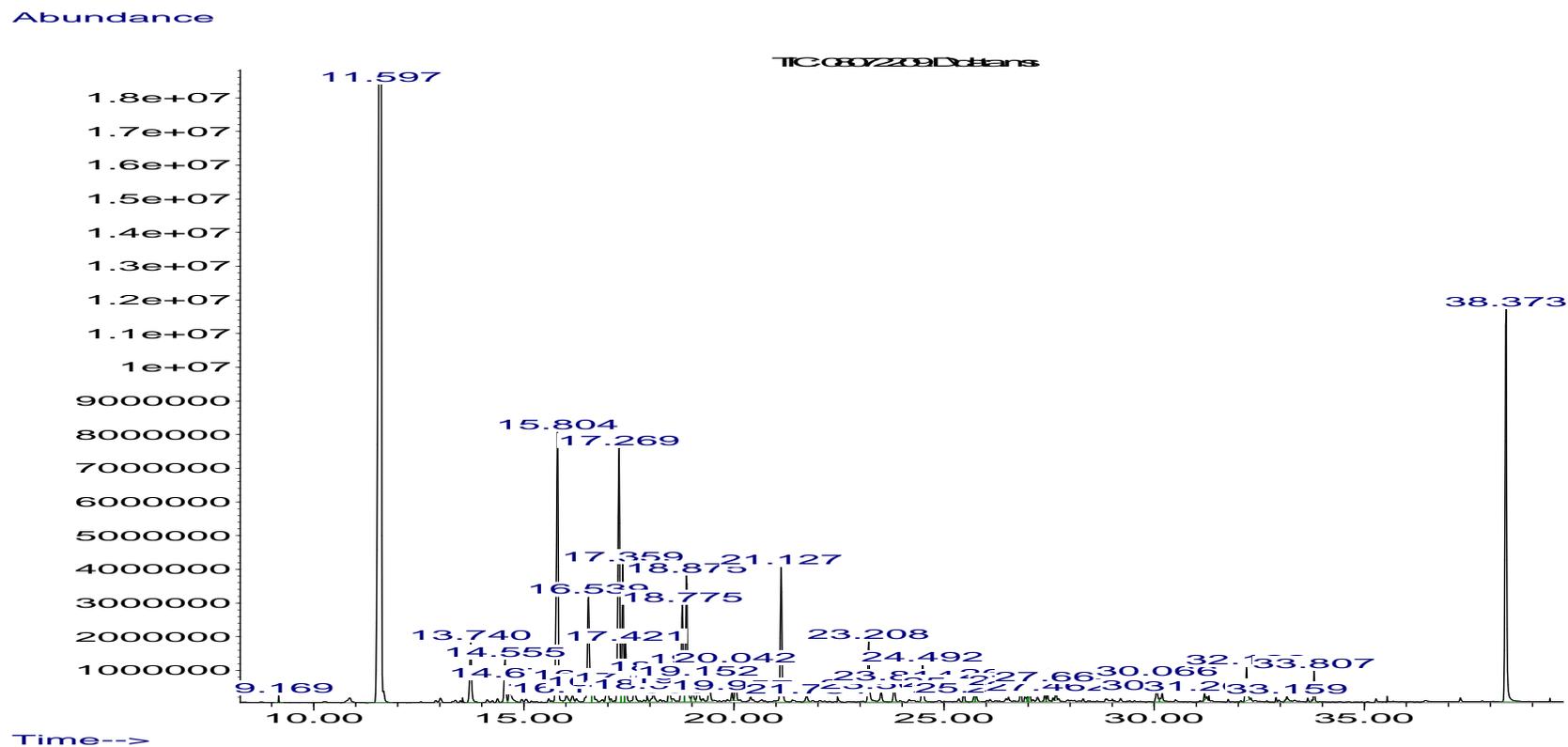
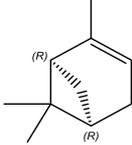
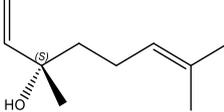
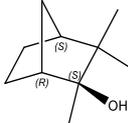
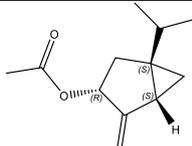
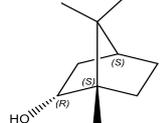
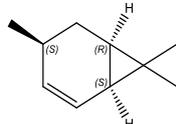
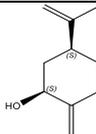
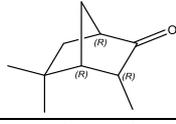
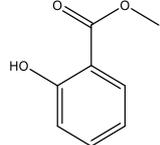
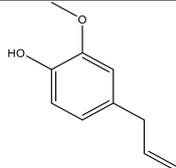
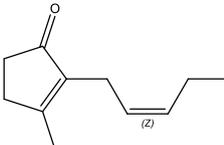
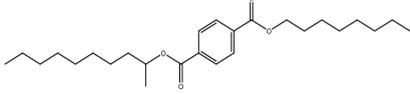
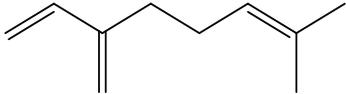
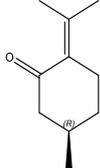


Figura 10. Cromatograma de compuestos químicos obtenidos de hojas y flores de *Acaciella angustissima* que se recolectaron en la temporada de verano del 2022, en el Cerro Zapotecas, Puebla. En el eje de las ordenadas se muestra la abundancia de cada compuesto, mientras que en el eje de las abscisas los picos cromatográficos y tiempos de retención en minutos para cada compuesto.

Cuadro 4. Nombre, abundancia y estructura de los compuestos que conforman el perfil químico de hojas y flores de *Acaciella angustissima* recolectada en la temporada de verano del 2022 en el Cerro Zapotecas, Puebla.

Nombre	Abundancia	Estructura
α -pineno "Pin"	41,96	
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimetil- "1,6-octa"	1,67	
Biciclo (2.2.1) heptano-2-ol, 1,3,3-trimetil- "Bici (2.2.1)"	1,14	
Biciclo (3.1.0) hexano-3-ol, 4-metileno-1-(1-metiletilo)-, acetato "Bici (3.1.0)"	7,43	
Borneol "Bor"	3,21	
(+)-4-careno "(+)-4-car"	10,12	
ciclohexanol, 2-metileno-5-(1-metileténil)- "Ciclo,2"	6,39	
Biciclo [2.2.1]heptan-3-ona, 6,6-dimetil-2-metileno- "Bici [2.2.1]"	1,43	
Salicilato de metilo "Sal"	2,49	
Eugenol "Eug"	1,48	
2-cyclopenten-1-one, 3-methyl-2-(2-pentenil)-, (Z)- "2-ciclo"	1,00	

Ácido tereftálico, éster di(4-octilo) “ Á. ter ”	9,12	
Mirceno “ Mir ”	Control negativo	
α -pulegona “ Pul ”	Control positivo	

7.3. Bioensayos de confirmación de actividad biológica

7.3.1. *In silico*

En la Figura 11 se muestran los sitios conservados, resaltando los residuos de cisteína característicos de las OBP.

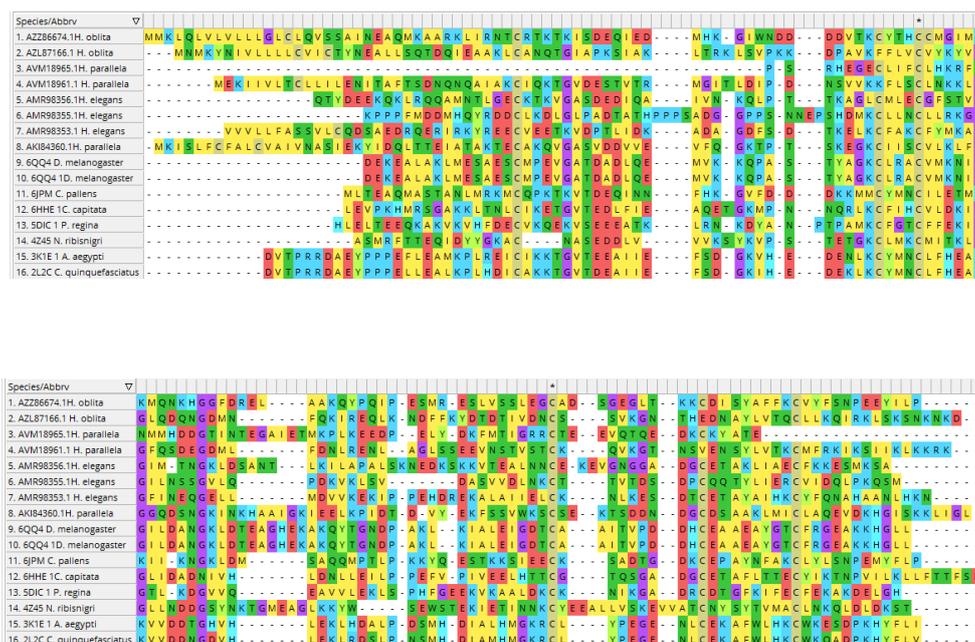


Figura 11. Alineamiento de secuencias de OBP de Melolonthidae y OBP homólogas de insectos señalando con “*” los residuos de cisteínas conservados y observando la tendencia de los seis residuos de las OBP.

En el Cuadro 5 se evidencia la similitud entre las plantillas y las OBP, detectándose el porcentaje de identidad más alto para 6JMP (*C. pallens*) con AZZ86674.1 (*H. oblita*) obteniendo un 41.46 % (Figura 12), seguido de 4Z45 (*N. ribisnigri*) con

AVM18965.1 (*H. parallela*) con 28.95 % (Figura 13) y 6QQ4 (*D. melanogaster*) con AKI84360.1 (*H. parallela*) con 25.41% (Figura 14). Con valores debajo del 25%, se observó a la 6HHE (*C. capitata*) con AVM18961.1 (*H. parallela*) alcanzando un 24.79%, seguido de 6QQ4 (*D. melanogaster*) con AMR98353.1 (*H. elegans*) con 20.66%, y 3K1E (*A. aegypti*) con AMR98356.1 (*H. elegans*) con 20.63%. Por último, con valores debajo del 20% se obtuvo 19.53% de identidad entre 2L2C (*C. quinquefasciatus*) con AZL87166.1 (*H. oblita*) y 19.17% entre 5DIC (*P. regina*) con AMR98355.1 (*H. elegans*).

```

Score = 2500.0
Length of alignment = 123
Sequence gi|1552771550|gb|AZZ866/21-143 (Sequence length = 143)
Sequence 6JPM_1|Chains/1-119 (Sequence length = 119)

gi|1552771550|gb|AZZ866/21-143 AINEAQMKAARKLIRNTCRTKTKISDEQIEDMHKGIWNDDD
      . |||| .. .|.|. |. |||..|||.. |||. |||
6JPM_1|Chains/1-119 MLTEAQMASTANLMRKMCPKTKVTDEQINNFKGVF-DDD

gi|1552771550|gb|AZZ866/21-143 DVTKYTHCCMGIMKMQNKHGGFDRELAAKQYQPQPESMRE
      || .| . ||. |.| .| . | | .| .|
6JPM_1|Chains/1-119 KKMCMYMCILETMKI-|KNGKLDMSAVEQQMPTLPKKYQE

gi|1552771550|gb|AZZ866/21-143 SLVSSLEGCADSGEGLTKKCDISYAFFKCVYFSNPEEYILP
      | .| | | .. | ||. .| | ||.|||| |.||
6JPM_1|Chains/1-119 STKKSIEECKSADTG--DKCEPAYNFAKCLYLSNPEMYFLP

Percentage ID = 41.46

```

Figura 12. Porcentaje de identidad de 41.46 % entre 6JMP (*C. pallens*) con AZZ86674.1 (*H. oblita*).

```

Score = 730.0
Length of alignment = 76
Sequence gi|1357864086|gb|AVM18965/1-72 (Sequence length = 72)
Sequence 4Z45_1|Chains/33-106 (Sequence length = 121)

gi|1357864086|gb|AVM18965/1-72 PSRHEGECLIFCLHKRFNMMHDDGTINTEGAIETMKPLKEE
      || . | ||. |. .. ...|||. | | .| |
4Z45_1|Chains/33-106 PSTETGKCLMKCMITKLGLLNDDGSYNKTGMEAGLKKYWSE

gi|1357864086|gb|AVM18965/1-72 DPELYDKFMTIGRRCTEE---VQTQEDK-CKYATE
      .|. || .| || | . |.|.
4Z45_1|Chains/33-106 -WST-EKIETINNKCYYEALLVSKEVVATCNYSYT

Percentage ID = 28.95

```

Figura 13. Porcentaje de identidad de 28.95% entre 4Z45 (*N. ribisnigri*) con AVM18965.1 (*H. parallela*).

```

Score = 1200.0
Length of alignment = 122
Sequence gi|823958415|gb|AKI8436/22-143 (Sequence length = 149)
Sequence          6QQ4_1|Chains/1-121 (Sequence length = 121)

gi|823958415|gb|AKI8436/22-143 YIDQLITEIATAKTECAKQVGASVDDVVEVFQGKTPTSKEG
      . . . . | .||. |. |. . . . |
6QQ4_1|Chains/1-121 DEKEALAKLMESAESCMPEVGATDADLQEMVKKQPASTYAG

gi|823958415|gb|AKI8436/22-143 KCIISCVLKLFGGQDSNGKINKHAAIGKIEELKPIDTDVYE
      ||. .||.| .| |.||||. .|. | . |
6QQ4_1|Chains/1-121 KCLRACVMKNIGILDANGKLDTEAGHEKAKQYTGNDPAKLG

gi|823958415|gb|AKI8436/22-143 KFSSVWKSCSEKTSDDNDGCDSAANKLMICLAQEVDDKHGIS
      . .|. | | | |..| |. | |||.
6QQ4_1|Chains/1-121 IALEIGDTCAAITVPD-DHCEAAEAYGTCFRGEAKKHGLL

Percentage ID = 25.41

```

Figura 14. Porcentaje de identidad de 25.41 % entre 6QQ4 (*D. melanogaster*) con AKI84360.1 (*H. parallela*).

Cuadro 5. Porcentaje de identidad por pares de OBP con plantillas.

OBP ID plantilla	OBP ID Melolonthidae	% identidad
2L2C	AZL87166.1	19.53%
6JPM	AZZ86674.1	41.46 %
4Z45	AVM18965.1	28.95 %
6HHE	AVM18961.1	24.79 %
6QQ4	AKI84360.1	25.41%
3K1E	AMR98356.1	20.63 %
5DIC	AMR98355.1	19.17 %
6QQ4	AMR98353.1	20.66 %

Con base en el alineamiento, se preparó un dendograma basado en la similitud de secuencias de aminoácidos de las OBP con el programa MEGA version 11, mediante el método Neighbor-Joining (Figura 15).

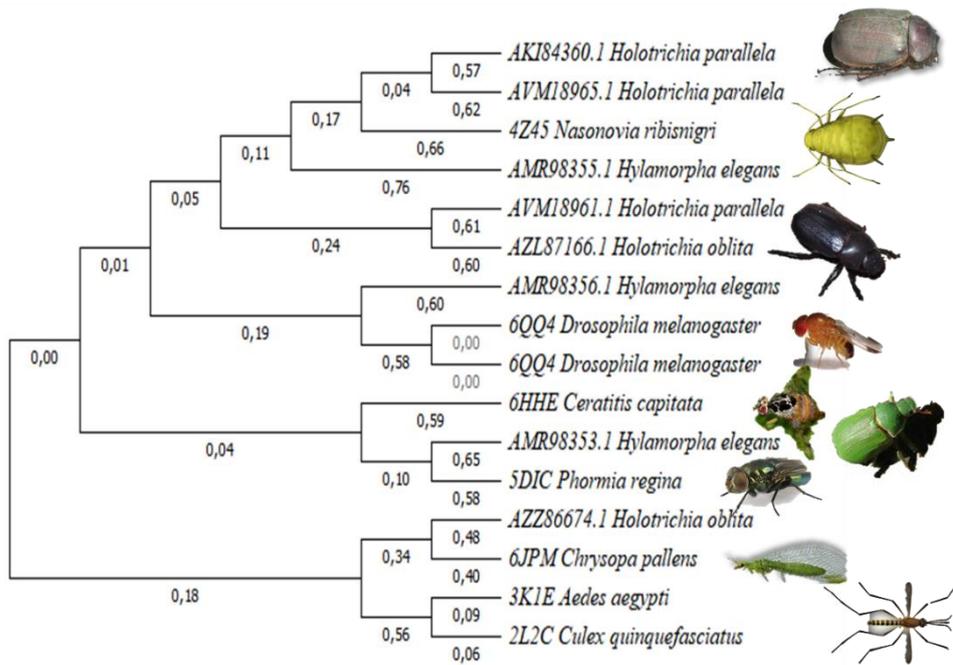


Figura 15. Dendrograma basado en las secuencias de aminoácidos de las OBP de Melolonthidae y de OBP homólogas. Representación de insectos tomada de Google imágenes.

Por último, se modelaron por homología las OBP de los Melolonthidae, con el fin de obtener sus estructuras tridimensionales con base en el porcentaje de identidad de las OBP empleadas como “plantillas” obteniendo los modelados para *H. oblita* (Figura 16), *H. parallela* (Figura 17) e *H. elegans* (Figura 18).

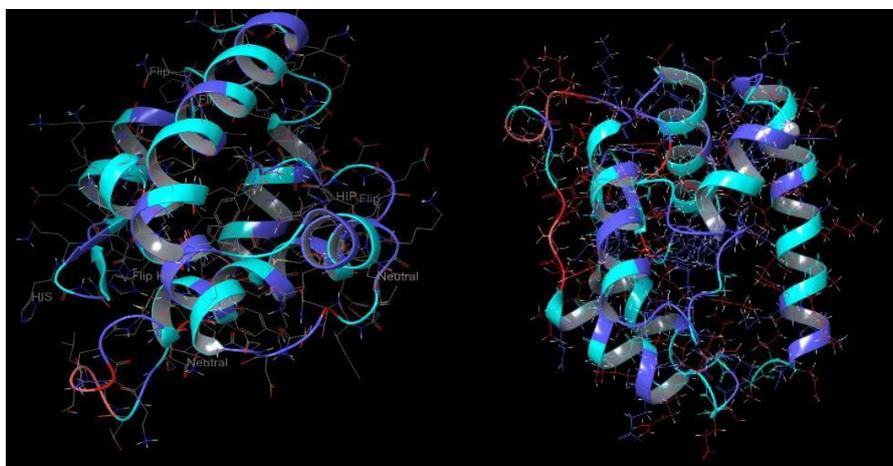


Figura 16. Modelado de OBP AZL87166.1 *Holotrichia oblita* con la plantilla 2L2C *Culex quinquefasciatus* y de AZZ86674.1 *Holotrichia oblita* con 6JMP *Chrysopa pallens*.

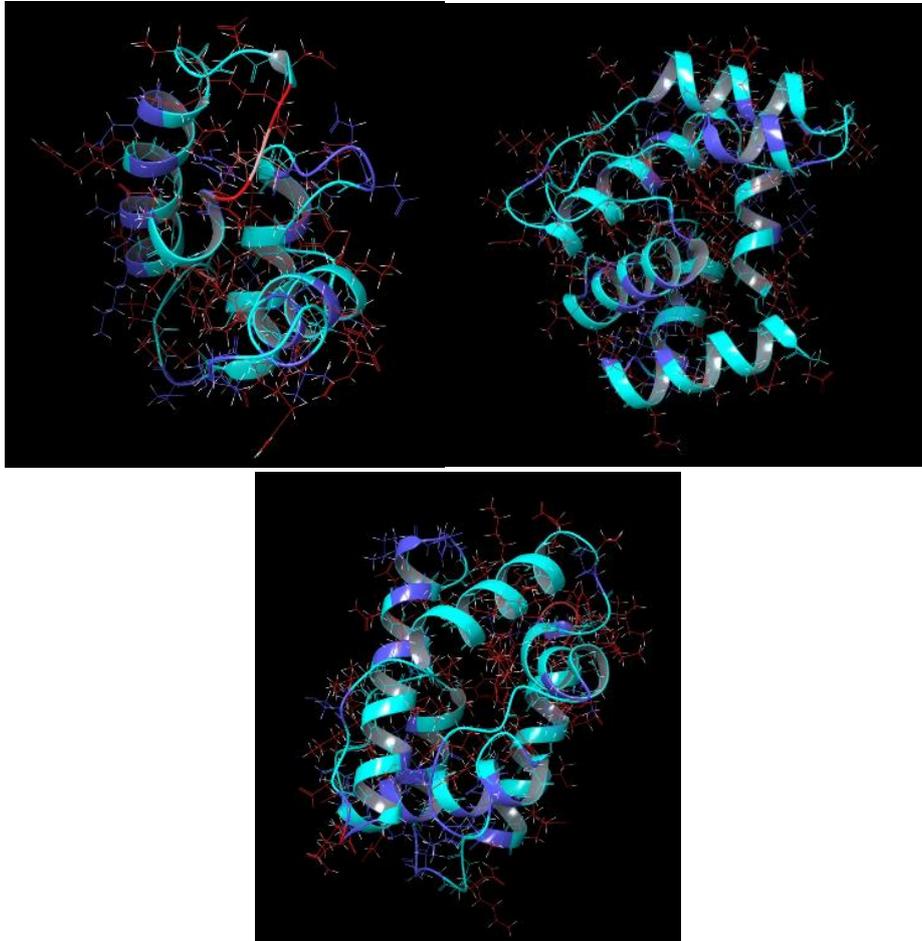


Figura 17. Modelado de OBP AVM18965.1 *Holotrichia parallela* con la plantilla 4Z45 *Nasonovia ribisnigri*, AVM18961.1 *Holotrichia parallela* con 6HHE *Ceratitis capitata* y AKI84360.1 *Holotrichia parallela* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster*.

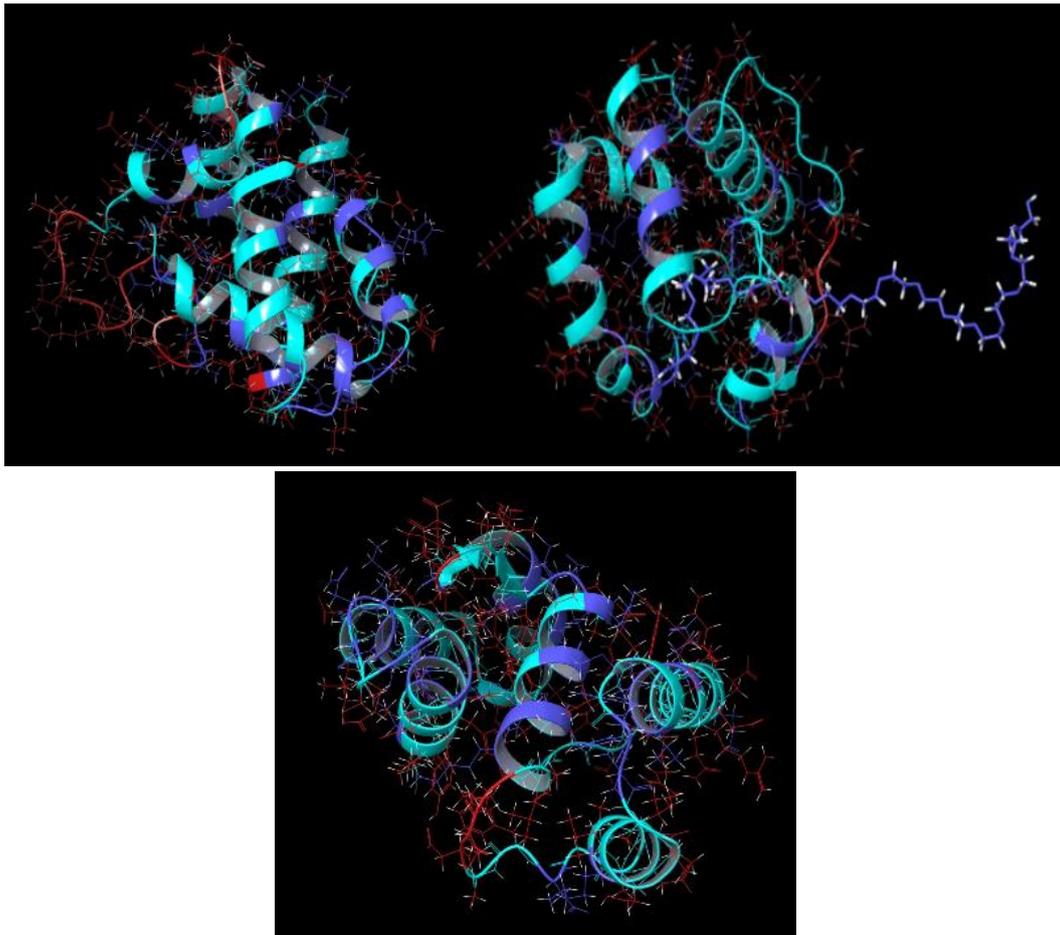


Figura 18. Modelado de OBP AMR98356.1 *Hylamorpha elegans* con la plantilla 3K1E *Aedes aegypti*, AMR98355.1, *Hylamorpha elegans* con 5DIC *Phormia regina* y AMR98353.1 *Hylamorpha elegans* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster*.

7.3.2. Docking molecular

Se prepararon las OBP modeladas de *H. oblita* (Figuras 19 y 20), *H. parallela* (Figuras de la 21 a la 23) y *H. elegans* (Figuras 24-26), estabilizándolas con los ligandos identificados para la interacción. Posterior a ello, se procedió con el docking en 100 repeticiones, tomando el valor más negativo para cada acoplamiento y representando la minimización energética para cada interacción (Cuadro 6) (color rojo para el valor más negativo) entre los ligandos y las 8 proteínas (COV-OBP), empleando a la α -pulegona (control positivo color naranja) y el mirceno (control negativo color azul) como ligandos control.

Cuadro 6. Valores energéticos (Kcal/mol) obtenidos del docking molecular por ligando-proteína.

	<i>H. parallela</i>	<i>H. parallela</i>	<i>H. elegans</i>	<i>H. parallela</i>	<i>H. oblita</i>	<i>H. oblita</i>	<i>H. oblita</i>	<i>H. elegans</i>
Compuesto	AKI84360.1	AMR98353.1	AMR98355.1	AVM18961.1	AVM18965.1	AZL87166.1	AZZ86674.1	AMR98356.1
“Pin”		-4,637		-3,754	-4	-3,917	-6,147	-6,521
“1,6-octa”	-3,894	-3,358	-2,42	-1,583	-1,708	-2,068	-3,911	-3,955
“Bici (2.2.1)”		-5,167		-4,943	-4,006	-3,802	-6,463	-6,596
“Bici (3.1.0)”	-5,005	-5,044	-2,323	-2,973	-3,310	-3,206	-6,076	-6,67
“Bor”	-5,31	-4,211		-4,241	-3,676	-3,642	-4,867	
“(+)4-car”		-5,997		-4,263	-4,140	-3,841	-6,292	-6,339
“Ciclo,2”	-5,58	-5,908	-3,637	-3,663	-4,448	-4,157	-6,149	-6,147
“Bici [2.2.1]”	-5,162	-5,380	-3,779	-4,434	-4,540	-4,089	-6,402	-6,786
“Sal”	-5,384	-5,082	-3,814	-4,071	-3,855	-4,064	-6,112	-5,132
“Eug”	-5,801	-5,191	-2,095	-4,805		-3,92	-6,176	-5,512
“2-ciclo”	-4,644	-4,338		-2,740	-2,856	-2,789	-5,535	-5,121
“Á. ter”	-4,796	-5,073		-3,648	-3,879	-3,667	-6,151	-4,898
“Mir”	-3,545	-2,887	-2,618	-1,583	-1,292	-1,139	-3,298	-3,454
“Pul”	-6,437	-6,249	-4,432	-4,278	-4,555	-4,35	-6,757	-6,087

Se muestran los compuestos “Mir” y “Pul” como ligandos control para el docking molecular, siendo control negativo el “Mir” y control positivo la “Pul”.

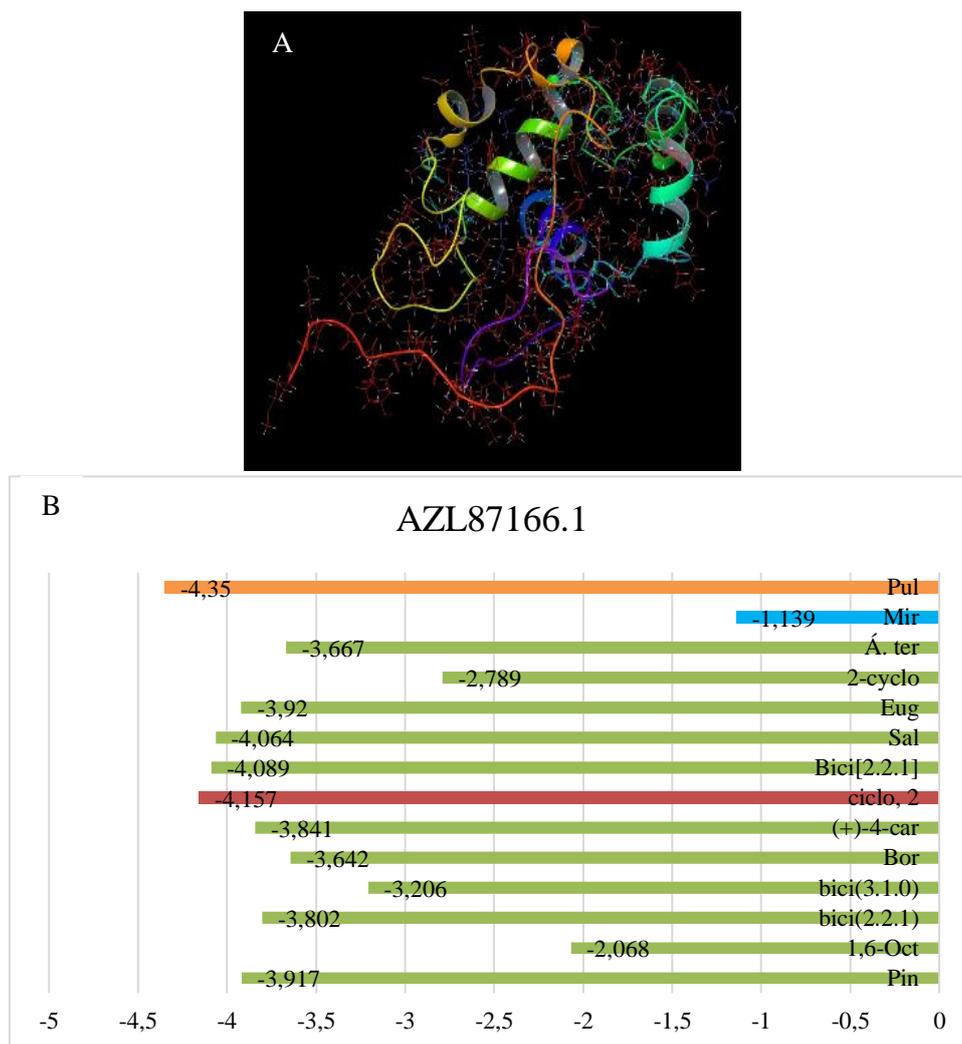


Figura 19. A) OBP AZL87166.1 *Holotrichia oblita* con la plantilla 2L2C *Culex quinquefasciatus* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa al ciclo,2.

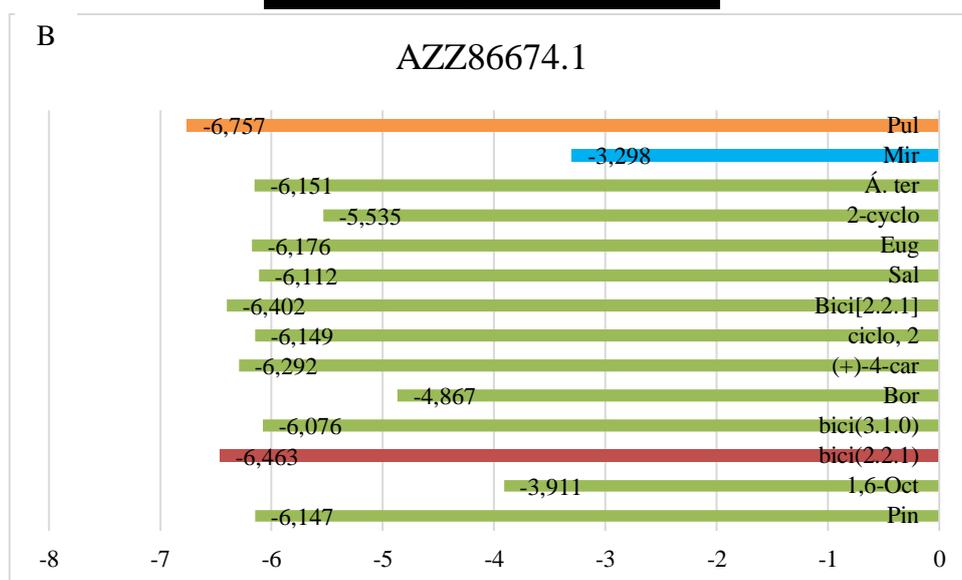
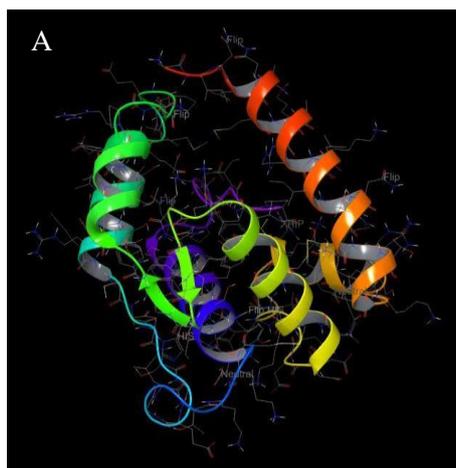


Figura 20. A) OBP AZZ86674.1 *Holotrichia oblita* con 6JMP *Chrysopa pallens* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici (2.2.1).

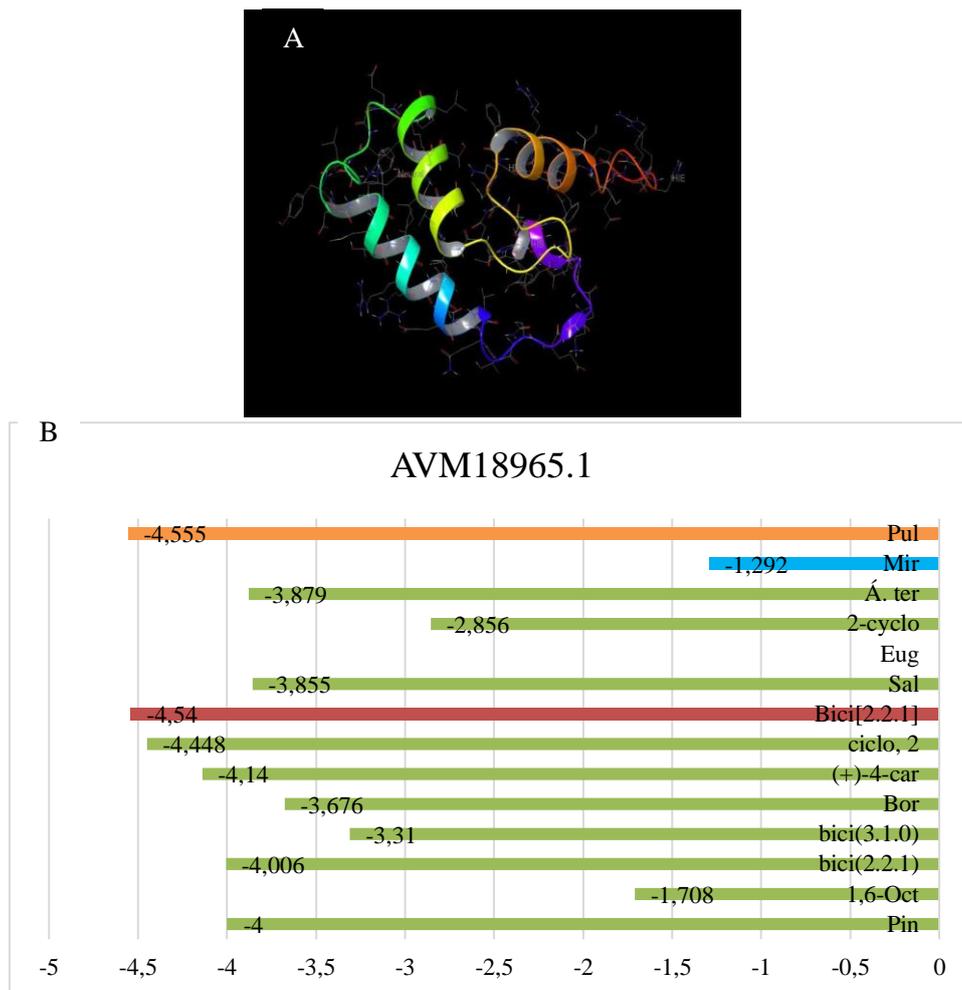


Figura 21. A) OBP AVM18965.1 *Holotrichia parallela* con la plantilla 4Z45 *Nasonovia ribisnigri* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici [2.2.1].

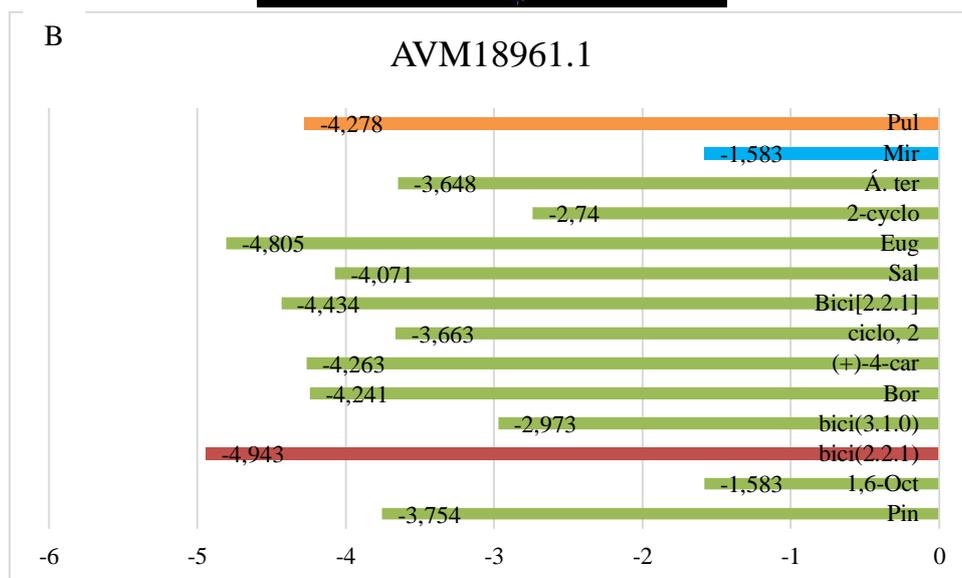
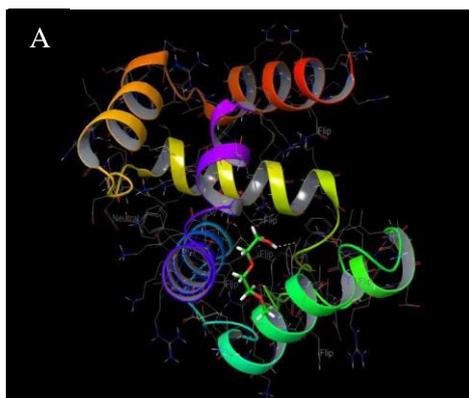


Figura 22. A) OBP AVM18961.1 *Holotrichia parallela* con 6HHE *Ceratitis capitata* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici (2.2.1).

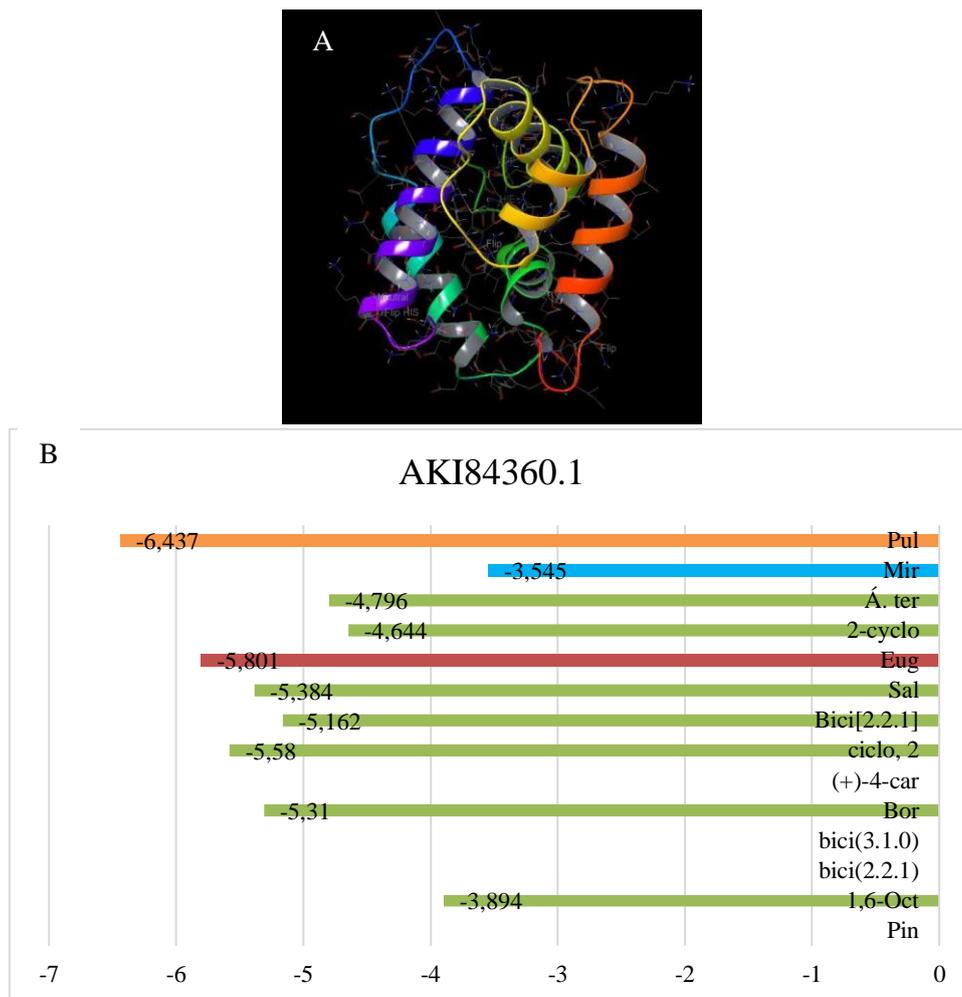


Figura 23. A) OBP AKI84360.1 *Holotrichia parallela* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa al Eug.

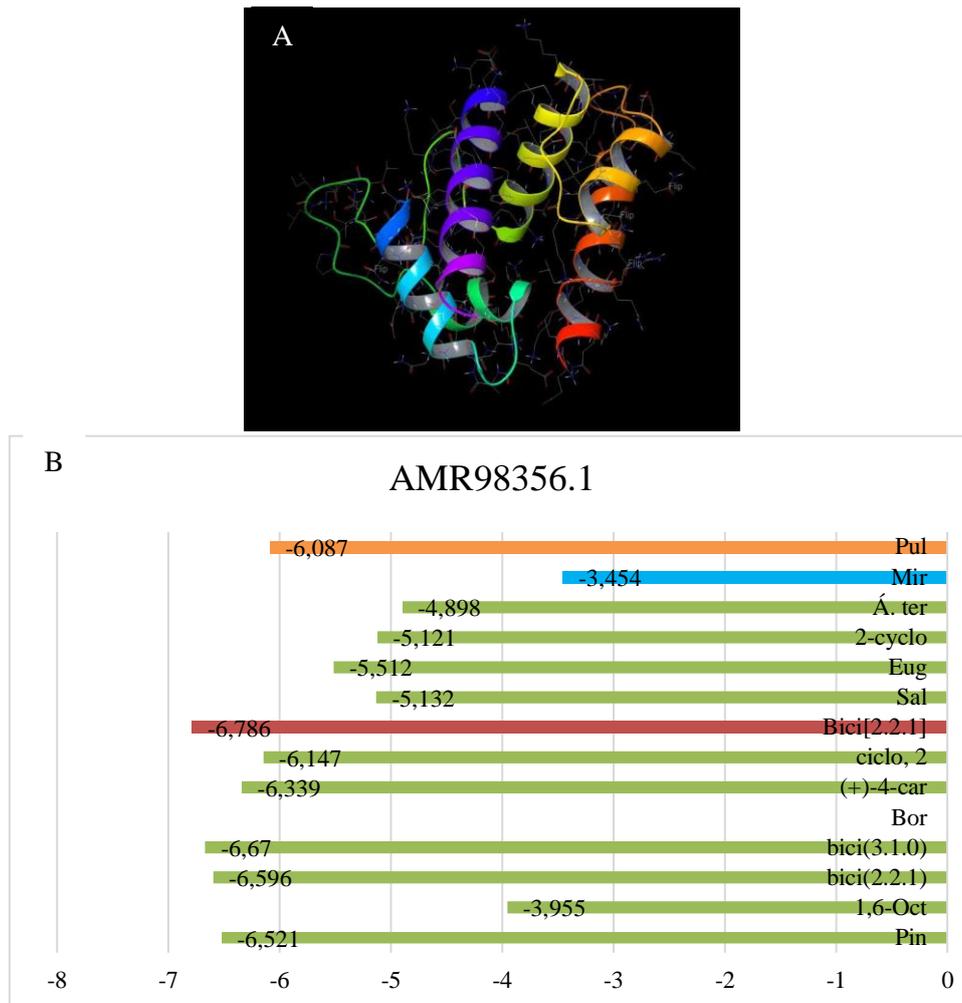


Figura 24. A) OBP AMR98356.1 *Hylamorpha elegans* con la plantilla 3K1E *Aedes aegypti* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Como valor más negativo se observa bici [2.2.1].

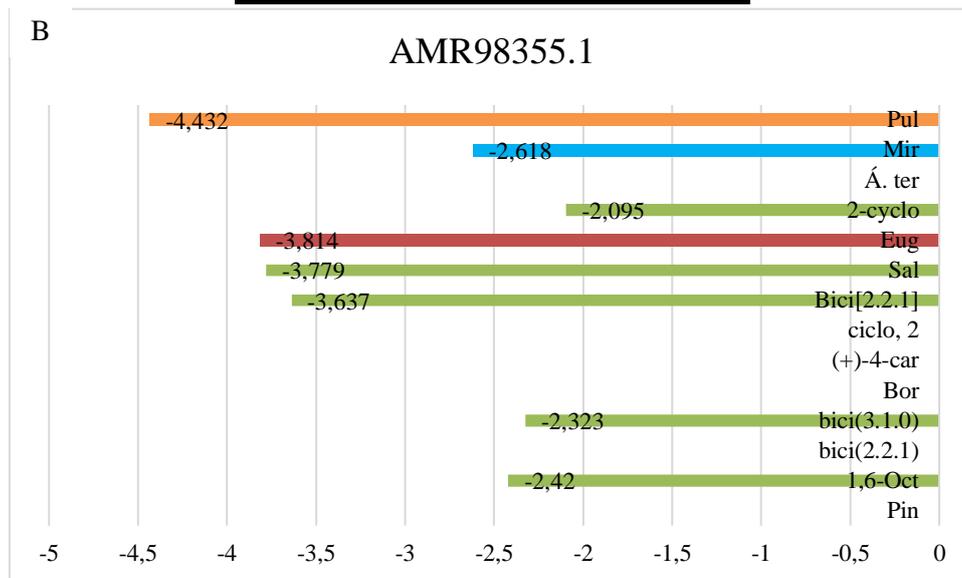
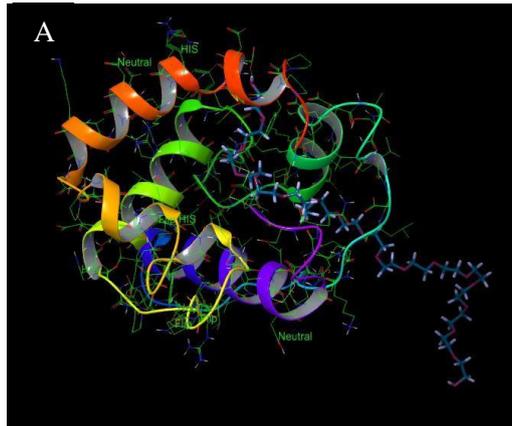


Figura 25. A) OBP AMR98355.1, *Hylamorphia elegans* con 5DIC *Phormia Regina* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Con valor más negativo se observa al Eug.

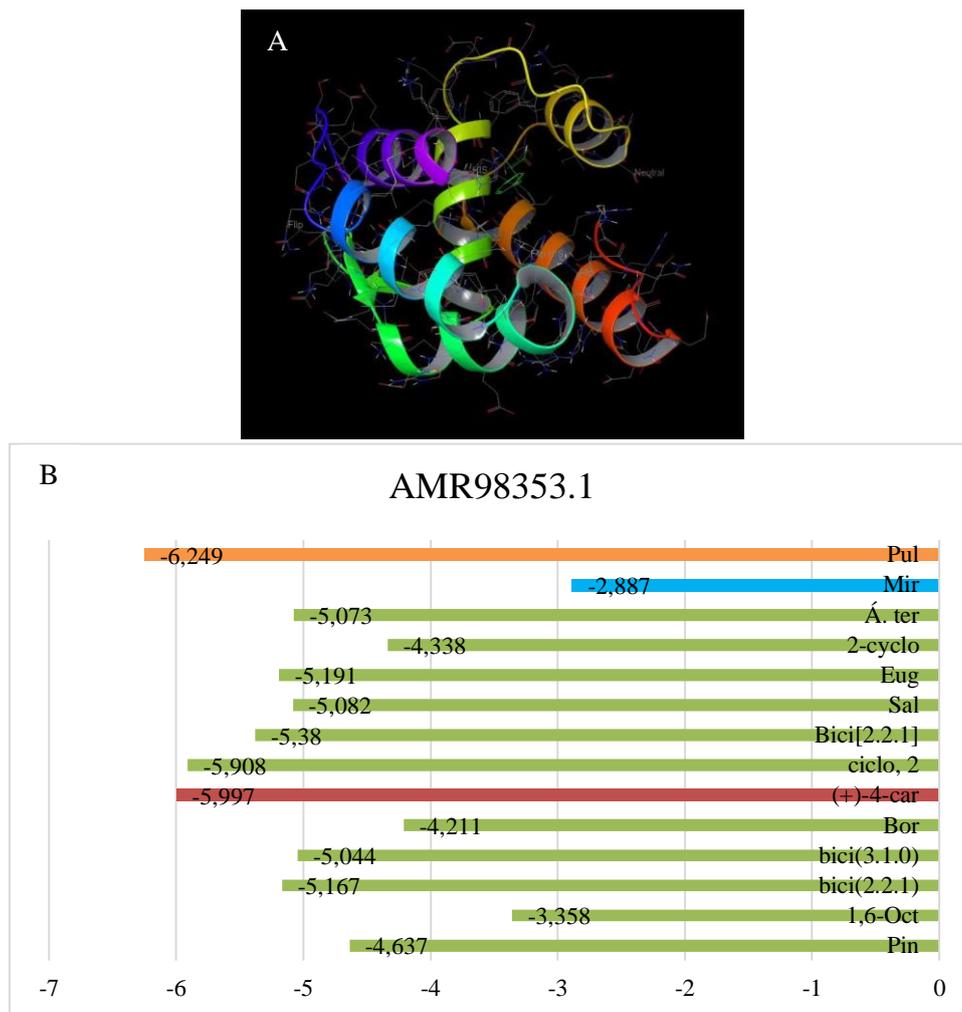
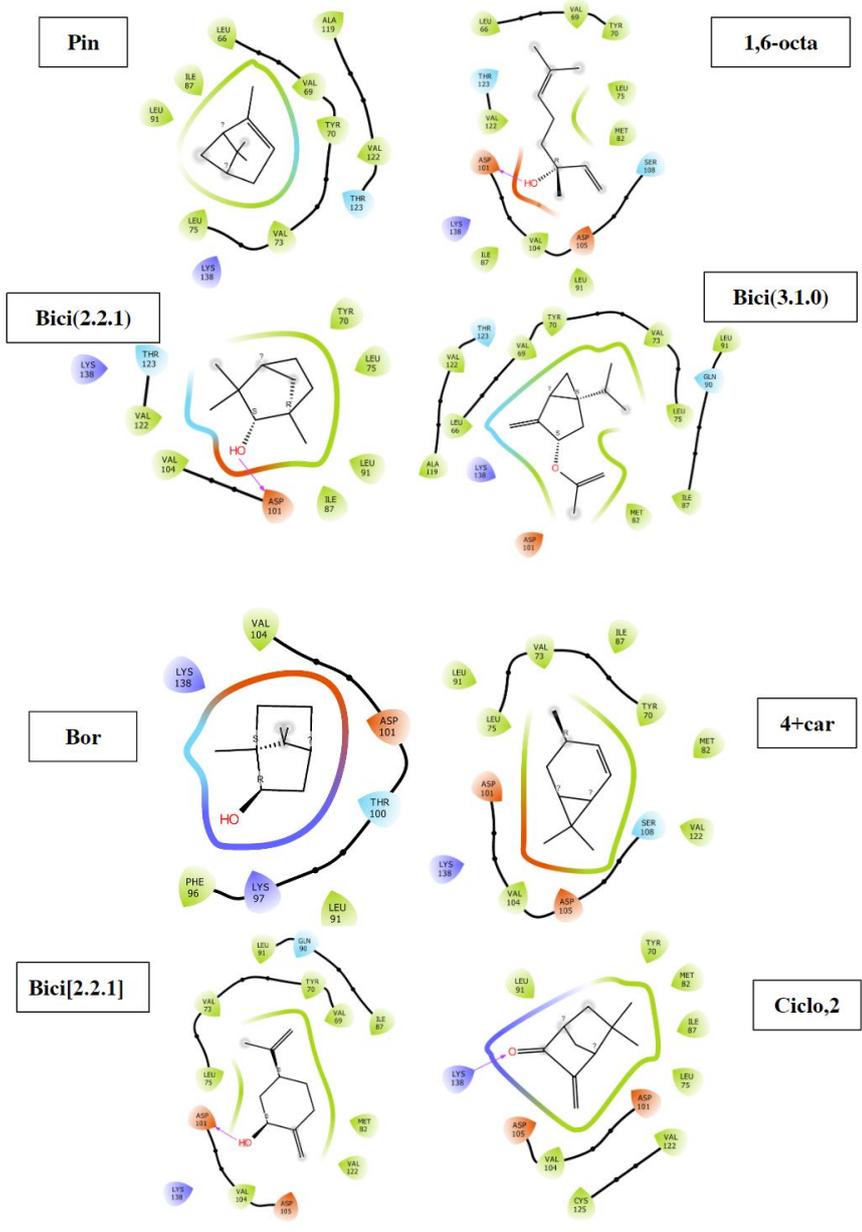


Figura 26. A) OBP AMR98353.1 *Hylamorpha elegans* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster* y B) Valores de energía obtenidos del docking para los 12 compuestos. Con valor más negativo se observa al (+)-4-car.

7.3.3. Diagramas 2D de interacciones con aminoácidos

Se obtuvieron diagramas 2D de las interacciones aminoacídicas de los acoplamientos moleculares entre los ligandos y proteínas para su revisión y posterior análisis de los aa en las OBP modeladas de los Melolonthidae *H. oblita* (Figura 27) (Cuadro 7) *H. parallela* (Figura 28) (Cuadro 8) y *H. elegans* (Figura 29) (Cuadro 9).



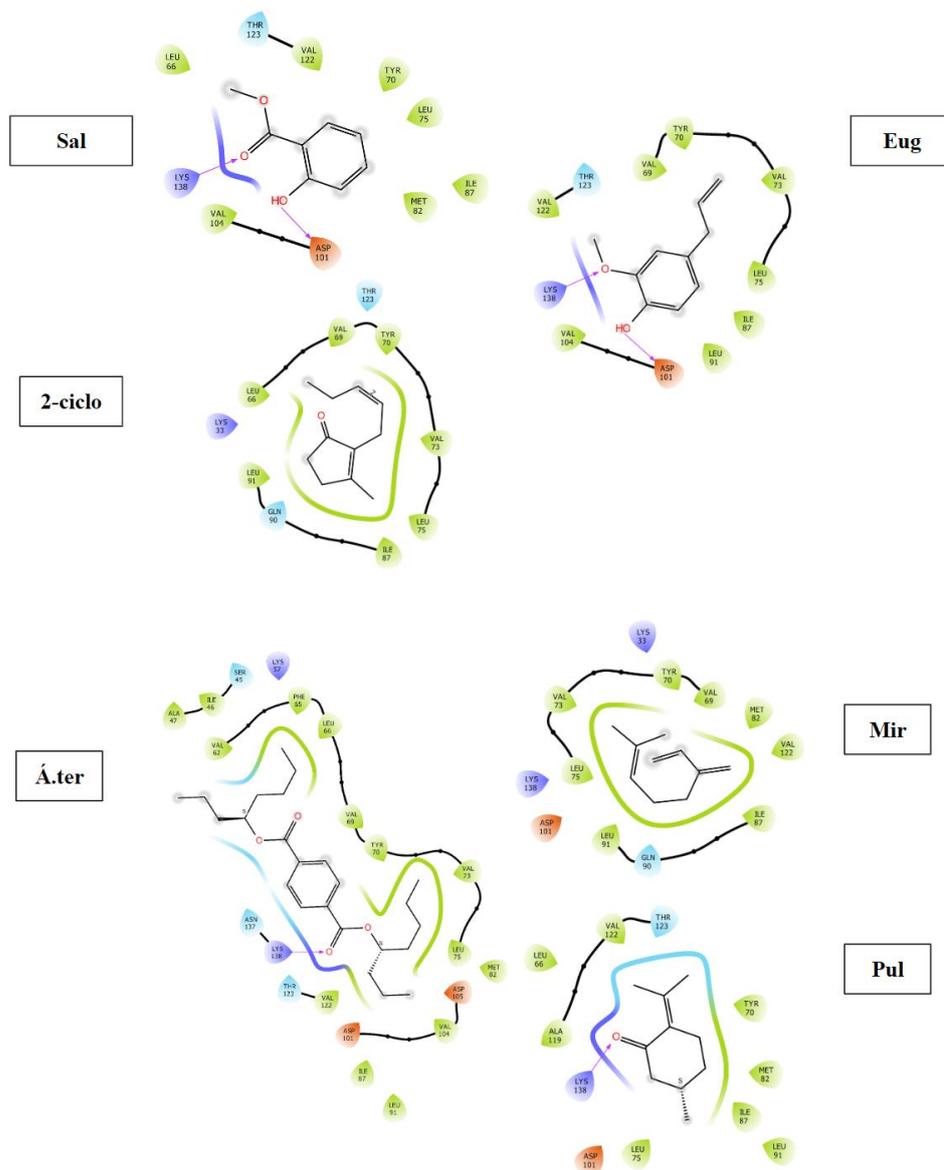


Figura 27. Interacciones aminoacídicas de la OBP AZL87166.1 *Holotrichia oblita* con la plantilla 2L2C *Culex quinquefasciatus* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: Enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales y halos grises: exposición al disolvente.

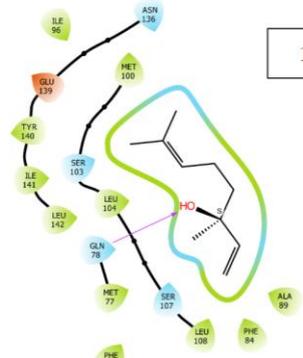
Cuadro 7. Residuos aminoacídicos de la OBP AZL87166.1 *Holotrichia oblita* con la plantilla 2L2C *Culex quinquefasciatus* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“Pin”	LEU (66,75,91) THR (123) VAL (69,73,122) ILE (87) LYS (138) ALA (119) TYR (70)
“1,6-octa”	LEU (66,75,91) THR (123) MET (82) VAL (69, 104,122) ILE (87) LYS (138) ASP (101,105) TYR (70) SER (108)
“Bici (2.2.1)”	LEU (75,91) THR (123) VAL (104,122) ILE (87) LYS (138) ASP (101) TYR (70)
“Bici (3.1.0)”	LEU (66,75,91) THR (123) MET (82) VAL(69,73,122)LYS(138)GLN(90)ALA(119)ASP(101)TYR(70)
“Bor”	LEU(91)THR(100)VAL(104)LYS(97,138)PHE(96)ASP(101)
“(+) -4-car”	LEU (75,91) MET (82) VAL (73,104,122) ILE (87) LYS (138) ASP (101,105) TYR (70) SER (108)
“Ciclo,2”	LEU (75,91)MET(82)VAL(69,73,104,122)ILE(87)LYS(138)GLN(90)ASP(101,105)TYR(70)
“Bici [2.2.1]”	LEU (75,91)MET(82)VAL(104,122)ILE(87)LYS(138)CYS(125)ASP(101,105)TYR(70)
“Sal”	LEU (66,75)THR(123)MET(82)VAL(104,122)ILE(87)LYS(138)ASP(101)TYR(70)
“Eug”	LEU (75,91)THR(123)VAL(69,73,104,122)ILE(87)LYS(138)ASP(101)TYR(70)
“2-ciclo”	LEU(66,75,91)THR(123)VAL(69,73)ILE(87)LYS(33)GLN(90)TYR(70)
“Á. ter”	LEU (66,75,91)THR(123)MET(82)VAL(62,69,73,104,122)ILE(46,87)LYS(57,138)PHE(65)ALA(47)ASP(101,105)TYR(70)ASN(137)
“Mir”	LEU (75,91)MET(82)VAL(69,73,122)ILE(87)LYS(33,138)GLN(90)ASP(101)TYR(70)
“Pul”	LEU (66,75,91) THR(123)MET(82)VAL(122)ILE(87)ALA(119)ASP(101)TYR(70)

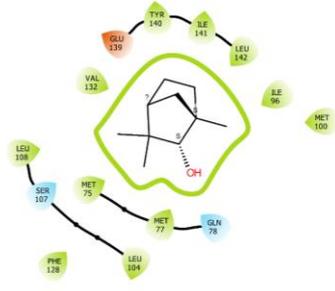
Pin



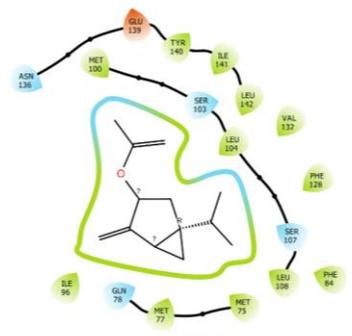
1,6-octa



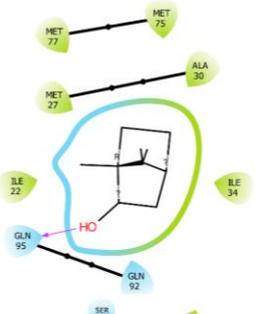
Bici(2.2.1)



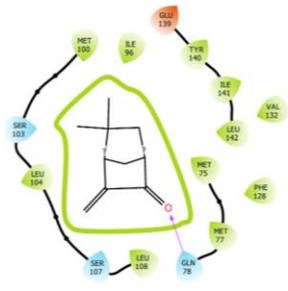
Bici(3.1.0)



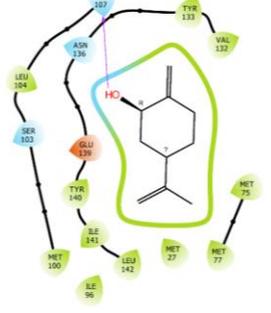
Bor



Bici[2.2.1]



Ciclo,2



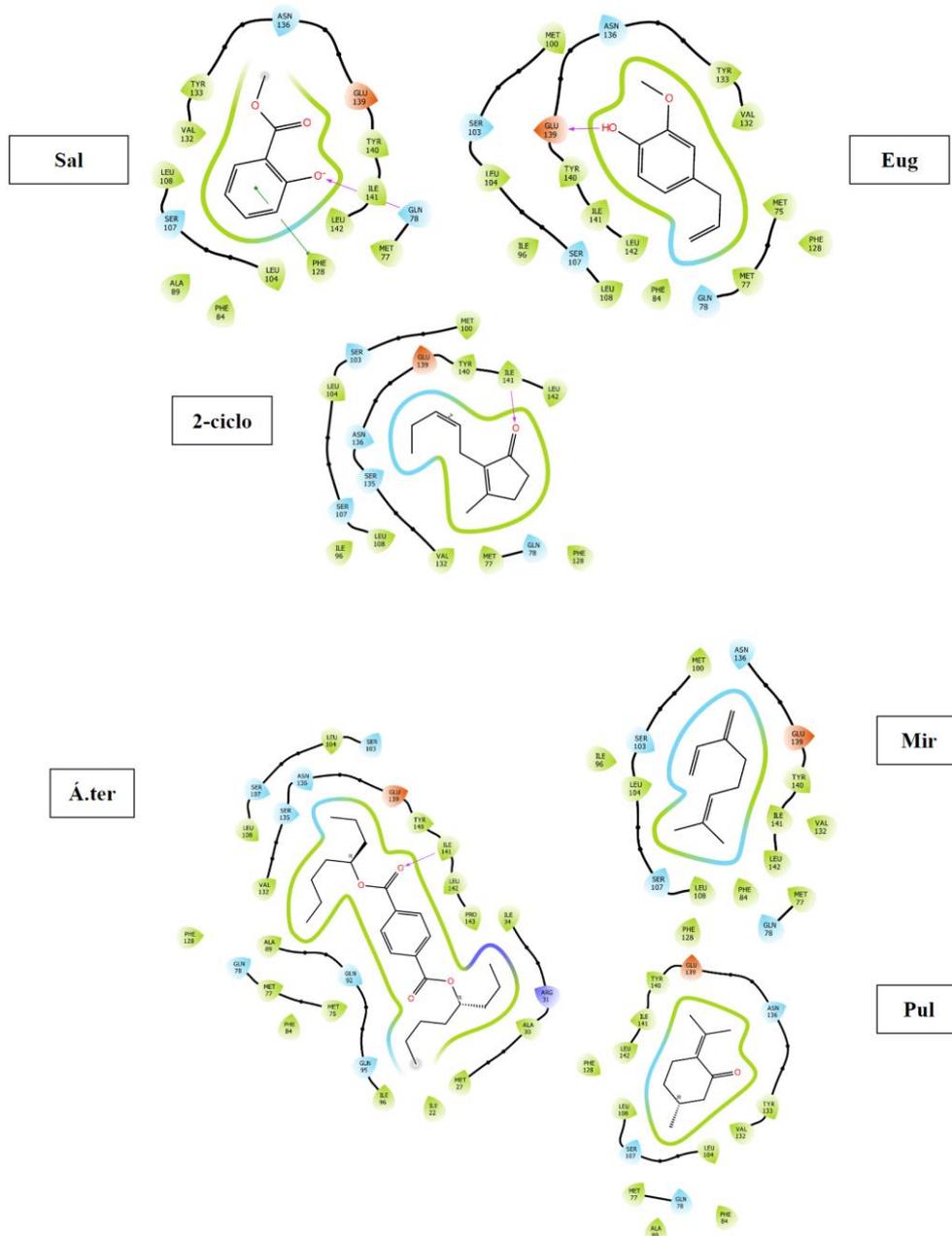
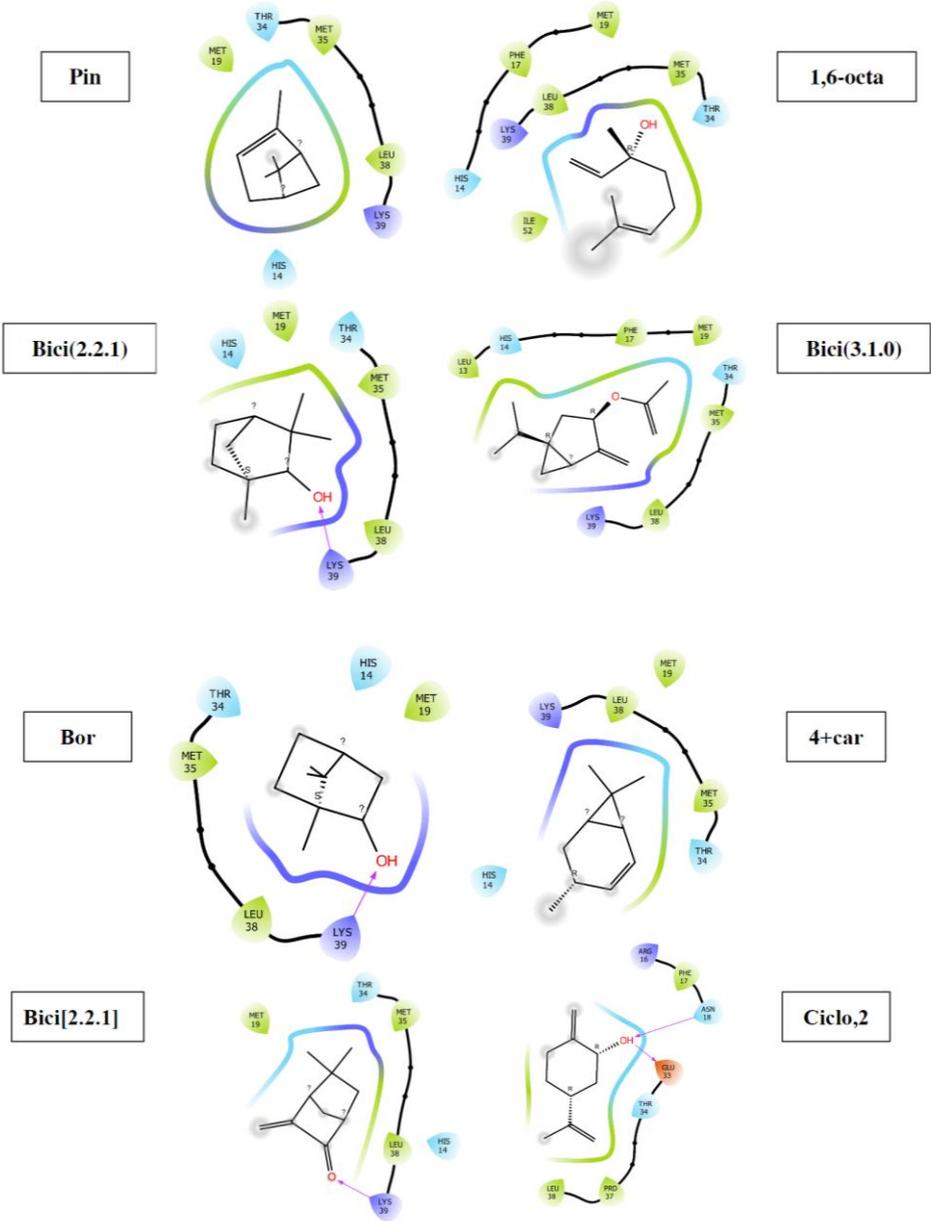


Figura 28. Interacciones aminoacídicas de la OBP AZZ86674.1 *Holotrichia oblitra* con 6JMP *Chrysopa pallens* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción”; verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y flecha verde: interacción π - π .

Cuadro 8. Residuos aminoacídicos de la OBP AZZ86674.1 *Holotrichia oblita* con 6JMP *Chrysopa pallens* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“Pin”	LEU (104,108,142) MET (75,77,100) VAL(132)ILE(96,141)PHE(128)GLN(78)GLU(139)TYR(140)SER(103,107)
“1,6-octa”	LEU (104,108,142)MET(77,100)VAL(132)ILE(96,141)PHE(84,128)ASN(136)GLN(78)GLU(139)ALA(89)TYR(140)SER(103,107)
“Bici (2.2.1)”	LEU(104,108,142)MET(75,77,100)VAL(132)ILE(96,141)PHE(128)GLN(78)GLU(139)TYR(140)SER(107)
“Bici (3.1.0)”	LEU (104,108,142) MET (75,77,100) ASN(136)VAL(132)ILE(96,141)PHE(84,128)GLN(78)GLU(139)TYR(140)SER(103,107)
“Bor”	MET (27,75,77) ILE (22,34) GLN (92,95) ALA (30)
“(+) -4-car”	LEU (194,108,142) ASN (136) MET(77,100)VAL(132)ILE(96,141)PHE(128)GLU(139)TYR(140)SER(103,107)
“Ciclo,2”	LEU (104,142) ASN (136) MET (27,75,77,100) VAL (132) ILE (96,141) GLU (139) TYR (133,140) SER (103,107)
“Bici [2.2.1]”	LEU (104,108,142) MET (77,100) VAL(132)ILE(96,141)PHE(128)GLN(78)GLU(139)TYR(140)SER(103,107)
“Sal”	LEU (104,108,142) ASN (136) MET (77) VAL (132)ILE(141)PHE(84,128)GLN(78)GLU(139)ALA(89)TYR(133,140)SER(107)
“Eug”	LEU (104,108,142) ASN (136) MET (75,77,100) VAL (132) ILE (96,141) PHE (84,128) GLN (78)GLU(139)TYR(133,140)SER(103,107)
“2-ciclo”	LEU (104,108,142) ASN (136) MET (77,100)VAL(132)ILE(96,141)PHE(128)GLN(78)GLU(139)TYR(140)SER(103,107,135)
“Á. ter”	LEU (104,108,142)ASN(136)MET(27,75,77)VAL(132)ILE(22,34,96,141)PHE(84,128)GLN(78,92,95)GLU(139)ALA(30,89)ARG(31)TYR(140)PRO(143)SER(107,103,135)
“Mir”	LEU (104,108) ASN (136) MET (77,100) VAL(132)ILE(96,141)PHE(84,128)GLN(78)GLU(139)TYR(140)SER(103,107)

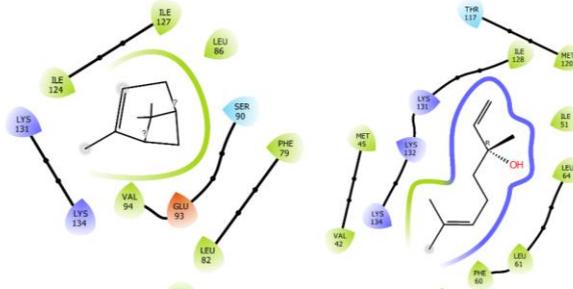
"Pul"	LEU(104,108,142)ASN(136)MET(77)VAL(132)ILE(141)PHE(84,128)GLN(78))GLU(139)ALA(89)TYR(133,140)SER(107)
-------	---



Cuadro 9. Residuos aminoacídicos de la OBP AVM18965.1 *Holotrichia parallela* con la plantilla 4Z45 *Nasonovia ribisnigri* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

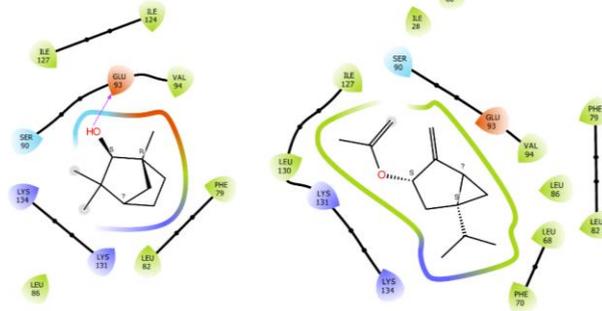
Compuesto	Residuos aminoacídicos
“Pin”	LEU (38) THR (34) MET(19,35)LYS(39)HIS(14)
“1,6-octa”	LEU(38)THR(34)MET(19,35)ILE(52)LYS(39)PHE(17)HIS(14)
“Bici (2.2.1)”	LEU (38)THR(34)MET(19,35)LYS(39)HIS(14)
“Bici (3.1.0)”	LEU (13,38)THR(34)MET(19,35)LYS(39)PHE(17)HIS(14)
“Bor”	LEU (38)THR(34)MET(19,35)LYS(39)HIS(14)
“(+) -4-car”	LEU(38)THR(34)MET(19,35)LYS(39)HIS(14)
“Ciclo,2”	LEU(38)THR(34)PHE(17)GLU(33)ARG(16)PRO(37)ASN(18)
“Bici [2.2.1]”	LEU (38) THR(34)MET(19,35)LYS(39)HIS(14)
“Sal”	LEU (38)THR(34)MET(19,35)ILE(52)LYS(39)HIS(14)
“Eug”	LEU (38) THR(34)PHE(17)GLU(33)ARG(16)PRO(37)ASN(18)
“2-ciclo”	LEU (38) THR(34)MET(19,35)ILE(52)LYS(39)PHE(17)HIS(14)
“Á. ter”	LEU(13,38)THR(34,57)GLY(53)MET(19,20,35)VAL(60)ILE(26,52)LYS(39)PHE(17)CYS(56)GLU(59,72)HIS(14)
“Mir”	LEU(38)THR(34)MET(19,35)ILE(52)LYS(39)PHE(17,49)HIS(14)
“Pul”	LEU(38)THR(34)PHE(17)GLU(33)ARG(16)PRO(37)ASN(18)

Pin



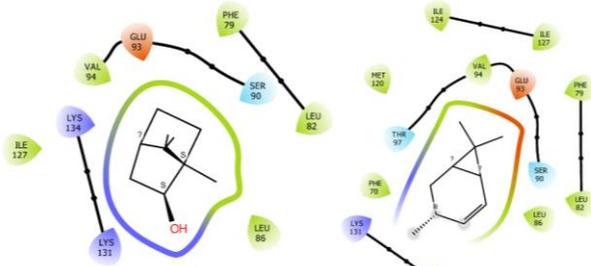
1,6-octa

Bici(2.2.1)



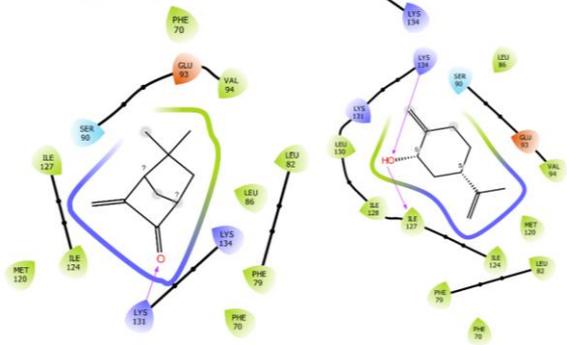
Bici(3.1.0)

Bor



4+car

Bici[2.2.1]



Ciclo,2

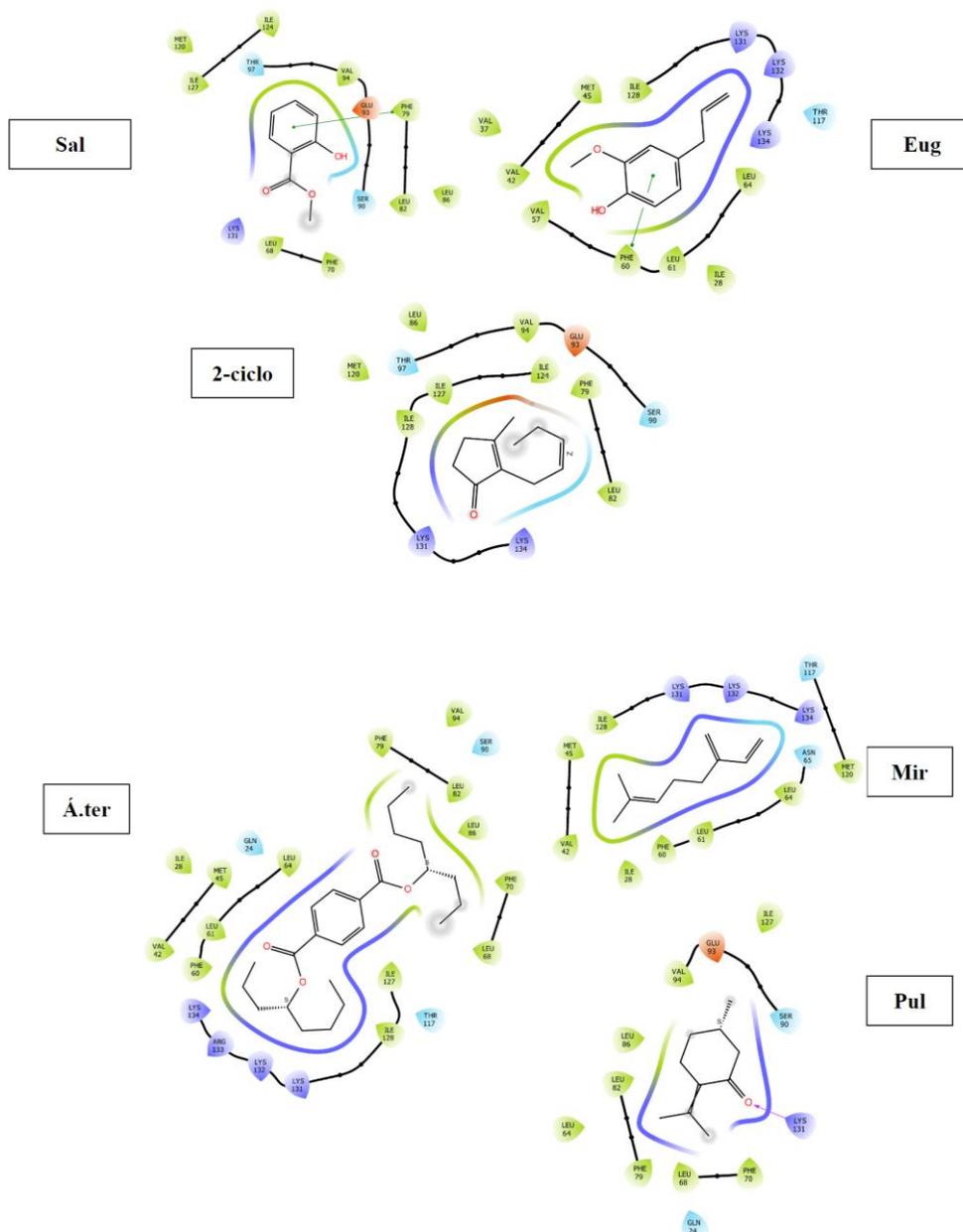


Figura 30. Interacciones aminoacídicas de la OBP AVM18961.1 *Holotrichia parallela* con 6HHE *Ceratitits capitata* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: Enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y flecha verde: interacción π - π .

Cuadro 10. Residuos aminoacídicos de la OBP AVM18965.1 *Holotrichia parallela* con la plantilla 4Z45 *Nasonovia ribisnigri* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“Pin”	LEU (82,86) VAL (94)ILE(124,127)LYS(131,134)PHE(79)GLU(93)SER(90)
“1,6-octa”	LEU (61,64)THR(117)MET(45,120)VAL(42)ILE(28,51,128)LYS(131,132,134)PHE(60)
“Bici (2.2.1)”	LEU (82,86) VAL (94) ILE (124,127)LYS(131,134)PHE(79)GLU(93)SER(90)
“Bici (3.1.0)”	LEU (68,82,86,130)VAL(94)ILE(127)LYS(131,134)PHE(70,79)GLU(93)SER(90)
“Bor”	LEU (82,86) VAL (94) ILE (127) LYS(131,134)PHE(70,79)GLU(93)SER(90)
“(+) -4-car”	LEU(82,86)THR(97)MET(120)VAL(94)ILE(124,127)LYS(131,134)PHE(70,79)GLU(93)SER(90)
“Ciclo,2”	LEU(82,86,130)MET(120)VAL(94)ILE(124,127,128)LYS(131,134)PHE(70,79)GLU(93)SER(90)
“Bici [2.2.1]”	LEU (82,86) MET(120)VAL(94)ILE(124,127)LYS(131,134)PHE(79)GLU(93)SER(90)
“Sal”	LEU(78,82,86)THR(97)MET(120)VAL(94)ILE(124,127)LYS(131)PHE(70,79)GLU(93)SER(90)
“Eug”	LEU(61,64)THR(117)MET(45)VAL(37,42)ILE(28,128)LYS(131,132,134)PHE(60)
“2-ciclo”	LEU (82,86)THR(97)MET(120)VAL(94)ILE(124,127,128)LYS(131,134)PHE(79)GLU(93)SER(90)
“Á. ter”	LEU (61,64,68,82,86)THR(117)MET(45)VAL(42,94)ILE(28,127,128)LYS(131,132,134)PHE(60,70,79)GLN(24)ARG(133)SER(90)
“Mir”	LEU (61,64)THR(117)MET(45,120)VAL(42)ILE(28,128)LYS(131,132,134)PHE(60)ASN(65)
“Pul”	LEU (64,68,82,86) VAL(94)ILE(127)LYS(131)PHE(70,79)GLN(24)GLU(93)SER(90)

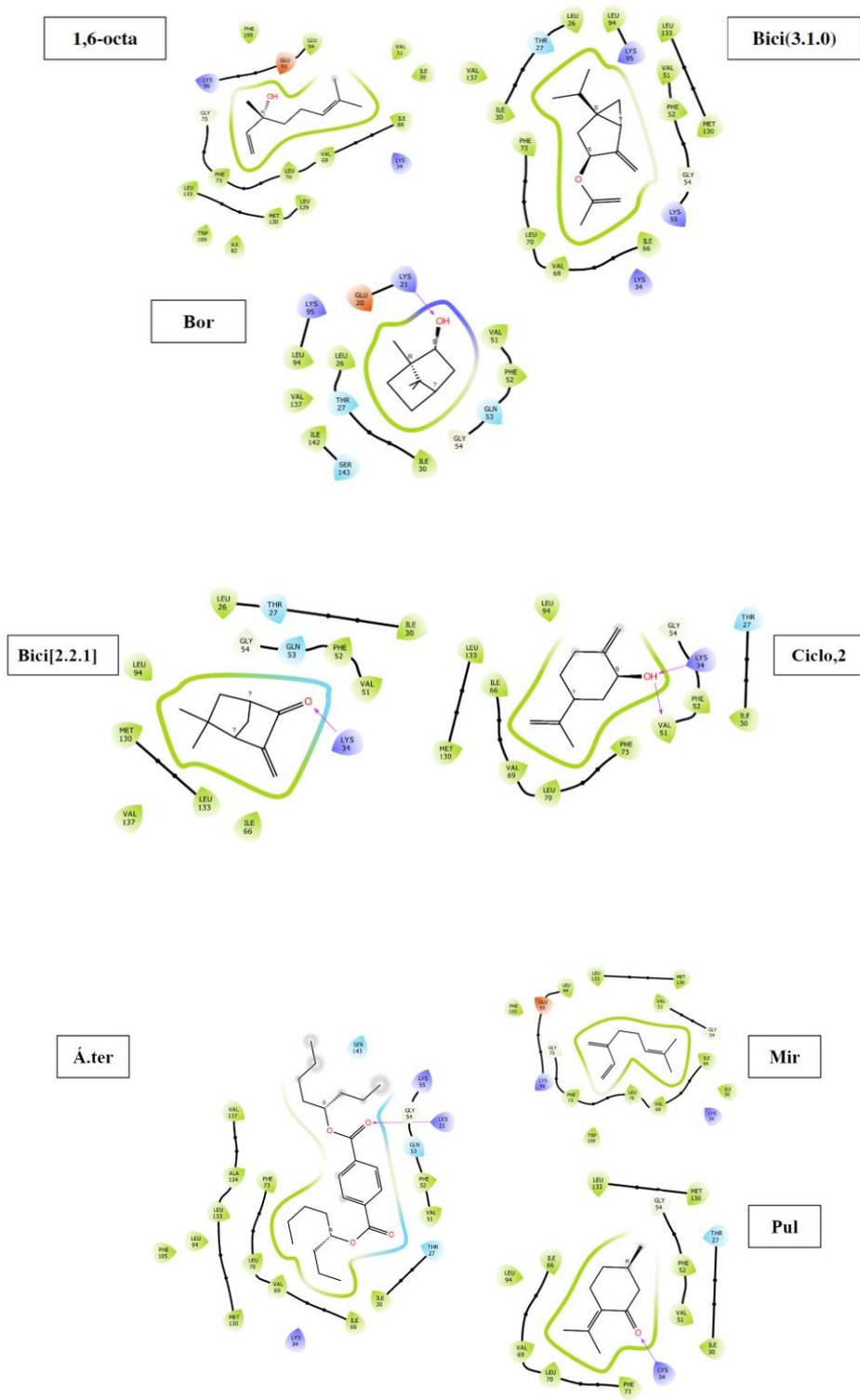
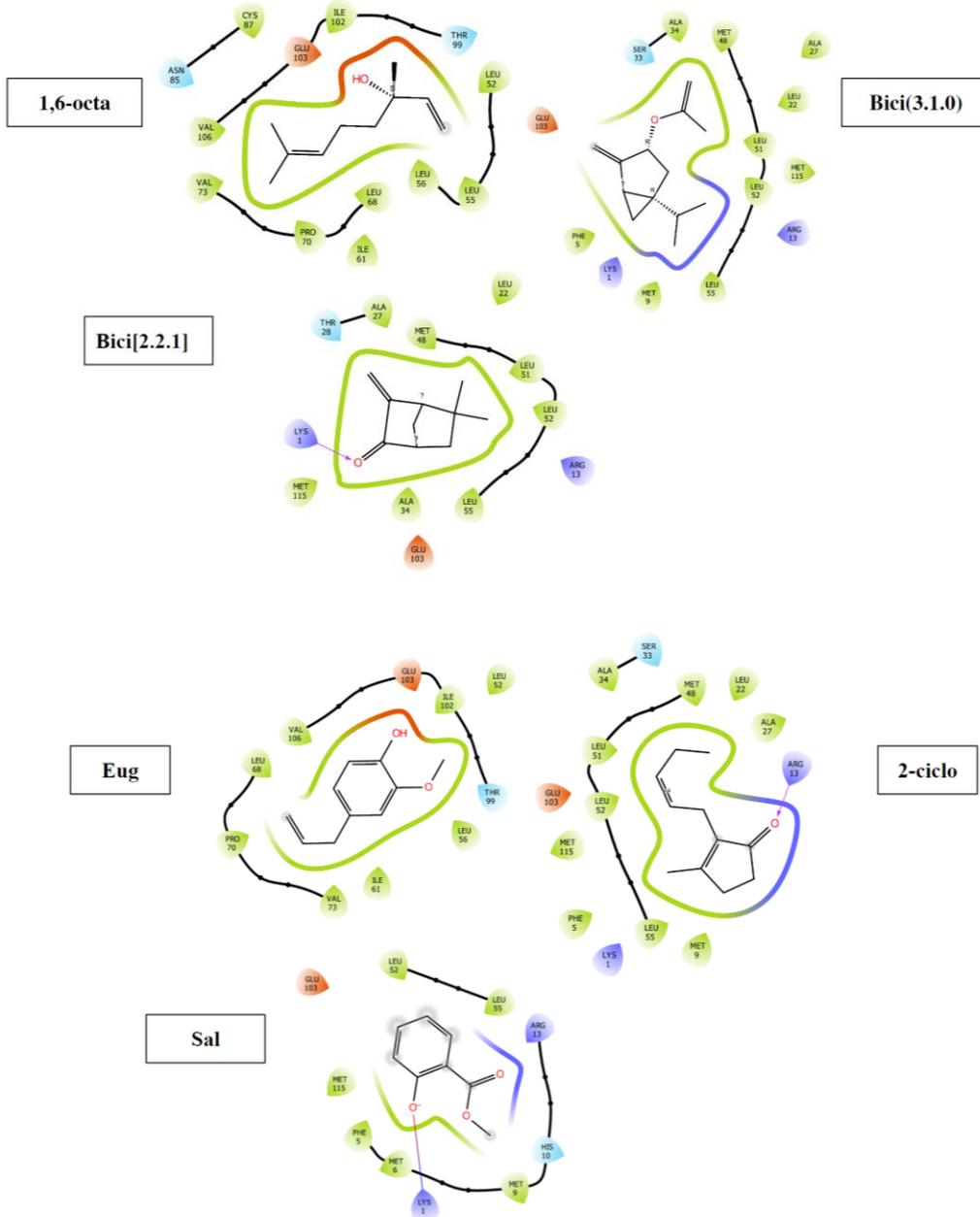


Figura 31. Interacciones aminoacídicas de la OBP AKI84360.1 *Holotrichia parallela* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente.

Cuadro 11. Residuos aminoacídicos de la OBP AKI84360.1 *Holotrichia parallela* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“1,6-octa”	LEU (70,94,129,133)GLY(75)MET(130)VAL(51,69)ILE(30,66,82)LYS(90)PHE(73)TRP(109)GLU(93)
“Bici (3.1.0)”	LEU(26,70,94,133)THR(27)GLY(53)MET(130)VAL(51,69,137)ILE(30,66)LYS(34,55,95)PHE(52,73)
“Bor”	LEU(26,94)THR(27)GLY(54)VAL(51,137)ILE(30,142)LYS(21,95)PHE(52)GLN(53)GLU(20)SER(143)
“Ciclo,2”	LEU (70,94,133) THR (27)GLY(54)MET(130)VAL(51,69)ILE(30,66)LYS(34)PHE(52,73)
“Bici [2.2.1]”	LEU(26,94,133)THR(27)GLY(54)MET(130)VAL(51,137)ILE(30,66)LYS(34)PHE(52)GLN(53)
“Sal”	LEU(70,94,133)THR(27)GLY(54)MET(130)VAL(51,69)ILE(30,66)LYS(34)PHE(52,73)GLN(53)
“Eug”	LEU (70,94) GLY(54)MET(130)VAL(51,69)ILE(30,66)LYS(34,90)PHE(105)TRP(109)GLU(93)
“2-ciclo”	LEU(70,94,133)THR(27)GLY(54)MET(130)VAL(51,69,137)ILE(30,66)LYS(34)PHE(73)ALA(134)
“Á. ter”	LEU(70,94,133)THR(27)GLY(54)MET(130)VAL(51,69,137)ILE(30,66)LYS(21,34,55)PHE(52,73,105)GLN(53)ALA(134)SER(143)
“Mir”	LEU (70,94,133)GLY(54,75)MET(130)VAL(51,69)ILE(30,66)LYS(34,90)PHE(73,105)TRP(109)GLU(93)
“Pul”	LEU (70,94,133)THR(27)GLY(54)MET(130)VAL(51,69)ILE(30,66)LYS(34)PHE(52,73)



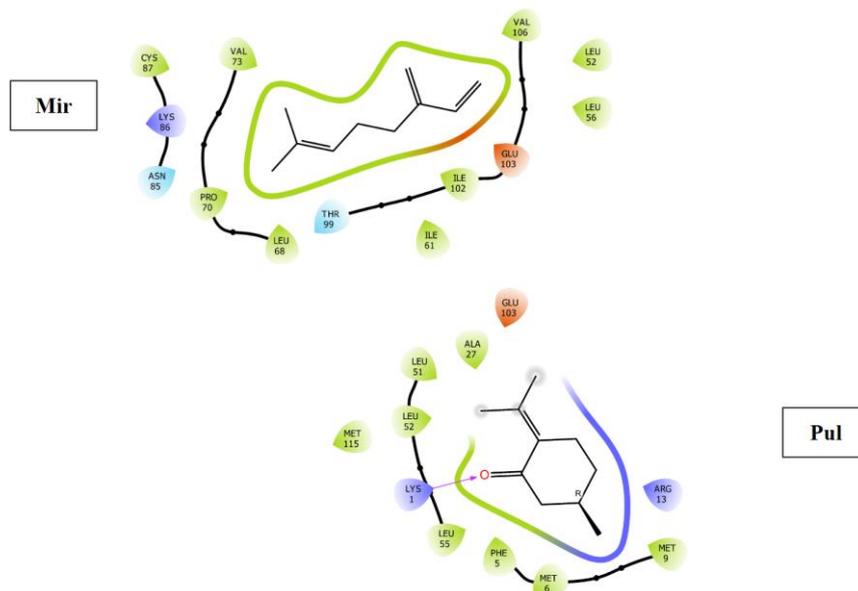


Figura 32. Interacciones aminoacídicas de la OBP AMR98356.1 *Hylamorpha elegans* con la plantilla 3K1E *Aedes aegypti* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente.

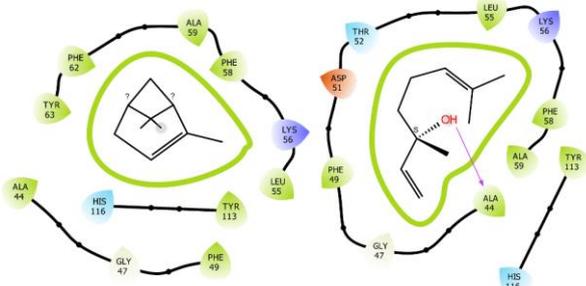
Cuadro 12. Residuos aminoacídicos de la OBP AMR98356.1 *Hylamorpha elegans* con la plantilla 3K1E *Aedes aegypti* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“1,6-octa”	LEU (52,55,56,68) VAL (73,106)ILE(61,102)CYS(87)GLU(103)PRO(70)ASN(85)
“Bici (3.1.0)”	LEU (22,51,52,55)MET(9,48,115)LYS(1)PHE(5)GLU(103)ALA(27,34)ARG(13)SER(33)
“Bici [2.2.1]”	LEU (22,51,52,55) THR (28)MET(48,115)LYS(1)GLU(103)ALA(27,34)ARG(13)
“Sal”	LEU (52,55)MET(6,9,115)LYS(1)PHE(5)GLU(103)ARG(13)HIS(10)
“Eug”	LEU (52,56,68)THR(99)VAL(73,106)ILE(61,102)GLU(103)PRO(70)
“2-ciclo”	LEU (22,51,52,55) MET (9,48,115) LYS (1) PHE(5)GLU(103)ALA(27,34)ARG(13)SER(33)
“Mir”	LEU(52,56,68)THR(99)VAL(73,106)ILE(61,102)LYS(86)CYS(87)GLU(103)PRO(70)ASN(85)

“Pul”

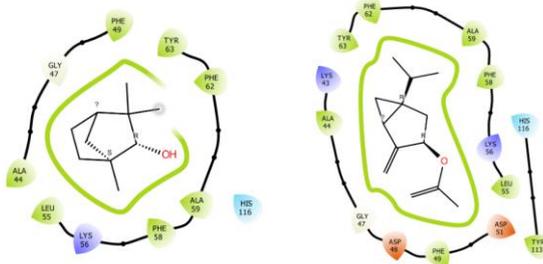
LEU (51,52,55) MET(6,9,115) LYS(1)PHE(5)GLU(103)ALA(27)ARG(13)

Pin



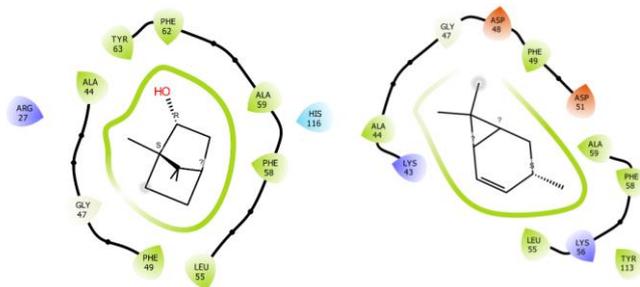
1,6-octa

Bici(2.2.1)



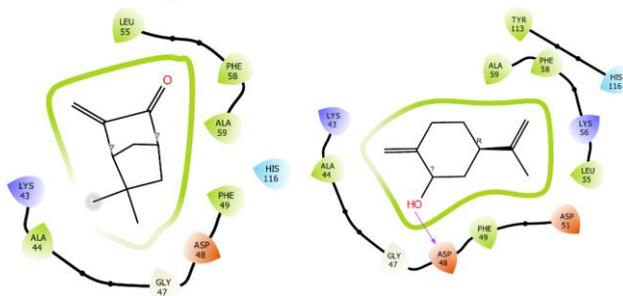
Bici(3.1.0)

Bor



4+car

Bici[2.2.1]



Ciclo,2

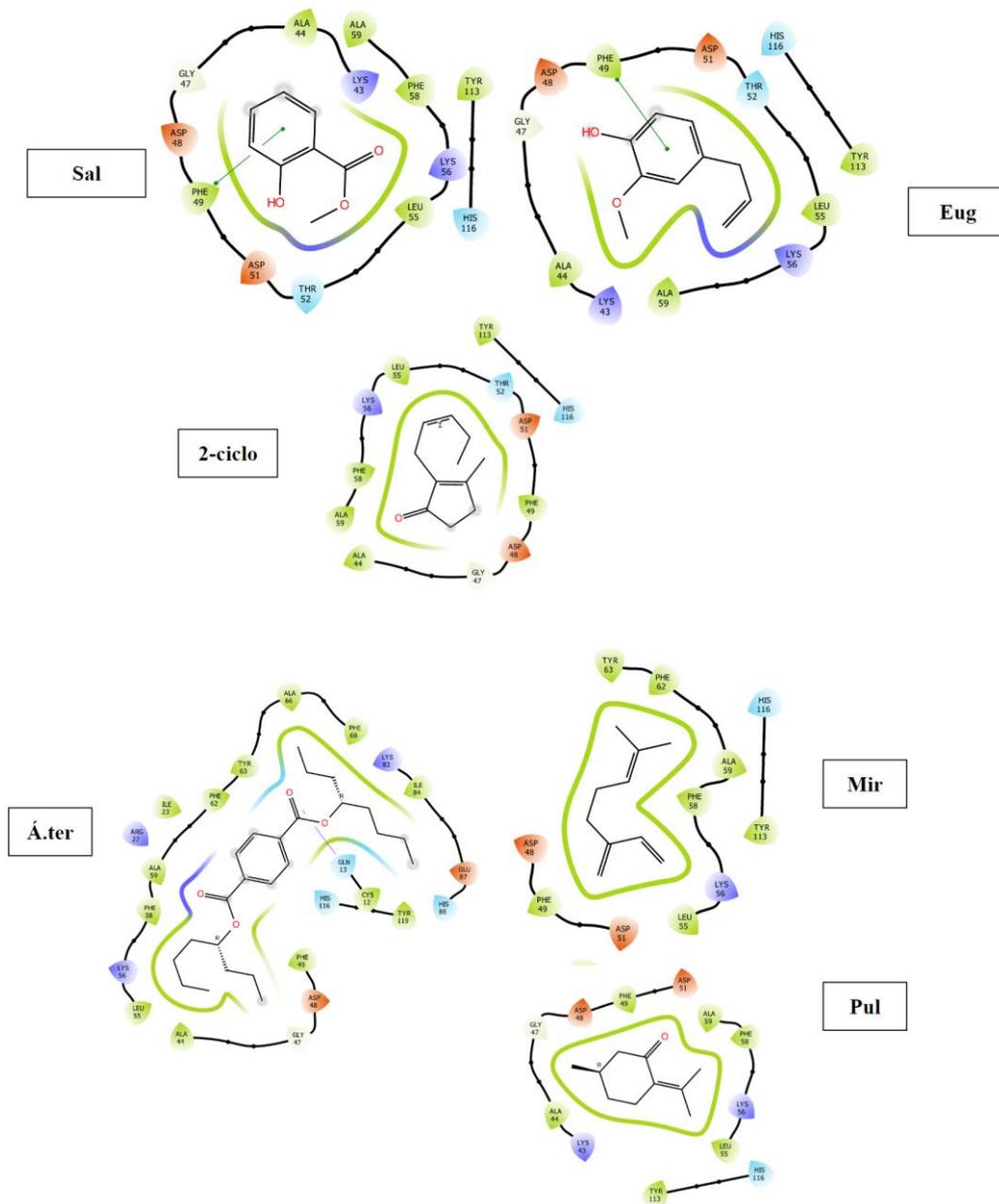


Figura 33. Interacciones aminoacídicas de la OBP AMR98355.1, *Hylamorpha elegans* con 5DIC *Phormia Regina* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente y flecha verde: interacción π - π .

Cuadro 13. Residuos aminoacídicos de la OBP AMR98355.1, *Hylamorpha elegans* con 5DIC *Phormia Regina* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“Pin”	LEU (55)GLY(47)LYS(56)PHE(49,58,62)ALA(44,59)HIS(116)TYR(113,63)
“1,6-octa”	LEU(55)THR(52)GLY(47)LYS(56)PHE(58,49)ALA(44,59)HIS(116)ASP(51)TYR(113)
“Bici (2.2.1)”	LEU (55)GLY(47)LYS(56)PHE(49,58,62)ALA(44,59)HIS(116)TYR(63)
“Bici (3.1.0)”	LEU(55)GLY(47)LYS(43,56)PHE(49,58,62)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(63,113)
“Bor”	LEU(55)GLY(47)PHE(49,58,62)ALA(44,59)ARG(27)HIS(116)TYR(63)
“(+)4-car”	LEU (55) GLY(47)LYS(43,56)PHE(49,58)ALA(44,59)ASP(48,51)TYR(113)
“Ciclo,2”	LEU(55)GLY(47)LYS(43,56)PHE(49,58)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(113)
“Bici [2.2.1]”	LEU(55)GLY(47)LYS(43)PHE(49,58)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48)
“Sal”	LEU (55)THR(52)GLY(47)LYS(43,56)PHE(49,58)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(113)
“Eug”	LEU (55) THR(52)GLY(47)LYS(43,56)PHE(49)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(113)
“2-ciclo”	LEU (55)THR(52)GLY(47)LYS(56)PHE(49,58)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(113)
“Á. ter”	LEU(55)GLY(47)ILE(23,84)LYS(56,83)PHE(49,58,62,68)GLN(13)CYS(12)GLU(87)ALA(44,59,66)ARG(27)HIS(88,116)ASP(48)TYR(63,119)
“Mir”	LEU(55)LYS(56)PHE(49,58,62)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(113)
“Pul”	LEU (55) GLY (47) LYS(43,56)PHE(49,58)ALA(44,59)HIS(116)ASP(48,51)TYR(113)

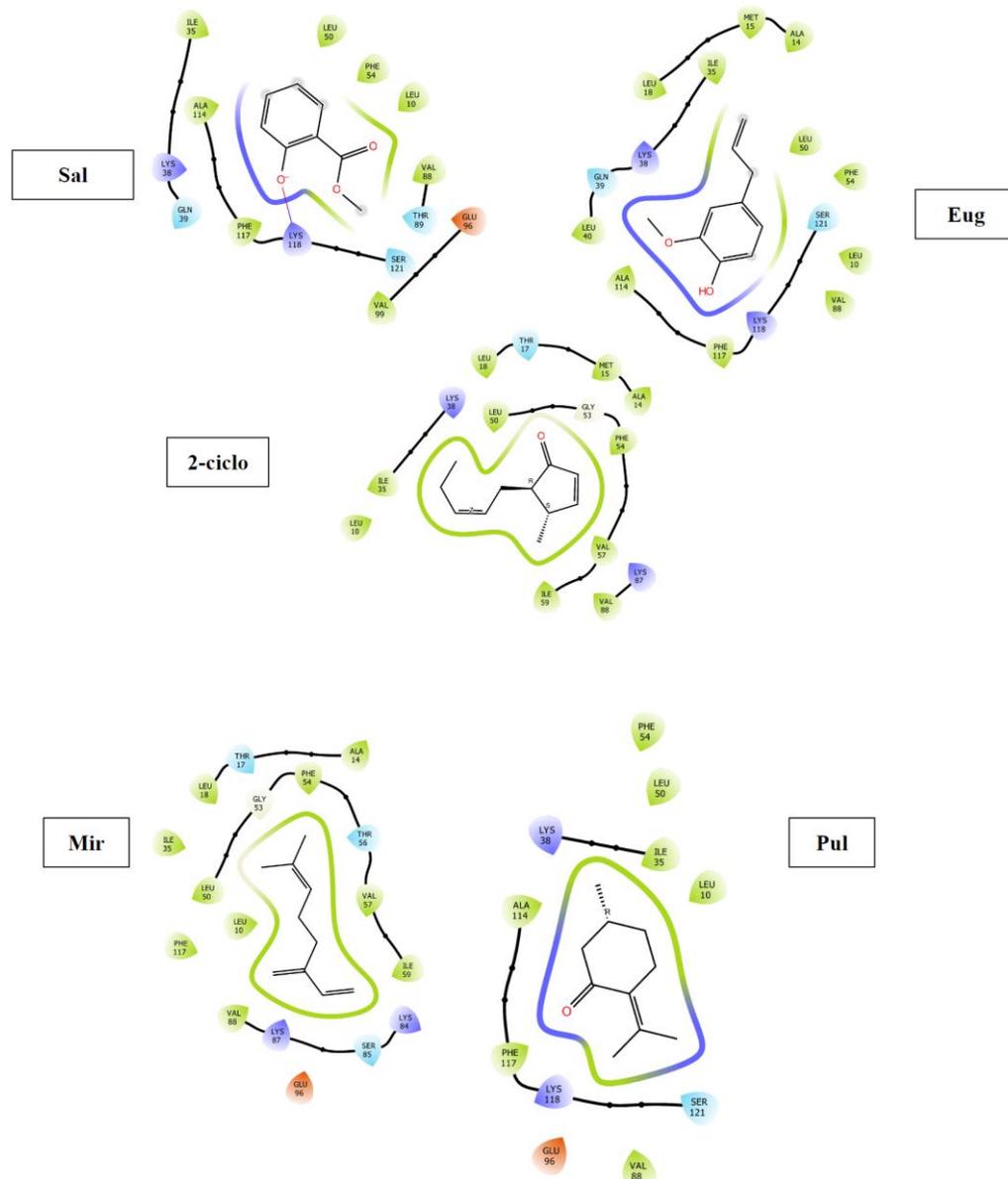


Figura 34. Interacciones aminoacídicas de la OBP AMR98353.1 *Hylamorpha elegans* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster* para cada ligando. Los colores representan “tipos de interacción” el verde: apolar alifática, azul claro: polar, azul fuerte: aa con carga positiva, rojo: aa con carga negativa, flecha morada: enlace de hidrógeno, línea negra: coordinación de metales, halos grises: exposición a solvente.

Cuadro 14. Residuos aminoacídicos de la OBP AMR98353.1 *Hylamorpha elegans* con 6QQ4 *Drosophila melanogaster* que interactúan con los compuestos identificados de *Acaciella angustissima*.

Compuesto	Residuos aminoacídicos
“Pin”	LEU (10,18,50) THR (17,56) GLY (53) VAL (57,88) ILE(35,59) LYS(87) PHE(54,117) ALA(14)
“1,6-octa”	LEU (10,18) THR (17,56) GLY(53) MET(15) VAL(57,88) ILE(35,59) LYS(38,84,87) PHE(54,117) ALA(11,114)
“Bici (2.2.1)”	LEU (10,50) VAL (88) ILE(35) LYS(38,118) PHE(54,117) GLN(39) ALA(114)
“Bici (3.1.0)”	LEU (10,18,50) THR(17) GLY(17) MET(15) VAL(57,88) ILE(35) LYS(38,87) PHE(54,117) ALA(14,114) PRO(41)
“(+) -4-car”	LEU (10) VAL(88) ILE(35) LYS(38,118) PHE(54,117) ALA(114) SER(121)
“Ciclo,2”	LEU(10,18) THR(17,56) GLY(53) MET(15) VAL(57,88) ILE(35) LYS(87) PHE(117) GLN(13) ALA(14)
“Bici [2.2.1]”	LEU(10) MET(15) VAL(88) ILE(35) LYS(38,118) PHE(54,117) GLN(39) ALA(114)
“Sal”	LEU (10,50) THR(89) VAL(88,99) ILE(35) LYS(38,118) PHE(54,117) GLN(39) GLU(96) ALA(114) SER(121)
“Eug”	LEU (10,18,40,50) MET(15) VAL(88) ILE(35) LYS(38,118) PHE(54,117) GLN(39) ALA(14,114) SER(121)
“2-ciclo”	LEU(10,18,50) THR(17) GLY(53) MET(15) VAL(57,88) ILE(35,59) LYS(38,87) PHE(54) ALA(14)
“Mir”	LEU(10,18,50) THR(17,56) GLY(53) VAL(57,88) ILE(35,59) LYS(84,87) PHE(54,117) GLU(96) ALA(14) SER(85)
“Pul”	LEU (10,50) VAL (88) ILE(35) LYS(38,118) PHE(54,117) GLU(96) ALA(114) SER(121)

7.3.4. Bioensayos en laboratorio

Se registraron treinta respuestas por parte de los adultos de *M. mexicanus*, quince machos y quince hembras. Estas respuestas fueron estadísticamente significativas hacia los macerados de hojas y flores de *A. angustissima* con respecto al control ($X^2 = 8.53$, $p < 0.05$) (Figura 35). En este sentido, se obtuvieron taxias positivas en más del 90% de los bioensayos (Figura 36) y aunque no se detectaron diferencias estadísticas significativas en lo que, a la respuesta diferencial entre sexos ($X^2 = 0.74534$, $p > 0.05$), la tendencia es que las hembras muestren un mayor número de taxias con respecto al control y a las de los machos (Figura 37).

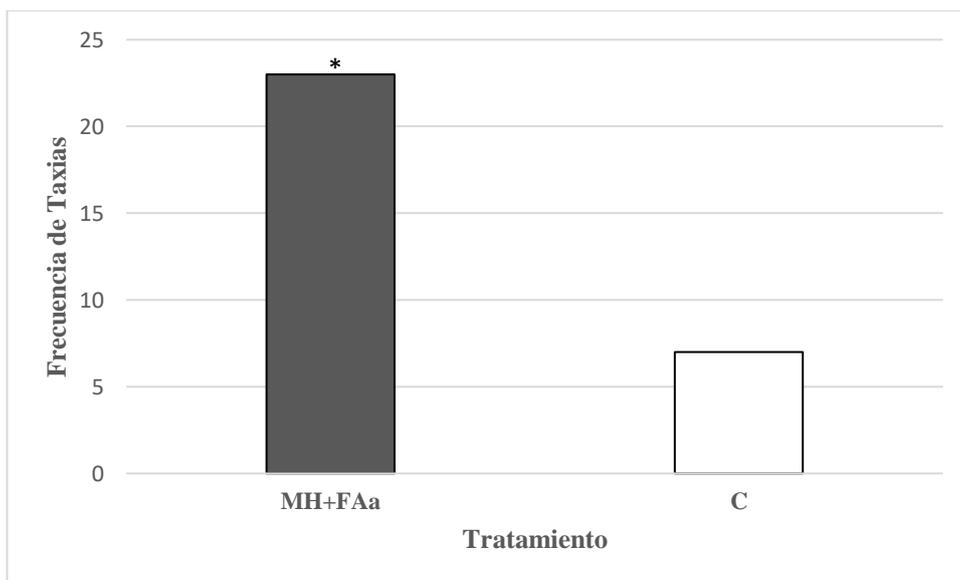


Figura 35. Respuestas positivas de adultos de *Macroductylus mexicanus* hacia el macerado de hojas y flores de *Acaciella angustissima* contra el control. Chi-cuadrada*. Diferencias estadísticas significativas con respecto al control. $n=30$. MH+FAa = macerado de hojas y flores de *A. angustissima*; C= control.



Figura 36. Adulto de *Macroductylus mexicanus* dirigiéndose al estímulo de macerado de hojas y flores de *Acaciella angustissima* en el olfatómetro de vidrio de dos vías en forma de “Y”, empleado en el estudio.

Además de las respuestas positivas, se describieron otros tipos de desplazamientos como (Cuadro 15); “desplazamiento dirigido, pero sin contacto con el estímulo” descrito como un comportamiento previo, en el cual, el coleóptero captaba mediante el flujo de viento los COV provenientes del estímulo, se dirigía a él, pero no había contacto de patas o antenas. Por otro lado, los “desplazamientos aleatorios” se describieron como desplazamientos que no se dirigían hacia ningún brazo del olfatómetro y los “desplazamientos dirigidos, pero sin contacto con el control” son desplazamientos dirigidos, pero sin comportamientos previos a la captación de COV.

Cuadro 15. Porcentaje de respuestas positivas y desplazamientos detectados en la actividad de adultos de *Macroductylus mexicanus* hacia macerados de hojas y flores de *Acaciella angustissima*, desglosados por sexos y por tipo de respuesta en los bioensayos con olfatómetro. n=30.

Tipo de respuesta	Porcentaje de respuestas	
	HMm	MMm
Respuestas positivas	43 a	33 a
Desplazamientos dirigidos, sin contacto con el estímulo	37 a	32 a
Desplazamientos aleatorios	13 b	18 b
Desplazamientos dirigidos, sin contacto con el control	7 b	17 b

HMm= Hembras de *Macroductylus mexicanus*; MMm= Machos de *Macroductylus mexicanus*. Chi-cuadrada, letras distintas representan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre filas con respecto al control. Suma de porcentaje total de cada respuesta en dirección vertical.

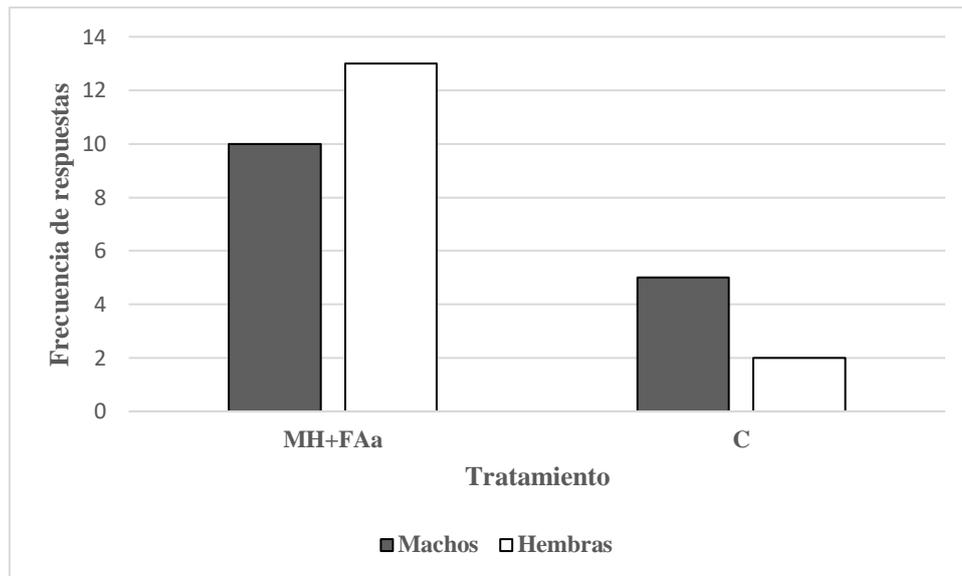


Figura 37. Respuestas de machos y hembras de *Macroductylus mexicanus* hacia los diferentes estímulos. MH+FAa = macerado de hojas y flores de *Acaciella angustissima*; C= control.

8. Discusión

8.1. Descripción secuencial de la interacción entre *M. mexicanus* y *A. angustissima*

La secuencia comportamental descrita en campo coincide con los desplazamientos y movimientos que forman parte de la comunicación química alimentaria de *M. mexicanus* con *A. angustissima* (Pages-Paez y Romero-López, datos no publicados) y en general concuerda con reportes para esta especie con relación a los COV emitidos por sus plantas hospederas (Pages-Paez y Romero-López, 2023).

La liberación y cantidad de COV liberados al ambiente por parte de las plantas confiere información para mutualistas, destacándose como una función ancestral en relación con los organismos que, de una manera más estricta, respondían a la emisión de estas complejas mezclas químicas, al igual que a las diferentes partes de las plantas donde se liberaban (Baldwin, 2010). En este sentido, para el modelo de estudio *M. mexicanus*-*A. angustissima*, posiblemente la mayoría de los COV liberados por la planta pertenecen al grupo más representativo de metabolitos secundarios, los terpenoides (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009), los cuales juegan un papel central en la generación de diversidad química de los COV (Baldwin, 2010). Por otra parte, los adultos de *M. mexicanus* cuentan con quimiorreceptores capaces de captar COV emitidos por sus plantas hospederas, como es el caso de los basicónicos y celocónicos (Romero-López *et al.*, 2017). Esto forma parte

del esquema de comunicación química de la especie en cuestión y aplica para cualquier otra de Coleoptera, refrendando la relevancia filogenética que se desprende desde que los adultos de este orden de insectos comienzan a detectar los COV del ambiente. En la Figura 38 se propone un escenario desde el origen hasta la aparición del primer esquema de comunicación química de los insectos. En una primera etapa “ancestro”, los compuestos químicos que las especies vegetales liberan al ambiente forman parte de su metabolismo primario y en el caso de algunos metabolitos secundarios. Con respecto a la “percepción”, las “señales” que el emisor libera “involuntariamente” provoca un cambio en el comportamiento del receptor, el cual ya cuenta con un sistema sensorial capaz de percibir estas señales. Por último, en la fase de “comunicación”, el emisor funge como tal al producir y enviar “información” a través de “mensajes” dirigidos específicamente al receptor, el cual responde con taxias positivas directas y exclusivas hacia ese emisor (Leonhardt *et al.*, 2016). Este último corresponde a lo que se percibe en la interacción bajo estudio una vez que los adultos de *M. mexicanus* emergen y se dirigen a los arbustos de *A. angustissima* por medio de los COV que emiten al ambiente.

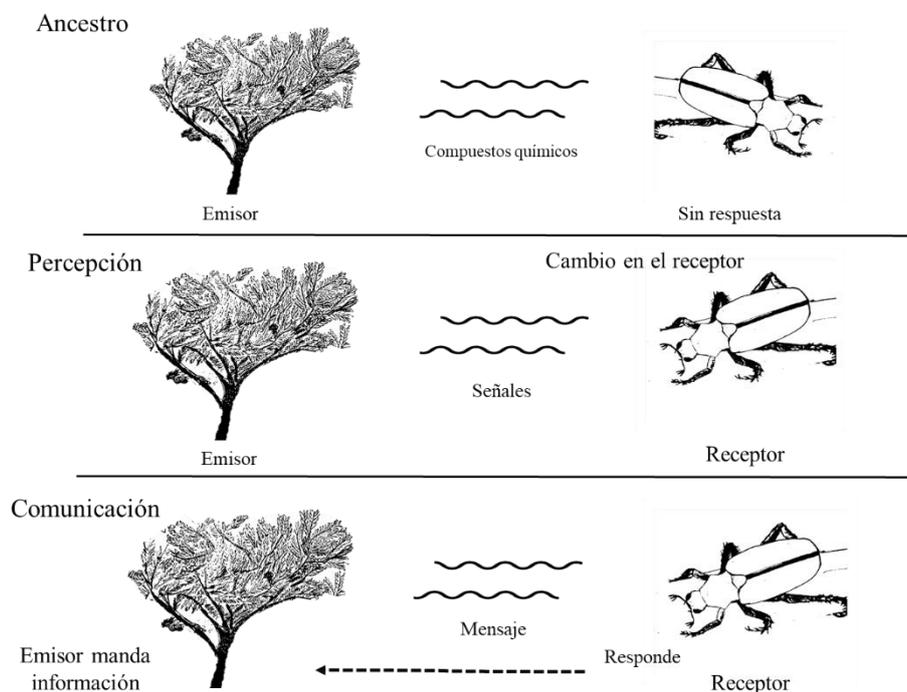


Figura 38. Etapas de la comunicación química de insectos que respalda el esquema que detona la interacción entre adultos de *Macroductylus mexicanus* y los arbustos de *Acaciella angustissima* en su hábitat. Se representa desde la liberación de compuestos por parte de un “emisor” ancestral en el que el “receptor” también ancestral no cuenta aún

con quimiorreceptores antenales. Hasta que un emisor envía “información” a través de “mensajes” provoca respuestas específicas y dirigidas por parte de un individuo receptor dotado de un sistema quimiosensorial recientemente conformado. Modificado de Leonhardt *et al.* (2016).

8.2. Extracción e identificación de COV de hojas y flores de *A. angustissima*

Para el género *Acacia* y especies pertenecientes a esta familia, se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios en hojas, corteza y flores, con la presencia de terpenos, lactonas, xantinas, saponinas, azúcares, entre otros (Seigler, 2003; Daza-Bareño, 2014), siendo consistente a lo descrito para *A. angustissima* (Pages-Paez, 2021).

Para hojas+flores de esta misma especie vegetal, se detectaron doce compuestos; destaca el α -pineno anteriormente reportado exclusivamente en hojas de esta especie como potencial detonador de la atracción y agregación de adultos de *M. mexicanus* (Pages-Paez, 2021) y, por ende, parte de la comunicación química de esta especie, ya que se ha observado en campo que, una vez que emergen los adultos, en inicio las hembras seguido de los machos, se desplazan a estos árboles para posteriormente alimentarse y copular. Del mismo modo, para otras plantas hospederas de *M. mexicanus* (*Q. grahamii* y *Q. sartorii*) se han descrito un total de 14 compuestos de la clasificación de los terpenos, entre ellos el α -pineno (Moctezuma-Vega, 2022) y destacando este mismo por su abundancia en los COV de las hojas de *B. salicifolia*, provocando atracción en adultos de *M. nigripes* (Nieves-Silva y Romero-López, 2016). Caso similar para *H. elegans* con su planta hospedera *N. obliqua*, en la cual se describieron un total de 15 compuestos de naturaleza terpenoide (González-González *et al.*, 2016).

8.3. Bioensayos de confirmación biológica

8.3.1. *In silico* mediante docking molecular

De acuerdo con el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las OBP de los Melolonthidae y de las plantillas seleccionadas, se observaron dos residuos de cisteína altamente conservados en las dieciséis secuencias de OBP, así como la tendencia de conservación de los seis residuos de cisteínas. Es probable que no se presente una alta conservación de todos los residuos de cisteínas en las dieciséis secuencias de OBP, debido a la diferencia de tamaño entre secuencias, y a los organismos empleados como moldes para las estructuras tridimensionales de las OBP. Si bien las OBP molde pertenecen a

grupos de insectos diferentes a los coleópteros Melolonthidae; el fundamento recae en las características de las OBP clásicas y que la selección de estos moldes conserva el porcentaje de identidad en las regiones más favorecidas como lo descrito por Wang *et al.*, (2013) y Sun *et al.* (2018). En el mismo sentido, para los porcentajes de identidad, se observó que ninguno tuvo valores mayores a 50%; destaca el de 41.46% de identidad entre las OBP de *C. pallens* y de *H. oblita*. A pesar de ser menor a 50%, dicha identidad se encuentra conservada en las regiones de interés como los residuos de cisteína y en el sitio de unión donde se desempeñan funciones importantes. Con estos resultados, el modelado de proteínas demuestra ser estable en cuanto a las estructuras tridimensionales, como lo asegura Wang *et al.* (2013) para secuencias de OBP de *H. oblita* y su predicción tridimensional.

Con respecto a lo anterior, el porcentaje de identidad entre secuencias de OBP se corrobora con el dendograma, donde se observa de manera gráfica la similitud entre las secuencias de OBP, mostrando el par de OBP de *C. pallens* y de *H. oblita* unidas mediante un nodo interno.

Para los valores de energía de los acoplamientos entre OBP-COV, las OBP AVM18961.1 de *H. parallela* y AMR98356.1 de *H. elegans* mostraron niveles energéticos mayores al control positivo **Pul** por parte de los compuestos **Bici (2.2.1)** y **Bici [2.2.1]**. De manera similar el **Eug** tuvo valores mayores en dos ocasiones respecto a los demás ligandos. Para los ligandos como el **Sal**, no se observaron valores de acoplamiento mayores a la **Pul**, pero sí con respecto a ligandos como: **Á. ter**, **2. cyclo**, **1,6-Octa**, **Bor** y **Bici (3.1.0)**. El **Sal** y el **Eug** presentaron mayor valor energético en las OBP AZZ86674.1 y AKI84360.1, correspondientes a *H. oblita* y AMR98356.1 de *H. elegans*, siendo consistente con lo descrito por Wei *et al.* (2021) en donde mencionan que el **Sal** es un compuesto crucial en la localización de plantas hospederas como lo son; *Ulmus pumila* (L.) y *Ricinus comunis* (L.) de *H. oblita*. Del mismo modo se ha identificado este compuesto en *Arachis hypogaea* (L.), planta que hospeda a adultos de *H. parallela* y en el cual se ha probado que, en conjunto con otros COV que emite esta planta, provocan la atracción de estos coleópteros (Zhang *et al.*, 2021). En cuanto al **Eug**, se ha reportado como atrayente para adultos de *Maladera matrida* A. hacia volátiles de *A. hypogaea* (Ben-Yakir *et al.*, 1995) y también para adultos de *Popillia japonica* Newman, los cuales respondieron positivamente hacia trampas cebadas con dicho compuesto (Ladd y Klein, 1986). Para las interacciones entre los residuos de aminoácidos de las OBP con los COV prevalecen las interacciones de tipo apolar alifático, seguido de

las aromáticas, polares neutras, con carga negativa y carga positiva. Para todas las OBP, el aminoácido de naturaleza apolar con mayor presencia es la LEU por su porcentaje de presencia en las proteínas siendo el más alto sobre todos los aminoácidos. Después de la LEU, aparecen la ILE, MET, VAL y ALA, a razón de que dichos aminoácidos, junto con la LEU, tienden a agruparse entre sí para estabilizar las interacciones hidrofóbicas y en menor número la PRO y la GLY; esta última por tener una cadena lateral muy corta (Nelson y Cox, 2017). Para estudios *in silico* con *M. mexicanus* se ha observado esta tendencia de agrupación e interacción de los aminoácidos en el acoplamiento de OBP con otros terpenos (Pages-Paez, 2021; Moctezuma-Vega, 2022). Seguimiento de los apolares alifáticos, los aminoácidos aromáticos también interactúan en gran número, mostrando una mayor aparición de la PHE, estableciendo interacciones de tipo π - π con los anillos aromáticos de los compuestos, además de tener un índice hidropático más positivo que el de la TYR y el TRP, mostrando una tendencia relativamente más apolar, dado que la PHE no genera puentes de hidrógeno por la ausencia de átomos electronegativos en su anillo aromático. Esto es contrario a la TYR, la cual cuenta con un grupo hidroxilo y el TRP con un nitrógeno en su anillo indólico, lo cual los hace relativamente más hidrofílicos (Nelson y Cox, 2017).

Para el caso de los aminoácidos cargados negativamente (ASP y GLU) y los cargados positivamente (LYS, HIS y ARG), son las interacciones de menor número, ya que estos, sea cual sea su carga, tienen sus grupos radicales más hidrofílicos. Para los polares neutros, se observa una mayor interacción con la SER y la THR, seguido de la ASN y la GLN. En menor caso la CYS, pues esta se encuentra en menor número que los otros aminoácidos, además de ser hidrofílica por su grupo sulfhidrilo. A pesar de ser de naturaleza polar, las CYS suelen oxidarse generando cistinas, siendo el resultado de dos CYS unidas por un enlace disulfuro, lo que comúnmente llamaríamos “puente de disulfuro” en las OBP. Estos son fuertemente hidrófobos (González-González *et al.*, 2016; Nelson y Cox, 2017; Li *et al.*, 2021; Cilia *et al.*, 2021).

8.3.2 Bioensayos en laboratorio

Se registraron respuestas positivas de los adultos de *M. mexicanus* hacia los macerados de hojas+flores de *A. angustissima* en más del 90% de los bioensayos. Respuestas positivas hacia flores y hojas parecidas se han registrado para esta especie de Melolonthidae, aunque hacia macerados de hojas y macerados de flores de *E. polystachya*, por separado (Morales-Blancas y Romero-López, 2020). Las respuestas y el

comportamiento fueron similares entre machos y hembras, destacando los movimientos de abdomen de manera circular, así como la apertura-movimiento de lamelas previo al estímulo seleccionado, lo cual ya se ha observado en adultos de *P. obsoleta*, pero en este caso realizado en un olfatómetro de cuatro vías (Romero-López y Arzuffi, 2010).

Algunos adultos de *M. mexicanus* no se dirigieron hacia alguno de los estímulos colocados en los brazos del olfatómetro y no mostraron algún tipo de comportamiento previo a la captación de los COV. Posiblemente este tipo de desplazamientos se den por el estado fisiológico del insecto, el cual difiere para cada individuo debido a su actividad y comportamiento previo a los bioensayos (Nehaniv *et al.*, 1999).

Resultados parecidos en olfatómetro pueden encontrarse en dos estudios previos para especies de *Macrodactylus*. En el primer estudio se utilizó un olfatómetro de cuatro y dos vías para evaluar la respuesta de hembras y machos de *M. nigripes* hacia diferentes cebos alimentarios, incluyendo hojas de azumiate y maíz, detectando un número estadísticamente significativo de desplazamientos hacia estos estímulos foliares con respecto al control (Nieves-Silva y Romero-López, 2016). En el segundo se empleó un olfatómetro en forma de “Y” para evaluar la respuesta de adultos de *M. mexicanus* hacia extractos de hojas y flores de “palo dulce”, observando la presencia de respuestas positivas significativas en comparación al control (Morales-Blancas y Romero-López, 2020). En este sentido, para *M. mexicanus* respecto a compuestos químicos, Salgado-Farías (2022) realizó pruebas en olfatómetro de 4 vías sin flujo de viento, observando patrones de comportamiento y respuestas positivas de hembras hacia α -pineno, D-limoneno y ácido hexanoico, y para machos hacia α -pineno y ácido oleico.

Para *M. nigripes* Nieves-Silva *et al.*, (2021) evaluaron su actividad biológica empleando olfatometría, observando respuestas significativas hacia (Z)-3-hexenil acetato en concentraciones diferentes. Respecto a COV bacterianos, Pérez-Estrada, (2020) registró respuestas positivas en machos de *M. mexicanus*, en un olfatómetro de cuatro vías, hacia extractos bacterianos de cámaras genitales de hembras de esta especie. De manera similar Sánchez-Cruz *et al.* (2020) observaron atracción por parte de machos de *Cyclocephala barrerae* Martínez y *Cyclocephala lunulata* Burmeister a COV de bacterias encontradas en las cámaras genitales de las hembras de estas especies, empleando un olfatómetro en forma de “Y”.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre las respuestas positivas de machos y hembras hacia el estímulo, siendo consistente con estudios sobre la quimiorrecepción de los COV, en los cuales se ha determinado que no hay diferencias entre el tipo y número de quimiorreceptores en las lamelas de machos y hembras de *M. mexicanus* (Martínez-Bonilla, 2015), además de evidenciarse una distribución similar de quimiorreceptores en las lamelas de ambos sexos (Romero-López *et al.*, 2017).

9. Perspectivas

Se contribuyó al estudio del esquema de comunicación química de *M. mexicanus* al evidenciar la actividad biológica en la interacción entre los adultos de esta especie y *A. angustissima in silico* y en ensayos con olfatómetro. La relevancia de estudiar las interacciones ecológicas reside en su contribución a la estructuración de un ecosistema y las implicaciones filogenéticas y evolutivas que se desprenden de ello. Además, el estudiar el rol de los COV en esta interacción proporciona información sobre la posible participación benéfica de los adultos de *M. mexicanus* con su planta hospedera. Se trata del primer estudio en el que se aborda simultáneamente la interacción entre una especie de Melolonthidae con su planta hospedera a nivel molecular y a nivel de bioensayos de confirmación biológica con olfatómetro. A partir de ello, se sientan las bases para la síntesis de las OBP propias de *M. mexicanus* y para la validación de los COV bioactivos en campo.

10. Conclusiones

- El α -pineno fue el compuesto más abundante en el perfil químico de hojas+flores de *A. angustissima*
- El Bicyclo (2.2.1) heptano-2-ol,1,3,3-trimetil y el Bicyclo [2.2.1] heptan-3-ona,6,6-dimetil-2-metileno presentaron valores energéticos mayores al control, lo que significa que tienen un acoplamiento mayor a la Pulegona y que probablemente provoque atracción en los adultos de *M. mexicanus*.
- El mayor porcentaje de identidad entre proteínas fue de 41.46 % para las OBP de *C. pallens* y de *H. oblita*, además de mostrar los valores energéticos más negativos con respecto a las demás OBP.

- En las interacciones aminoacídicas se detectaron aa apolares alifáticos y aromáticos, siendo LEU, ILE, VAL y ALA los de mayor presencia en las interacciones hidrofóbicas.
- En las pruebas con olfatómetro, se registraron respuestas positivas estadísticamente significativas por parte de los adultos de *M. mexicanus* hacia los macerados de hojas+flores de *A. angustissima*, con respecto al control.
- En más del 90% de estos insectos, hembras y machos mostraron taxias positivas hacia los COV liberados por hojas y flores.

11. Literatura citada

- Acevedo, F.E. (2020). Ecología química de interacciones entre plantas, insectos y controladores naturales de plagas herbívoras. En P. Benavides Machado y C.E. Góngora (Eds), El Control Natural de Insectos en el Ecosistema Cafetero Colombiano. *Cenicafé*, 106-141.
- Arakaki, N., Wakamura, S., Yasui, H., Sadoyama, Y. and Kishita, M. (2003). Sexually differentiated functions of female produced pheromone of the black chafer *Holotrichia loochooana loochooana* (Sawada) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chemoecology*, 13: 183-186.
- Arce-Pérez, R. y Morón, M.A. (2000). Taxonomía y distribución de las especies de *Macrodactylus Latreille* (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), 79, 123–239.
- Arce-Pérez, R. y Morón, M.A. (2012). Las especies de escarabajos *Macrodactylus* de Guatemala (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Biodiversidad*, 2: 193-196.
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, E.C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3):19-145.
- Ávila-Cervantes, R. A., Mancilla-Montelongo, G., González-Pech, P. G., Sandoval-Castro, C. A., y Torres-Acosta, F. (2019). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrobiencias*, 12(1).
- Baldelomar, M., Lacerda, Viana, M. y Jane, Telles, F. (2018). El rol de los compuestos orgánicos volátiles florales en las interacciones planta-insecto. *Oecología australis*, 22(4): 348-361.
- Baldwin, I.T. (2010). Plants volatiles. *Current Biology*, 20(9):392-397.
- Benítez-Herrera L.N., y Romero-López, A.A. (2014). Dimorfismo sexual en “melolontidos” (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) con mazas antenales mayores en machos que en hembras. *Entomología Mexicana*, 13(2), 380-386.
- Ben-Yakir, D., Bazar, A., and Chen, M. (1995). Attraction of *Maladera matrida* (Coleoptera: Scarabaeidae) to eugenol and other lures. *Journal of Economic Entomology*, 88(2): 415-420.
- Boege, K y Del Val, E. (2011). Bichos vemos relaciones no sabemos. Diversidad e importancia de las interacciones bióticas. *Ciencias*, 102: 5-11.
- Cantúa-Ayala, J.A., Flores-Olivas, A. y Valenzuela-Soto, J.H. (2019). Compuestos orgánicos volátiles de plantas inducidos por insectos: Situación actual en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3): 729- 742.

- Cherman, M.A. y Morón, M.A. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1): 201-220.
- Cilia, G., Marzoli, F., Cardaio, I., Ellis, J. D. and Nanetti, A. (2021). Identification of odorant-binding proteins (OBPs) in *Aethina tumida*. *Bulletin of Insectology*, 74(1), 79-85.
- Cortez, V. (2013). Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. *Cuadernos de Biodiversidad*, 16-21.
- Daza-Bareño, A. Z. (2014). Estudio fitoquímico de la corteza de *Acacia farnesiana* utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la malaria. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Dicke, M., and Sabelis, M.W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional Ecology*, 2(2):131-139.
- Fernández-Sánchez, F., Marín-Morán, J.E., Teixeira-Pinto, Z., Del Carvalho-Queiroz, M.M. y Escalona-Arranz, S.C. (2013). Evaluación de las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (droga seca). *Revista Cubana de Química*, 25(1): 100-108.
- Flores-Hernández, J. (2011). Listado preliminar de mariposas diurnas de Cholula. *Elementos*, 83:25-28.
- Font-Maté, C. (2017). Modelado molecular como herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos que interaccionan con proteínas. Tesis de licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
- García-Canales, S.C., y Romero-López, A.A. (2017). Respuesta de machos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae) en pruebas de olfatómetro y extracción de compuestos con posibles implicaciones químico-ecológicas. *Ecología y Comportamiento*, 4: 443-449.
- González-González, A., Palma-Millanao, R., Yáñez, O., Rojas, M., Mutis, A., Venthur, H., Quiroz, A. and Ramírez, 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):1-15.
- Gutiérrez, M.C. y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter*, 122: 35-41.
- Hansson, B. S., Larsson, M. C., & Leal, W. S. (1999). Green leaf volatiles detecting olfactory receptor neurons display very high sensitivity and specificity in a scarab beetle. *Physiological Entomology*, 24(2), 121-126.
- Heath, J.J., Williams R.N., and Phelan, P.L. (2001). High light intensity: a critical factor in the wind-tunnel flight of two scarabs, the rose chafer and Japanese beetle. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 419-429.
- Ikan, R. (2008). (Ed.). Selected topics in the chemistry of natural products. *World scientific*.
- Imai, T., Maekawa, M., Tsuchiya, S., and Fujimori, T. (1998). Field attraction of *Hoplia communis* to 2-phenylethanol, a major volatile component from host flowers, *Rosa* spp. *Journal of Chemical Ecology*, 24(7): 1491-1499.
- Kim, J.Y. and Leal, W.S. (2000). Ultrastructure of pheromone-detecting *sensillum placodeum* of the Japanese beetle *Popillia japonica* Newmann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Arthropod Structure and Development*, 29:121-128.
- Ladd, T.L., and Klein, M.G. (1986). Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) response to color traps baited with phenethyl propionate + eugenol + geraniol (3:7:3) and japonilure. *Journal of Economic Entomology*, 79(1):84-86.
- Leonhardt, S.D., Menzel, F., Nehring, V., and Schmitt, T. (2016). Ecology and evolution of communication in social insects. *Cell*, 164(6): 1277-1287.
- Li, H., Zhang, A., Chen, L.Z, Zhang, G., Wang, M.Q. (2014). Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of *Batocera horsfieldi* and expression pattern of putative odorant binding proteins. *Journal of Insect Science*, 14(57).

- Li, Y.N., Hao, E.H., Li, H., Yuan, X.H., Lu, P.F. and Qiao, H.L. (2021) Computational interaction analysis of *Sirex noctilio* odorant-binding protein (SnocOBP7) combined with female sex pheromones and symbiotic fungal volatiles. *Agronomy*, 11, 2461.
- López, S.N., Viscarret, M.M. y Botto, E.N. (1999). Selección de la planta hospedera y ciclo de desarrollo de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae) sobre zapatillo (*Cucurbita maxima* Duch.; Cucurbitales: Cucurbitaceae) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.; Tubiflorales: Solanaceae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 25:21-29.
- López-Luengo, T.L. (2004). Los aceites esenciales: aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(7), 88-91.
- Martínez-Bonilla, O.K., Romero-López, A.A., y Benítez-Herrera, L.N. (2015). Morfometría corporal y antenal de *Macrodactylus mexicanus* y *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y descripción de sus sensilas lamelares. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Entomología*, 1:81-87.
- Moctezuma-Vega B. X. y Romero-López A. A. (2020). Patrones de comportamiento de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) sobre hojas de encinos. Memorias del 4to Congreso Nacional de Investigación Interdisciplinaria. Ciudad de México, México, 150-152.
- Moctezuma-Vega, B. X. (2022). Interacción entre adultos de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) con *Quercus grahamii* y *Quercus sartorii* (Fagaceae), mediada por volátiles. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Morales-Blancas, G.I. y Romero-López, A.A. (2020). Observación del comportamiento de “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) en campo y laboratorio que evidencian atracción de estos hacia flores y brotes de su planta hospedera. *Entomología Mexicana*, 7:279-285.
- Morales-Blancas, G.I., y Romero-López, A.A. (2019). Comportamiento de adultos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, 1855 (Coleoptera: Melolonthidae) en su acercamiento a árboles de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. 1892 (Fabaceae). *Entomología Mexicana*, 6: 352-357.
- Morón, M.A. (2001). Las especies de *Phyllophaga* (s.str.) del grupo rugipennis (Coleoptera: Melolonthidae). *Sociedad Entomológica Aragonesa*, 3: 19-34.
- Morón, M.A., Nogueira, G., Rojas-Gómez, C.V. y Arce-Pérez, R. (2014). Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 298-302.
- Mutis, A., Palma, R., Parra, L., Alvear, M., Isaacs, R., Morón, M. and Quiroz, A. (2014). Morphology and distribution of sensilla on the antennae of *Hylamorpha elegans* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae). *Neotropical Entomology*, 43: 260–265.
- Nehaniv, C. L., Dautenhahn, K. and Loomes, M. J. (1999). Constructive biology and approaches to temporal grounding in postreactive robotics. *In Sensor Fusion and Decentralized Control in Robotic Systems II, Vol. 3839: 156-167. SPIE.*
- Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2017). Lehninger principles of biochemistry (7th ed.). W.H. Freeman.
- Nieves-Silva, E. y Romero-López, A.A. (2016). Olfatómetro portátil para el estudio de interacciones entre “frailecillos” (Coleoptera: Melolonthidae) y plantas. *Entomología mexicana*, 3: 516-522.
- Nieves-Silva, E. and Romero-López, A.A. (2019). Chemical profile of the volatiles of *Baccharis salicifolia* (Astereceae) and interaction with *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Agronómica*, 68 (3): 222-227.
- Nieves-Silva, E., Aragón-García, A., Robledo-Quintos, N.R., Romero-López, A.A. y Pérez-Torres, B.C. (2021). Respuesta fisiológica y comportamental de *Macrodactylus nigripes* a compuestos volátiles del durazno. *Southwestern Entomologist*, 46 (3): 773-780.

- Oviedo, C.D. y Orochena, S.A. (2011). Métodos de extracción de aceites esenciales, comparación y empleo en productos de perfumería. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias y Tecnología, UNAN.
- Pages-Paez N.Y. (2021). Perfil químico de volátiles en hojas de *Acaciella angustissima* (Mill) Britton & Rose, planta hospedera de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.
- Pages-Paez, N.Y. y Romero-López, A.A. (2023). Interacción insecto-planta mediada por compuestos orgánicos volátiles: el caso de coleópteros Melolonthidae y acacias distribuidos en Puebla. Capítulo de libro, en prensa.
- Pérez-Estrada, F.J. (2020). Bacterias detectadas en el interior de la cámara genital de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) y su posible participación en la producción de atrayentes. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.
- Pelosi, P. and Maida, R. (1995). Odorant-binding proteins in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111(3): 503-514.
- Pérez-Estrada, F.J. (2020). Bacterias detectadas en el interior de la cámara genital de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) y su posible participación en la producción de atrayentes. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.
- Potter, D.A. and Held, D.W. (2002). Biology and management of the japanese beetle. *Annual Review of Entomology*, 47:175-205.
- Qu, Y., Liu, X., Zhao, X., Quin, J., Cao, Y., Li, K., Zhou, J.J., Wang, S. and Yin, J. (2021). Evidence of the involvement of a plus-c odorant-binding protein HparOBP14 in host plant selection and oviposition of the scarab beetle *Holotrichia parallela*. *Insects*, 12,430.
- Reinecke, A., Ruther, J. and Hilker, M. (2002). The scent of food and defense: green leaf volatiles and toluquinone as sex attractant mediate mate finding in the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *Ecology Letters*, 5: 257- 263.
- Reyes-Prado, H., Pino-Moreno, J.M., Robledo, N., Sánchez-Cruz, A. y Varela-Hernández, F. (2019). Variación temporal de insectos visitantes sobre flores de *Acacia cochliacantha* Humb. y Bonpl. ex Willd, 1806 (Fabaceae) e identificación de sus volátiles florales. *Sistemática y Morfología*, 6: 587–593.
- Rico-Alvarado, D. y Gómez-Acevedo, S. (2022). Desarrollo floral de *Acaciella angustissima* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Acacieae). *Botanical Sciences*, 100(2): 412-422.
- Rico-Arce, M. de L. and Bachman, S. (2006). A taxonomic revision of *Acaciella* (Leguminosae, Mimosoideae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 63(2): 189–244.
- Rincón-Rosales, R. y Gutiérrez-Miceli, F. A. (2008). Características biológicas de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose en su hábitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. *Agrociencia*, 42(1), 129-137.
- Rincón-Rosales, R. y Gutiérrez-Miceli, F.A. (2008). Características biológicas de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose en su hábitat natural y evaluación de su potencial cortical en Chiapas, México. *Agrociencia*, 42:129-137.
- Romero-López, A.A. (2012). Uso de feromonas sexuales para el conocimiento y manejo de los “ensambles gallinas ciega” en México. *Interciencia*, 37(7): 558-564.
- Romero-López, A.A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: a diez años de distancia. *Dugesiana*, 23(1): 59-73.
- Romero-López, A.A., Arzuffi, R. y Morón, M.A. (2005). Feromonas y atrayentes sexuales de coleópteros Melolonthidae de importancia agrícola. *Folia Entomológica Mexicana*, 44(2): 233-245.
- Romero-López, A.A., Arzuffi, R., Valdez, J., Morón, M.A., Castrejón-Gómez, V. y Villalobos, F.J. (2004). Sensory organs in the Antennae of *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 96(6): 1306-1312.

- Romero-López, A. A., Aragón, A. y Arzuffi, R. (2007). Estudio comparativo del comportamiento sexual de cuatro especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae). *Memorias del...Congreso Nacional de Entomología...*6, 275- 281.
- Romero-López, A.A., Benítez-Herrera, L.N., Martínez-Bonilla, O.K., Yanes-Gómez, G. and Aragón-Sánchez, M. (2017). Comparative study of distribution of antennal chemoreceptors of *Macroductylus* of Mexico. *Southwestern Entomologist*, 42(1):111-119.
- Romero-López, A.A., Morón, M.A. and Valdez, J. (2010). Sexual dimorphism in antennal receptors of *Phyllophaga ravidata* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Neotropical Entomology*, 39(6): 957-966.
- Ruther, J., Reinecke, A., Thiemann, K., Tolasch, T., Francke, W. and Hilker, M. (2000). Mate finding in the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. *Physiological Entomology*, 25: 172-179.
- Ruther, J., Reinecke, A., Tolasch, T. and Hilker, M. (2001). Make love not war: a common arthropod defense compound as sex pheromone in the forest cockchafer *Melolontha hippocastani*. *Oecologia*, 128: 44-47.
- 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-1-ol as a sexual kairomone. *Ecological Entomology*, 27: 76-83.
- Salgado-Farias, F. (2022). Respuesta de adultos de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Melolonthidae) a sustancias químicas incluidas en microcápsulas: modelado y bioensayos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP.
- Sánchez-Cruz, A., Robledo, N., Rosete-Enríquez, M. and Romero-López, A.A. (2020). Attraction of adults of *Cyclocephala lunulata* and *Cyclocephala barrerai* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) towards bacteria volatiles isolated from their genital chambers. *Molecules*, 25(19): 4430.
- Seigler, D.S. (2003). Phytochemistry of Acacia-sensu lato. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(8), 845-873.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 355-363.
- Serapio-Jerónimo, M.A., Guzmán-Mendoza, R., Herrera-Fuentes, M.C. y Orendain-Méndez, J. (2014). Ciclo de vida y comportamiento de *Macroductylus nigripes* Bates, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) en Ixtlahuaca, México. *Entomología Mexicana*, 1: 710-714.
- Soto-Vásquez, M. R., Alvarado-García, P. A., Rosales-Cerquin, L. E., Rengifo-Penadillos, R. A. y Sagástegui-Guarniz, W. A. (2019). Composición química y efecto del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* (Verbenaceae) en los niveles de estrés académico de estudiantes universitarios. *Arnaldoa*, 26 (1):381-390.
- Sun, J.S., Xiao, S., and Carlson, J.R. (2018). The diverse small proteins called odorant-binding proteins. *Open Biology*, 8: 180208.
- Tlapa-Almonte, M. (2005). Conservación y restauración del Cerro Zapotecas. *Elementos*, 57: 39-45.
- Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J. y Vivas-Reyes, R. (2013). Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Revista Colombiana de Química*, 42(1): 1-8.
- Wang, B., Guan, L., Zhong, T., Li, K., Yin, J., and Cao, Y. (2013). Potencial cooperations between odorant-binding proteins of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Plos One*, 8(12).
- Wei, H.S., Duan, X.H., Li, K.B., Zhang, S., Wei, Z.J. and Yin, J. (2019). The mechanism underlying OBP heterodimer formation and the recognition of odors in *Holotrichia oblita* Faldermann. *International Journal of Biological Macromolecules*.

- Wei, H.S., Qin, J.H., Cao, Y.Z., Li, K.B. and Yin, J. (2021). Two classic OBPs modulate the responses of female *Holotrichia oblita* to three major ester host-plant volatiles. *Insect Molecular Biology*, 30: 390-399.
- Yarden, G. and Shani, A. (1994). Evidence for volatile chemical attractants in the beetle *Maladera matrida* Argaman (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Chemical Ecology*, 20(10): 2673-2685.
- Zhang, M., Cui, Z., Zhang, N., Xie, G., Wang, W. and Chen, L. (2021). Electrophysiological and behavioral responses of *Holotrichia parallela* to volatiles from peanut. *Insects*, 12(2): 158.
- Zhuang, X., Wang, Q., Wang, B., Zhong, T., Cao, Y., Li, K. and 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.

Glosario

aa-aminoácido

COV-compuesto orgánico volátil

CG-EM-cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

cm-centímetro

g-gramo

h-hora

Kcal/mol-kilocaloría sobre mol

m-metro

mm-milímetro

ml-mililitro

OBP-proteína de unión a olor

SPME-microextracción en fase sólida, por sus siglas en inglés

°C-centígrado

μm-micrómetro

°C/min-centígrado sobre minuto

ml/min-mililitro sobre minuto