

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS

Determinación de Carbohidratos en Extractos Cítricos y su Utilización en la Alimentación de *Diaphorina citri*, Vector de Huanglongbing



Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2014

Repositorio Institucional UNISON



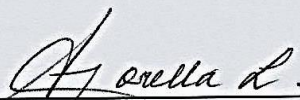
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



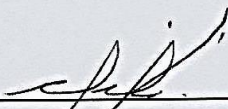
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

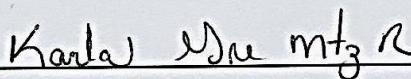
Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Alma Carolina Gálvez Iriqui**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico en Alimentos**.



Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño
Director de tesis



M.C. Gralia Orduño Fragoza
Secretario



M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson
Vocal



M.C. Socorro Herrera Carbajal
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a la **Universidad de Sonora** y a mis maestros por brindarme las herramientas necesarias para poder culminar mis estudios universitarios.

A mi **familia** por su amor y cariño, además de su apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

A la **Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño** por su valiosa colaboración en la dirección de la presente tesis, por su dedicación, paciencia y principalmente por permitirme ser parte de este proyecto.

Al **Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)** por permitirme realizar las actividades experimentales del presente trabajo. A **M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson** por guiarme y dejarme realizar mis actividades en el laboratorio de Biopolímeros del CIAD, además a los integrantes del laboratorio, los cuales hicieron más agradable mi estancia allí.

A todos los miembros del jurado por su dedicación y compromiso para la correcta realización de mi trabajo de tesis profesional.

Al Q.A **Daniel Muñoz Gutiérrez** por brindarme su amistad, paciencia y por todo su apoyo a lo largo del último semestre de la carrera y durante la realización de este trabajo.

A los Q.B.C **Rhene Fabiola Tavares Valdez** y **Jesús Aarón Barragán Ríos** por apoyarme, aconsejarme, hacerme reír y brindarme su amistad a lo largo de estos 5 años.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres **Alma Leticia Iriqui Mayboca** y **José Octavio Gálvez Valenzuela** porque sin su cariño y apoyo no hubiera sido posible. También a mis hermanas **Denisse Gisel Gálvez Iriqui** y **María José Gálvez Iriqui**. Y en especial a **Lillian Iriqui Mayboca**, la cual me ha brindado su apoyo de infinitas maneras y también ha sido un ejemplo a seguir para mí durante todos estos años.

¡Los quiero!

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS.....	x
OBJETIVOS.....	xi
General.....	xi
Particulares.....	xi
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
<i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.....	4
Ciclo de vida.....	5
Daños causados por el modo de alimentación <i>D. citri</i> K.....	7
Control químico y biológico.....	9
<i>Candidatus Liberibacter sp.</i>	10
Daños a los cítricos causados por la infección de <i>C. Liberibacter sp.</i>	11
Constituyentes químicos de las plantas.....	12
Carbohidratos en las plantas.....	13
Clasificación de carbohidratos en las plantas.....	15
Estructurales.....	15
No estructurales.....	16
Carbohidratos en la hemolinfa de los insectos.....	19

Metabolitos secundarios de las plantas.....	21
Constituyentes de los cítricos.....	24
Análisis de los metabolitos de plantas.....	25
Extracción de los constituyentes de las plantas.....	26
Análisis de carbohidratos en plantas.....	27
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Obtención de material vegetal.....	29
Obtención de extractos por maceración con solventes.....	30
Determinación de carbohidratos en los extractos por HPLC.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Identificación de carbohidratos por HPLC.....	32
Identificación de carbohidratos en los brotes vegetativos de cítricos.....	37
Identificación de carbohidratos en fracciones de brotes de toronja.....	44
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Tiempos de retención, área y concentración de estándares individuales.....	33
2. Carbohidratos identificados en brotes de cítricos de 3 – 4 cm y su concentración (mg/g de extracto).....	38
3. Carbohidratos identificados en brotes de cítricos de 5 cm y su concentración (mg/g de extracto).....	39
4. Carbohidratos identificados en extracto acuoso y metanólico de brotes de toronja de 3-4 cm (mg/g de extracto).....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Diaphorina citri</i> K.....	6
2. Huevos eclosionando y ninfas en diferentes etapas de crecimiento.....	7
3. Psílido adulto de <i>Diaphorina citri</i> K. alimentándose.....	8
4. Ninfas productoras de túbulos cerosos.....	9
5. Desarrollo de fumagina.....	9
6. (a) Hojas distorsionadas aptas para ovoposición, (b) Brotes de hojas malformados, (c) Brotes con malformación torcidos.....	9
7. (a) Hoja con moteado característico asimétrico y nervaduras engrosadas, (b) Árbol infectado con síntomas de defoliación.....	12
8. (a) Corte longitudinal de fruto con HLB, (b) Axis deforme y engrosado con semillas abortadas y coloración café, (c) Inversión del color amarillo por verde.....	13
9. Diferencias entre hojas con deficiencias de minerales y HLB.....	13
10. Ecuación que muestra la síntesis de glucosa en el proceso de fotosíntesis.....	14
11. Disacáridos: Isomaltosa, malosa, lactosa, sacarosa y trehalosa.....	15
12. Estructura básica del almidón (izquierda) y la celulosa (derecha).....	16
13. (a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa, (b) Estructura química de la amilopectina.....	20
14. Vía TPS/TPP de biosíntesis de trehalosa, más frecuente encontrada en bacterias, hongos, plantas e insectos. Vía de degradación de la trehalosa.....	22
15. Esqueleto base de los Flavonoides C6-C3-C6.....	25

16. Principales flavonoides en vegetales.....	25
17. Flavonoides presentes en cítricos.....	26
18. Cromatograma HPLC del estándar de glucosa y su estructura química.....	36
19. Cromatograma del estándar de arabinosa y su estructura química.....	36
20. Cromatograma del estándar de manitol y su estructura química.....	36
21. Cromatograma del estándar de inositol y su estructura química.....	37
22. Cromatograma del estándar de fructosa y su estructura química.....	37
23. Cromatograma del estándar de sacarosa y su estructura química.....	37
24. Cromatograma del estándar de ácido galacturónico y su estructura química...	38
25. Cromatograma del estándar de xilosa y su estructura química.....	38
26. Cromatograma del estándar de galactosa y su estructura química.....	38
27. Cromatograma del estándar de manosa y su estructura química.....	39
28. Cromatogramas HPLC de brotes de toronja y naranja de 3 - 4 cm con carbohidratos identificados.....	42
29. Cromatogramas HPLC de brotes de limón de 3 - 4 con carbohidratos identificados.....	43
30. Cromatogramas HPLC de brotes de naranja de 5 cm con carbohidratos identificados.....	44
31. Cromatograma HPLC de brotes de limón de 5 cm con carbohidratos identificados.....	45
32. Cromatograma HPLC de la fracción acuosa y metanólica de los brotes de toronja de 3 – 4 cm con carbohidratos identificados.....	47

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A

	Página
Importancia de la citricultura en México.....	55
Factores que afectan la producción de cítricos.....	56
Enfermedades de los cítricos.....	57
Enverdecimiento de los cítricos.....	57
Huanglongbing.....	57
Principales estados de México infectados con HLB.....	58

OBJETIVOS

General

Determinar la composición de carbohidratos en los extractos de brotes vegetativos de cítricos por HPLC y evidenciar su utilización en la alimentación del insecto *Diaphorina citri* durante su ciclo de vida.

Particulares

- Obtener los extractos crudos de brotes tiernos de cítricos de la región utilizando los métodos de extracción con solventes.
- Determinar los carbohidratos presentes en los extractos cítricos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Evidenciar la utilización de los carbohidratos como fuente de alimentación del insecto *Diaphorina citri* Kuwayama, plaga de los cítricos.

RESUMEN

Con la finalidad de entender de una manera más amplia la ecología del insecto *Diaphorina citri* Kuwayama, en este trabajo se relaciona el comportamiento de alimentación del insecto durante su ciclo de vida con la utilización de carbohidratos de la savia presentes en los extractos de brotes vegetativos menores a 5 cm de los cítricos. Al integrar a su metabolismo los carbohidratos y diferentes nutrientes contenidos en la savia, el insecto establece un equilibrio entre ellos, lo cual optimiza su crecimiento y desarrollo en el marco específico de las condiciones nutricionales.

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae), es el principal vector de la enfermedad de Huanglongbing (HLB), “dragón amarillo o enverdecimiento de los cítricos” al transmitir la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* a las plantas de la familia de las rutáceas. Actualmente este insecto es la plaga más importante de los cítricos a nivel mundial, constituyendo una amenaza directa para estas plantas.

La composición de carbohidratos presentes en los brotes vegetativos de los cítricos de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), limón mexicano (*Citrus aurontifolia* Swingle L.) y toronja (*Citrus x paradisi* Macfad.), se determinó en los extractos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis de los cromatogramas y su comparación con una serie de 10 estándares de carbohidratos comunes en plantas, mostró a glucosa y galactosa, como los principales azúcares presentes en los extractos. Además fueron identificados arabinosa, fructosa, sacarosa e inositol; todos ellos son obtenidos de la savia, que tanto ninfas e insectos adultos succionan de las plantas hospedero, en este caso los cítricos.

INTRODUCCIÓN

En su hábitat natural, las plantas reciben diferentes estímulos bióticos y abióticos simultáneamente, a los que responden. Las plantas terrestres son la fuente de alimento para una cantidad estimada en más de un millón de especies de insectos de diferentes grupos taxonómicos, que usan varias estrategias de alimentación para obtener los nutrientes en cada parte de la planta, superando las barreras de defensa de éstas, lo que les permite además alimentarse, crecer y reproducirse en su planta huésped (Mello y Silva-Filho, 2002; Camarena 2009). En general, hay dos categorías de insectos herbívoros: los insectos chupadores que además de los daños directos que provocan son capaces de transmitir virus y bacterias depositándolos directamente en el tejido vascular, lo que permite su rápida distribución por la planta; y los insectos masticadores que raramente transmiten virus, pero dejan el tejido vegetal dañado y expuesto a ataques de hongos y bacterias necrótrofas (Montoliu, 2010).

Plantas e insectos son sólo algunos de los organismos vivos que continuamente están interactuando en una forma compleja. En cada una de estas interacciones tanto el insecto como la planta, reciben y envían señales químicas que determinan el éxito de la interacción (Camarena, 2009) y miden la disponibilidad de la planta como una fuente de alimento (Baldwin y Derck, 2010; Hern y Dorn, 2004; Vallat y Dorn, 2005; Casado *et al.*, 2008).

La selección de una planta, bien sea para alimentación o como hospedero, es mediada por la atracción ejercida sobre el insecto por el olor o color de las flores y/o las distintas estructuras de ésta. Las señales odoríferas son liberadas por los osmofóros, estos son órganos glandulares que se sitúan normalmente en los pétalos de las flores, emiten distintos aromas agradables o desagradables. En cuanto a las señales luminosas, el color y forma son importantes. Además, como cualquier ser vivo, los insectos tienen necesidades alimenticias muy concretas como son: carbohidratos (alimentos energéticos), proteínas y vitaminas (para la construcción y renovación de tejidos) y lípidos. Generalmente los insectos adultos tienen mayor necesidad de carbohidratos, mientras que las crías, larvas y ninfas tienen necesidades más bien de proteínas.

En las plantas los carbohidratos son sintetizados de forma natural a través del proceso de fotosíntesis para cubrir los requerimientos de energía. En las hojas verdes se une el dióxido

de carbono del aire y el agua del suelo, los cuales en presencia de clorofila actúan como catalizadores incorporando la luz solar para formar glucosa, un carbohidrato elemental. El oxígeno producido es liberado a la atmósfera. Los carbohidratos sintetizados en las hojas sirven de base para formar otros carbohidratos más complejos. Algunos carbohidratos pueden tener una función estructural ya que forman parte de la pared celular en las plantas, como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. Otros carbohidratos son no estructurales en su función y sirven de reserva en las plantas. El principal carbohidrato no estructural es el almidón, también los fructosanos, glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa caben en esta categoría (Melo y Cuamatzi, 2007). Estos mismos carbohidratos son aprovechados por los insectos herbívoros en su alimentación y los transforman en otros compuestos que utilizan como fuente de energía.

En el presente trabajo se pretende establecer la relación entre el comportamiento alimentario del insecto *Diaphorina citri* durante su ciclo de vida y la utilización de carbohidratos de la savia presentes en los extractos de brotes vegetativos de los cítricos naranja, limón y toronja, menores a 5 cm.

ANTECEDENTES

La persistencia del insecto en las plantas a pesar de los esfuerzos realizados para su erradicación ha dado pie a buscar nuevas rutas o alternativas acerca de cómo éste desarrolla su potencial biótico, es decir la capacidad que tiene el insecto de reproducirse y sobrevivir en condiciones adversas mediante el desarrollo de estrategias o mecanismos específicos para contrarrestar esas condiciones.

El potencial de reproducción incluye la relación de sexos (macho/hembra) y la duración de su ciclo biológico y por otro lado su potencial de supervivencia que incluye el desarrollo de su capacidad nutricia y de protección. En cuanto al potencial de nutrición, visto como la capacidad que tienen los insectos para aprovechar diferentes fuentes como alimento, tenemos: insectos polívoros los cuales se alimentan de muchas plantas; insectos oligóvoros, que se alimentan de plantas muy relacionada taxonómicamente (de una misma familia) por ejemplo; *Diaphania spp.* plaga de cucurbitáceas, *Pieris rapae*, plaga de crucíferas y *Diaphorina citri*, plaga de los cítricos; y los insectos específicos o monóvoros porque se alimentan de una sola especie de planta entre ellos *Acrobasis nuxvorella* conocido como el gusano barrenador de la nuez, porque ataca al nogal pecanero (*Carya illinoensis*), *Anthonomus grandis* (gorgojo del algodón) y *Anthonomus eugenii*, principal plaga de la pimienta (*Capsicum spp.*).

En cuanto al desarrollo del potencial de protección este permite a los insectos la capacidad para evadir situaciones adversas y asegurar el apareamiento, protección de la descendencia, construcción de estructuras protectoras, producción de venenos, secreciones repugnantes, mimetismo protector y migración. Es decir, los insectos evaden o encuentran estrategias de resistencia a un conjunto de factores ambientales que se oponen a la manifestación de su potencial biótico, tanto factores físicos como: temperatura, luz, humedad, viento etc., o factores bióticos, como: alimento, competencia intraespecífica (ocurre entre insectos de la misma especie y se da sobre todo por alimento, sexo y espacio) y competencia o relaciones interespecíficas (se da entre individuos de diferente especie, mutualismo, comensalismo, competencia, explotación, ejemplos: la depredación y el parasitismo).

Muchos insectos seleccionan una variedad de alimentos que difieren en el contenido de nutrientes, y el equilibrio en la ingesta de diferentes nutrientes está en proporción de satisfacer sus requisitos para un objetivo en particular. Este comportamiento de alimentación, a veces

llamado autoselección dietética, tiene importante significado ecológico para entender cómo los insectos interactúan con plantas y otras fuentes de alimentos en su entorno. Un equilibrio de diferentes nutrientes optimiza el crecimiento y el desarrollo en el marco específico de las condiciones nutricionales (Waldbauer y Bhattacharya 1988).

En diversos experimentos que emplean dietas con composición químicamente definidas de diferentes nutrientes, se ha demostrado las relaciones de ingesta óptima de proteínas y carbohidratos de una variedad de insectos en diferentes etapas de desarrollo en virtud de una variedad de condiciones nutricionales (Waldbauer y Bhattacharya 1988).

La regulación de la conducta de alimentación y la ingesta de nutrientes implica una compleja interacción de los procesos fisiológicos que integran la información relativa a la composición de nutrientes de los alimentos y el estado nutricional de los insectos; Simpson y Abisgold, 1995. Los estudios con varios insectos establecen que la alimentación está influenciada por los quimiorreceptores a través del sistema nervioso central en respuesta a la presencia de nutrientes en los alimentos. Además, la sensibilidad de estos receptores está influenciada por el estado nutricional reflejado en la composición de la hemolinfa. Diversos estudios sobre la composición de la hemolinfa de diferentes insectos establecen que hay ciertos niveles de aminoácidos, trehalosa y glucosa, los cuales son obtenidos a través de dieta (Champam y Boer, 1995).

DIAPHORINA CITRI KUWAYAMA

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), es un insecto que parasita árboles de la familia de las rutáceas como *Citropsis*, *Murraya* y especialmente el género *Citrus*. Este insecto amenaza directamente a las plantas a través de su forma de alimentación, ya que al poseer un aparato bucal succionador, inserta estiletes especializados entre las células para establecer un sitio de alimentación en el floema, de esta forma obtiene de la savia de la planta sus diferentes nutrientes principalmente proteínas y carbohidratos, cubriendo así sus requerimientos de alimentación, causando el debilitamiento de la planta, además de ser vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., agente causal de la devastadora enfermedad de los cítricos, Huanglongbing (OEPP/EPPO, 2005; Grafton-Cardwell *et.al.*, 2006).

Ciclo de Vida

El ciclo de vida de este insecto comprende tres etapas de desarrollo, huevos, cinco estadios de ninfa y adulto, logrando diseminar la infección a partir de su tercer estadio de ninfa. El poder reconocer y/o diferenciar entre cada uno de los estadios de su ciclo de vida brinda una herramienta valiosa en la detección de este insecto (Figura 1) (Hall, 2012).

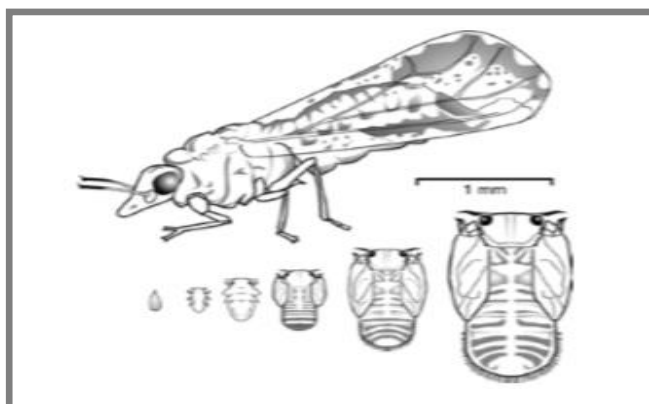


Figura 1. Ciclo de Vida de *Diaphorina citri* K.

Fuente: Grafton-Cardwell *et al.*, 2006.

Huevos. Los huevecillos son de color amarillo ligero cuando están muy jóvenes pero al madurar presentan un color amarillo brillante, pueden llegar a medir entre 0.15 mm a 0.31 mm; por lo general tienen forma de almendra y se encuentran en las puntas de los brotes jóvenes en crecimiento o en las grietas de las hojas desplegadas y eclosionan aproximadamente en 4 días (Figura 2) (OEPP/EPPO, 2005; Grafton-Cardwell *et al.*, 2006).

Estadios de ninfas. Las ninfas presentan cinco estadios de desarrollo, generalmente son de color amarillo-naranja y se alimentan exclusivamente de los brotes en crecimiento de los cítricos. En el primer estadio presentan un cuerpo alargado que mide entre 0.33 a 0.35 mm, además de antenas con dos segmentos y un sensor, las cuales presentan una longitud de 0.06 mm aproximadamente. En el siguiente estadio se desarrollan alas rudimentarias y se separan, el tamaño de su cuerpo y sus antenas aumentan midiendo 0.49 a 0.53 mm y 0.08 mm respectivamente. En el tercer estadio el cuerpo alcanza una longitud de 0.69 a 0.72 mm aproximadamente y es de un amarillo brillante con un abdomen y antenas oscuras, las antenas

se elongan (0.14 mm) y las alas se traslapan. En los siguientes dos estadios el color del cuerpo se torna de un amarillo brillante a un amarillo café, es generalmente ovalado alcanzando un tamaño de hasta 1.05 mm y se vuelve más ancho. Las patas, su abdomen y las antenas son de colores relativamente oscuros (Figura 2) (OEPP/EPPO, 2005).

En los primeros estadios las ninfas tienen mayores requerimientos de proteínas que de carbohidratos, lo que va cambiando conforme al estadio ninfal aumentando así sus requerimientos de carbohidratos en los últimos dos estadios, en general las ninfas son sedentarias, es decir tienen poco movimiento, sin embargo en los estadios ninfales 3 a 5 utiliza la energía proporcionada por los carbohidratos para moverse e incluso dar pequeños saltos. En estos últimos estadios secretan el exceso de carbohidratos en forma de mielecilla.



Figura 2. Imagen Izquierda: Huevos eclosionando, ninfas primeros estadios; Imagen derecha: ninfa quinto estadio.

Fuente: Grafton-Cardwell *et al*, 2006.

Psílicos adultos. Los psílicos adultos son de un color café, su tamaño varía dependiendo de su sexo, siendo la longitud del cuerpo de las hembras de 1.90 a 2.06 mm, mientras que los machos miden 1.53 a 1.66 mm. Presentan un color café en su abdomen y la parte del vientre es verde. Sus ojos son de color negro y sus antenas tienen ocho segmentos que van del café - amarillo hasta negro en las puntas. Por lo general se alimentan de la parte inferior de las hojas con sus cabezas hacia abajo, casi tocando la superficie, esto debido a que sus cuerpos se colocan en una posición de 45 ° (grados) respecto a la hoja donde se posan. Suelen vivir de uno a dos meses y su ciclo de vida depende de la temperatura y el tipo de

hospedero, por lo general suelen brincar o volar distancias cortas cuando son perturbados, pero no pueden volar distancias largas debido a que poseen músculos débiles en relación con el tamaño de su alas, debido a esto se estima que la dispersión a larga distancia del psílido probablemente consta de vuelos de cortos repetidamente (Figura 3) (Grafton-Cardwell *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2012).



Figura 3. Psílido Adulto de *Diaphorina citri* K alimentándose.
Fuente: Grafton-Cardwell *et al.*, 2006.

Daños Causados por el modo de Alimentación de *Diaphorina citri* K

Los daños causados a los cítricos por *Diaphorina citri* K., están directamente relacionados con su forma de alimentación y las sustancias que producen. *D citri* al ser un insecto succionador extrae con sus aparatos bucales grandes cantidades de savia que le sirve de alimento debido a que es rica en agua, azúcares (principalmente sacarosa), aminoácidos, minerales, fitorreguladores, reguladores de crecimiento entre otros; es por ello que la extracción de la savia provoca que el desarrollo de la planta se vea afectado por la falta de nutrientes (Marguilis Y Dorian, 1990; Grafton-Cardwell *et al.*, 2006). También excreta una melaza debido al exceso de carbohidratos consumidos, que cuelga de las hojas y sirve a su vez como alimento para el hongo *Capnodium* spp., productor de fumagina, la cual al formar capas de color negro sobre las hojas impide el proceso de fotosíntesis (Figuras 4 y 5).

Otro daño provocado por su forma de alimentación es la introducción a la planta de una toxina salivar que induce malformaciones en las hojas y brotes jóvenes. Además agregados de

estos psílidos provocan distorsión de los brotes proporcionando mejores sitios de oviposición. Los árboles maduros son capaces de resistir este daño, sin embargo los árboles de vivero y las nuevas plantaciones requieren de protección química (Figura 6a, b y c) (Grafton-Cardwell *et al.*, 2006).



Figuras 4 y 5. Imagen izquierda: ninfas productoras de túbulos cerosos; imagen derecha: Desarrollo de fumagina. **Fuente:** Grafton-Cardwell *et al.*, 2006.



Figura 6a, 6b y 6c. (a) Hojas distorsionadas aptas para ovoposición; (b) Brotes de hojas malformados y (c) Brotes con malformación, torcidos. **Fuente:** Grafton-Cardwell *et al.*, 2006.

A pesar de toda esta serie de daños provocados por la forma de alimentación de *Diaphorina citri* K. el daño de mayor importancia es la transmisión de *Candidatus Liberibacter* spp., la cual como se mencionó anteriormente una vez que infecta a los árboles de cítricos

provoca daños muy severos a la planta hasta acabar con su vida útil en un período relativamente corto.

Control Biológico y Químico

Respecto al control químico que se ha desarrollado contra el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama, se tienen reportes del uso de insecticidas en Brasil y Florida como imidacloprid, fenpropatrin, clorprid y dimetato, los cuales al ser aplicados en invierno reducen notablemente la población del psílido. Sin embargo se ha observado que el control con insecticidas es sumamente inefectivo en la cuestión de prevenir la introducción y dispersión de la enfermedad de HLB, especialmente en plantaciones nuevas de cítricos (Hall *et al.* 2012, Grafton-Cardwell *et al.* 2006). Cabe mencionar que muchos de los productores comerciales en Florida ven esta alternativa muy costosa y de lento avance, en especial porque la mayoría de las veces se tiene que combinar dos o más insecticidas (Gottwald, 2010).

Por otro lado en el manejo de las poblaciones del psílido asiático de los cítricos los enemigos naturales ejercen una labor importante. Algunos enemigos naturales que atacan a *D. citri* son del orden Coleóptera, familia Coccinellidae, un ejemplo de estos son las mariquitas (Michaud, 2001). Las crisopas (Neuroptera: Chrysopidae) y las arañas (Araneae) que son depredadores muy comunes de las ninfas de este psílido. Aunque se conoce poco de cómo estos depredadores pueden reducir la población del psílido, actualmente son considerados agentes importantes como control biológico de esta plaga. Además también se ve atacado por parasitoides del orden Hymenoptera, familia Eulophidae: *Tamarixia spp.* (Sánchez-González *et al.*, 2010) y *Diaphorencyrtus aligarhensis*; además de un hongo entomopatógeno del género *Hirsutella* (Hall *et al.* 2012, Grafton-Cardwell *et al.* 2006).

En estudios recientes en México, Loera *et al.*, en el 2011, demostraron la capacidad depredadora de la avispa mexicana de la miel *Brachygastra mellifica* (Say 1837) (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae) contra *Diaphorina citri*, la cual puede alimentarse sin ninguna complicación de ninfas del de 2º, 3º 4º y 5º etapa en un tiempo promedio de 5 a 30 segundos dependiendo el tamaño de la ninfa y discrimina los huevos y ninfas de la primera etapa, posiblemente debido a que estas fases de desarrollo están protegidas por espacios entre los brotes y/o que, energéticamente, no sea redituable el esfuerzo de consumir este tamaño de

presas, comparado con ninfas de mayor tamaño (Lorea *et al.* 2011). Esta avispa ataca a *D. citri* en cuanto localiza nuevos brotes de árboles del genero *citrus*, mostrando una alta capacidad de búsqueda detectando y depredando ninfas a bajas densidades en los brotes. No solo se alimenta de los fluidos extraídos de las ninfas, sino que también consume parcial o totalmente el exoesqueleto por lo que se está considerando como un excelente agente de control biológico. (Lorea *et al.* 2011).

Candidatus Liberibacter spp

Es una bacteria fastidiosa perteneciente al grupo de las α -proteobacterias, Gram-negativas, la cual se limita al floema de la familia de las rutáceas, principalmente los cítricos y una vez infectados no tiene cura (Fujikawa y Iwanami, 2012).

Actualmente se conocen tres especies que se encuentran fuertemente asociadas al enverdecimiento de los cítricos o HLB, las cuales son *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) que es transmitida por el insecto *Trioza erytrea* procedente de África. *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) y *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam), las cuales son transmitidas naturalmente por el psílido asiático *Diaphorina citri* Kuwayama, y pueden ser transmitidas también artificialmente por injertos de cítricos a otros cítricos. *Ca. Liberibacter americanus* al igual que *Ca. Liberibacter africanus* es sensible a las altas temperaturas (Soon *et al.*, 2008; Luis *et al.*, 2010). *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) es resistente a altas temperaturas y es la más relacionada en casos de la enfermedad HLB en el hemisferio occidental desde 2004 (Gottwald, 2010).

Una vez adquirida la infección estudios han demostrado que esta bacteria se distribuye en el floema del tejido de la corteza y en el tejido vascular de las venas centrales de las hojas, además de diferentes partes de las flores y frutas. En general, la bacteria causa grandes cambios de la expresión génica implicada en los sistemas de defensa de la planta, el metabolismo de la respuesta al estrés ambiental, metabolismo de las proteínas, en el transporte de nutrientes, la energía, carbohidratos y otros (Soon *et al.* 2008).

Daños a los cítricos Causados por la Infección de *Candidatus Liberibacter spp*

En las hojas en estadios tempranos de la enfermedad se puede observar un moteado amarillo irregular que no es simétrico en ambos lados del centro de las venas; estas manchas pueden ser verdes oscuras o brillantes, y cuando la enfermedad es más severa las áreas verdes oscuras se reducen a círculos pequeños con un fondo amarillo brillante o verde. Las hojas suelen ser rectas y pequeñas, y algunas veces las venas principales y secundarias se convierten alargadas, hinchadas y corchosas de un color amarillo, debido a la acumulación del almidón en las células del parénquima. En las ramas se puede observar defoliación debido a la caída severa de hojas, reducción del crecimiento y muerte de las ramitas. Figura 7 (a, b y c) (Gómez, 2008; Achor *et al.*, 2010).

Respecto a los frutos que producen los árboles infectados, se puede observar un crecimiento pobre e irregular, inversión del color en el fruto permaneciendo verde en lugar de amarillo. Internamente puede observarse diferencia de maduración y aborto de semillas, al partirse longitudinalmente se puede observar que su axis está curvado. El jugo que producen estos frutos tiene elevada acidez, baja proporción de jugo y bajo contenido de azúcar, por lo que resultan no aptos para su consumo Figura 8 (a, b y c) (Gómez, 2008; Achor *et al.*, 2010).

Es importante saber que el moteado de las hojas y las ramas producido por HBL puede ser confundido con otras enfermedades como el virus de la tristeza o con deficiencia de nutrientes. Cabe mencionar que los patrones cloróticos pueden ser producidos por las deficiencias de minerales como Zn, Fe, Mn, Ca, S y/o B, ligadas a la enfermedad. Figura 9 (Gómez, 2008).

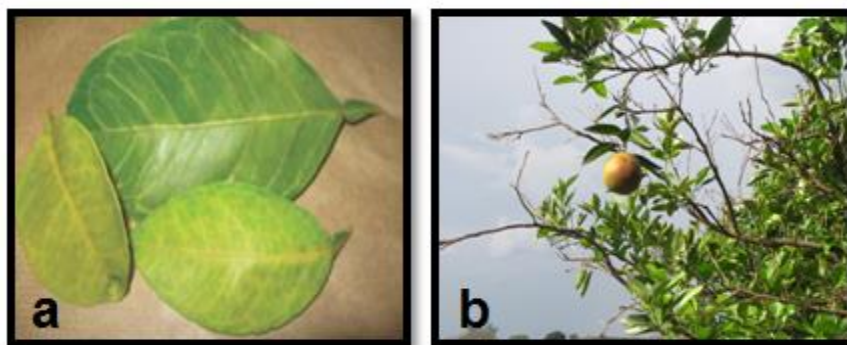


Figura 7a y 7b. a) Hojas con moteado característico asimétrico y nervaduras engrosadas; b) Árbol infectado con síntomas de defoliación.

Fuente. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas, 2013.

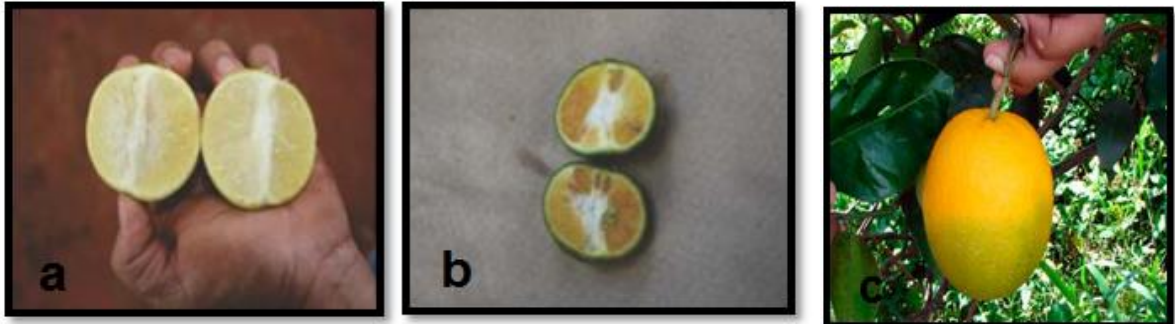


Figura 8a, 8b y 8c. a) Corte longitudinal de fruto con HLB; b) Axis deforme y engrosado con semillas abortadas y coloración café; c) Inversión del color amarillo por verde.

Fuente. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas, 2013.



Figura 9. Diferencias entre hojas con deficiencias de minerales y HLB.

Fuente. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas, 2013.

Constituyentes Químicos de las Plantas

Una de las diferencias entre plantas y animales es su capacidad de síntesis de numerosas y diversas sustancias. Las plantas sintetizan y acumulan sustancias muy variadas como el ADN, ARN, proteínas, carbohidratos, polisacáridos, y lípidos a partir de nutrimentos inorgánicos. Las sustancias vegetales, de naturaleza química extraordinariamente diferente, presentan propiedades también muy diversas, aunque su papel fisiológico en la planta es muchas veces no del todo conocido (García, 2009).

En particular los vegetales, igual que otros organismos mediante sus procesos metabólicos sintetizan dos categorías de metabolitos: primarios y secundarios, aunque esta distinción resulta totalmente arbitraria pues no hay una división precisa entre metabolismo primario y secundario (Harborne, 1982). Los metabolitos primarios, muy abundantes en la naturaleza, son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta; se encuentran

presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y su explotación es relativamente económica (Petiard y Bariaud-Fontanel, 1987).

Carbohidratos en las Plantas

En las plantas los carbohidratos como metabolitos primarios, son sintetizados de forma natural a través del proceso de fotosíntesis para cubrir los requerimientos de energía. En las hojas verdes se une el dióxido de carbono del aire y el agua del suelo, los cuales en presencia de clorofila actúan como catalizadores incorporando la luz solar para formar glucosa, un carbohidrato elemental. El oxígeno producido es liberado a la atmósfera como un producto accesorio. Los carbohidratos sintetizados en las hojas sirven de base para formar otros carbohidratos más complejos. En la Figura 10, se indica la ecuación simple de este proceso.

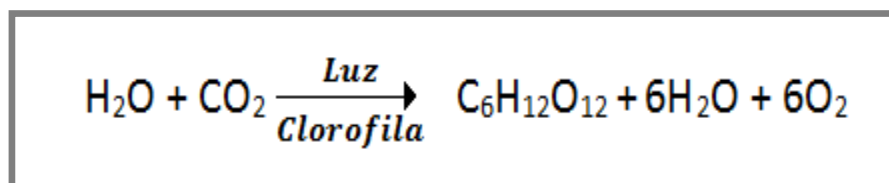


Figura 10. Ecuación que muestra la síntesis de glucosa en el proceso de fotosíntesis

Estructuralmente, los carbohidratos son compuestos orgánicos constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno. En su forma más sencilla la fórmula general es $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$, los cuales se pueden definir como polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas o compuestos que conducen a ellos por hidrólisis y sus derivados. Varían desde azúcares simples que contienen de tres a siete átomos de carbono hasta polímeros muy complejos. Los carbohidratos se clasifican por su estructura química, en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Monosacáridos. Los monosacáridos son monómeros de carbohidratos que por hidrólisis no pueden convertirse en moléculas más sencilla y constituyen carbohidratos más complejos como los oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos se dividen en dos grandes familias, la de las aldosas y cetosas que pueden tener de 3 a 6 átomos de carbono en su estructura. Estas se diferencian en su grupo funcional aldehído y cetona. Los

monosacáridos más importantes de la serie de las aldosas son: el gliceraldehído de 3C, la eritrosa y trealosa de 4C, la ribosa de 5C, así como glucosa, manosa y galactosa de 6C; y de la serie de las cetosas se encuentra a la dihidroxiacetona de 3C, la D-eritrosa de 4C, la D-ribulosa y D-xilulosa de 5C; así como la D-fructosa y D-sorbosa de 6C.

Oligosacáridos. Son moléculas constituidas por la unión de dos a nueve monosacáridos cíclicos, mediante enlaces de tipo glucosídicos. El enlace glucosídico se establece entre grupos alcohol de dos monosacáridos, con desprendimiento de una molécula de agua. El grupo más importante de los oligosacáridos es el de los disacáridos, o azúcares dobles, que son la unión de dos monosacáridos, mediante pérdida de una molécula de agua formando así un enlace tipo éter. Entre los disacáridos más importantes se encuentran la isomaltosa, la maltosa, la lactosa, la sacarosa y la trehalosa (Figura 11).

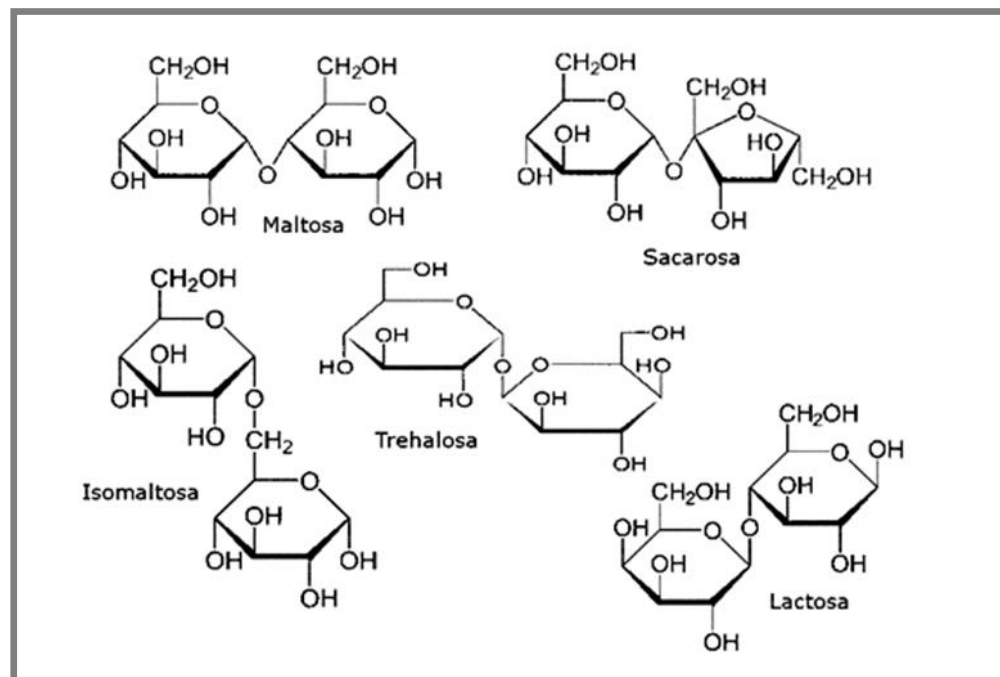


Figura 11. Disacáridos: Isomaltosa, maltosa, lactosa, scarosa y trehalosa

Fuente: Bioquímica de los Procesos Metabólicos, Melo y Cuamatzi, 2007.

Polísacaridos. Son polímeros cuyos constituyentes son monosacáridos, los cuales se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos. Estos compuestos llegan a tener un peso molecular muy elevado, que depende del número de residuos o unidades de monosacáridos

que participen en su estructura. Este número es casi siempre indeterminado pero variable dentro de unos márgenes.

Los principales polisacáridos en las plantas son el almidón, celulosa, hemicelulosa quitina entre otros, estos carbohidratos sirven de reserva y para dar estructura a sus diferentes tipos de tejidos (Figura 12) (Melo y Cuamatzi, 2007).

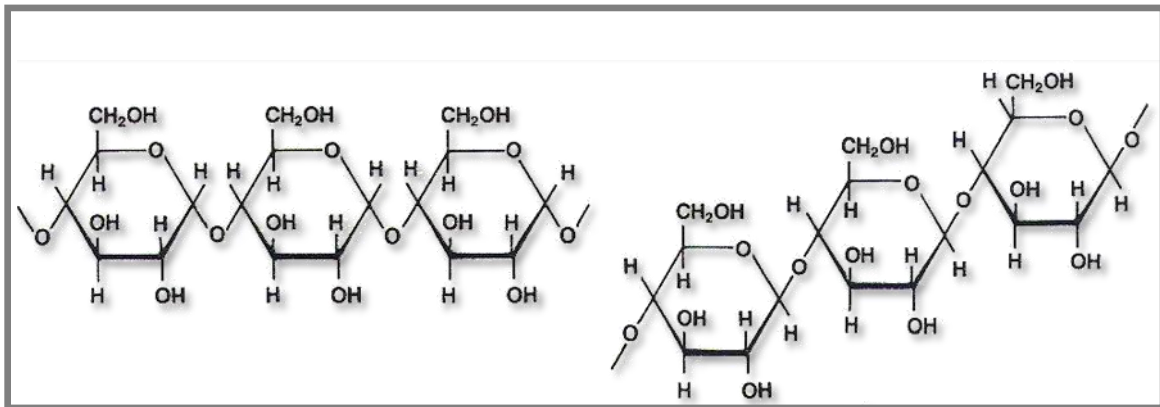


Figura 12. Estructura básica del almidón (izquierda) y la celulosa (derecha).
Fuente: Badui, 2006.

Clasificación de Carbohidratos en las Plantas

Estructurales. Los carbohidratos de las plantas se dividen en dos grupos: estructurales y no estructurales (CNET). Los primeros forman parte de la pared celular y entre éstos se encuentran la celulosa, la hemicelulosa y la pectina. Estos carbohidratos no están disponibles para el metabolismo energético de la planta (Badui, 2006; Solomon, Berg y Martin, 2008).

Celulosa. Es un polisacárido estructural no ramificado de todo el reino vegetal: por ser considerado el compuesto más abundante en la naturaleza y constituir una fuente de glucosa prácticamente inagotable que se renueva de forma continua mediante la fotosíntesis. Está compuesto por 10000 unidades de β -glucosa unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); es rígido e insoluble en agua (Badui, 2006; Solomon, Berg y Martin, 2008).

Hemicelulosa. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos (polisacárido compuesto por más de un tipo de monómero), formado, en este caso un tanto especial, por un conjunto heterogéneo de polisacáridos, a su vez formados por un solo tipo de monosacáridos unidos por enlaces β (1-4) (fundamentalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico), que forman una cadena lineal ramificada. Entre estos monosacáridos destacan más: la glucosa, la galactosa o la fructosa. Forma parte de las paredes de las diferentes células de los tejidos del vegetal, recubriendo la superficie de las fibras de celulosa y permitiendo el enlace de pectina (Badui, 2006)

Pectina. Mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Su estructura básica está integrada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1-4), en la cual algunos carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sal. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. En presencia de aguas forman geles. Determinan la porosidad de la pared, y por tanto el grado de disponibilidad de los sustratos de las enzimas implicadas en las modificaciones de la misma. Las pectinas también proporcionan superficies cargadas que regulan el pH y el balance iónico. Estas tienen tres dominios principales: homogalacturonanos, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (Baduí, 2006; Velsid, 2007).

No estructurales. Los carbohidratos no estructurales se almacenan en órganos vegetativos como raíces, rizomas, estolones, coronas y parte inferiores del tallo. Los principales CNET en los tejidos de especies forrajeras son monosacáridos como glucosa y fructosa, disacáridos como sucrosa y maltosa y polisacáridos como almidones y fructosanos.

Glucosa. Es el monosacárido aldohexosa más abundante con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Es utilizado por la mayor parte de los organismos como fuente de energía. Durante la respiración celular, las células oxidan moléculas de glucosa convirtiendo la energía almacenada en una forma más fácil de utilizar para las funciones celulares. Su importancia en el metabolismo es tal que se han desarrollado mecanismos para mantener su concentración en valores relativamente constantes en la sangre de los seres humanos y de otros animales complejos. La glucosa se sintetiza en las plantas y representa la materia fundamental para la fabricación de casi todos los carbohidratos como la fructosa, sacarosa y carbohidratos complejos como celulosa y almidón, además de otro tipo de compuestos como aminoácidos y ácidos grasos (Badui, 2006).

Fructosa (levulosa). Es un monosacárido cetohehexosa encontrado en las frutas y en la miel más dulce que la glucosa. Tiene fórmula molecular idéntica que la glucosa pero sus átomos están colocados de manera distinta. Debido a estas diferencias estos dos azúcares tienen propiedades diferentes. Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de fructosa (a menudo con glucosa), que puede ser extraída y concentrada para hacer un azúcar alternativo (Solomon, Berg y Martin, 2008).

Sucrosa (sacarosa). Es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa unida mediante enlaces glucosídicos $\alpha \beta$ (1-2). La hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa está catalizada por la enzima sacarasa llamada también invertasa, porque produce un cambio del poder rotatorio de dextrógiro a levógiro. La ventaja de la sacarosa sobre la D-glucosa como forma de transporte de la azúcar puede radicar en que sus átomos de carbono anomérico se hallan unidos, con lo que la sacarosa está protegida de la oxidación o del ataque hidrolítico por las enzimas de las plantas hasta que alcanza su destino final en la planta. Una vez sintetizada en las hojas verdes la sacarosa es transportada a otras partes de las plantas, principalmente para su almacenamiento. Cuando se necesita una fuente de carbono y de energía, la sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa, las cuales ingresan a la vía metabólica principal (Solomon, Berg y Martin, 2008; Melo y Cuamatzi, 2007).

Maltosa. Es un disacárido reductor más sencillo con dos residuos de dos glucosas unidos por un enlace glucosídico α (1-4), el cual no aparece de forma abundante en la naturaleza, aunque está presente en algunos granos que han germinado, como por ejemplo en el maíz dulce. Este azúcar se obtiene como intermediario en la hidrólisis del almidón por las enzimas conocidas como amilasas. Esta segunda fracción de glucosa posee un hidroxilo anomérico libre que puede existir ya sea en la configuración alfa o beta, confiriéndole así la característica de mutarrotación a la maltosa (Melo y Cuamatzi, 2007).

Almidón. Polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, constituido por amilosa y amilopectina (Figura 13): el primero es producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos α (1-4), que establece largas cadenas lineales con 200 – 2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; tiene la facilidad de adquirir una conformación helicoidal, en la que cada vuelta consta de seis moléculas de glucosa. La amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α (1-6), localizadas cada 15 a 25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto entre 200 a 500 millones de daltones. Las células

vegetales almacenan almidón principalmente en forma de gránulos dentro de organelos especializados llamados amiloplastos; cuando se necesita energía para realizar una actividad celular la planta hidroliza el almidón con lo que se liberan las subunidades de glucosa. Prácticamente todos los organismos cuentan con enzimas que pueden hidrolizar los enlaces α (1-4) (Badui, 2006; Solomon, Berg y Martin, 2008).

Fructosanos. Polímeros, generalmente lineales, formado por moléculas de D-fructosa unidos mediante enlaces glucosídicos. Más concretamente, su estructura está formada por una molécula de glucosa ligada a múltiples unidades de fructosa β (2-1), que se encuentran de reserva energética en varios vegetales. Su origen se encuentra principalmente en las plantas, pero también pueden aparecer en hongos y bacterias (Badui, 2006).

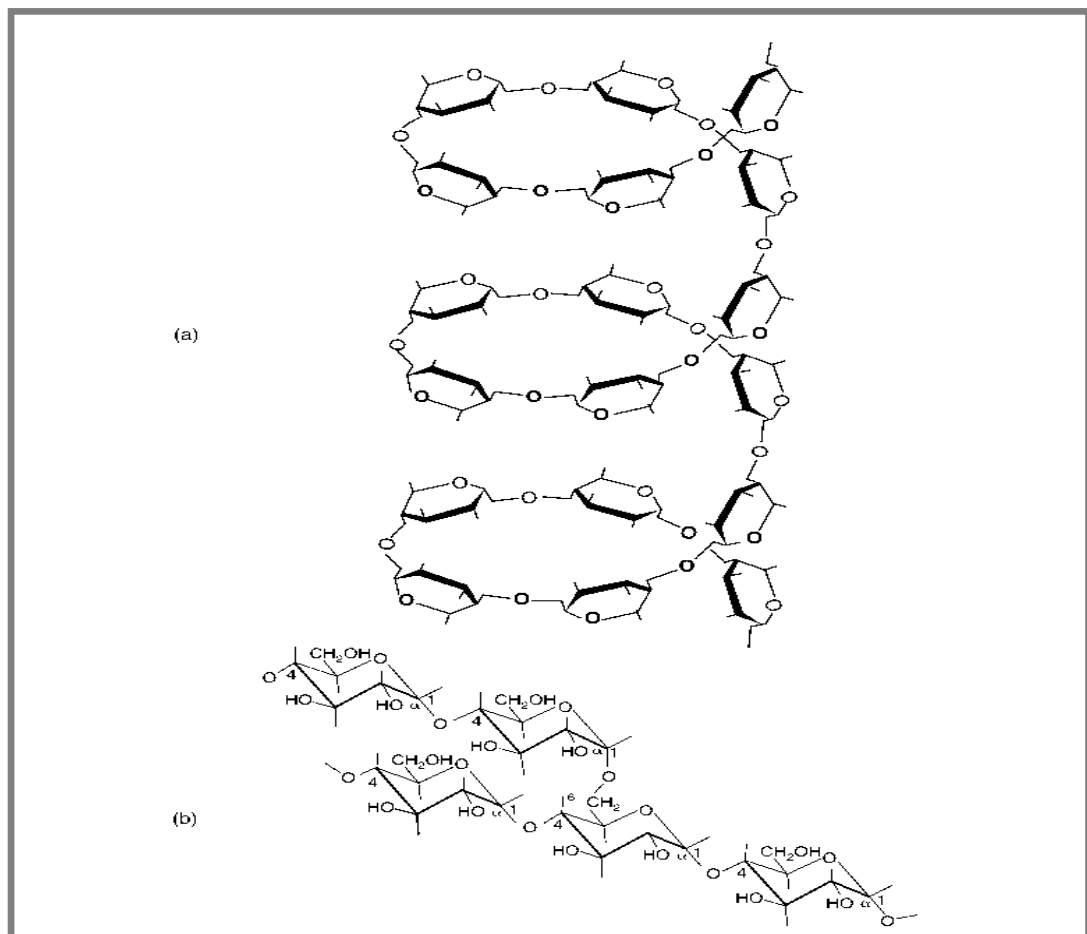


Figura 13a y 13b. (a) enrollamiento helicoidal de la amilosa; (b) estructura química de la amilopectina.

Fuente: Badui, 2006.

Carbohidratos en la Hemolinfa de los Insectos

Glucosa. Está presente en los insectos, a veces en niveles similares a los niveles de la sangre de los mamíferos pero generalmente más bajos. Los aminoácidos, proteínas y otros compuestos orgánicos también están presentes, y sus concentraciones pueden exceder el de otro azúcar, similar en importancia; la trehalosa (Chen, 1985; Mullins, 1985).

Trehalosa. Es el disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por sus carbonos 1 en posición alfa (1,1- α,α) y principal azúcar que circula en la sangre o hemolinfa de la mayoría de los insectos; se encuentra presente en una amplia gama de organismos llevando a cabo funciones como azúcar de reserva y como protector ante el estrés abiótico. La resistencia a la hidrólisis ácida y la ausencia del enlace de hidrógeno intramolecular hace a la trehalosa químicamente única en comparación con otros disacáridos comunes, en particular la sacarosa. La trehalosa es el producto de la condensación de dos intermedios glicolíticos, glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato (Figura 14) (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Avonce e Iturriaga, 2005).

La hidrólisis para reformar la glucosa, catalizada por isoenzimas de una sola enzima, la trehalasa, es la única vía conocida de la utilización de la trehalosa. La síntesis y la degradación de trehalosa están bajo el control hormonal que implica ambos factores hipertrehalosémico y hipotrehalosémico. Sin embargo, la concentración de trehalosa en la sangre, no está regulada homeostáticamente. Más bien, la trehalosa se produce a niveles muy variables, típicamente entre 5 y 50 mM, dependiendo de las condiciones ambientales, el estado fisiológico y nutricional (Thompson, 2003).

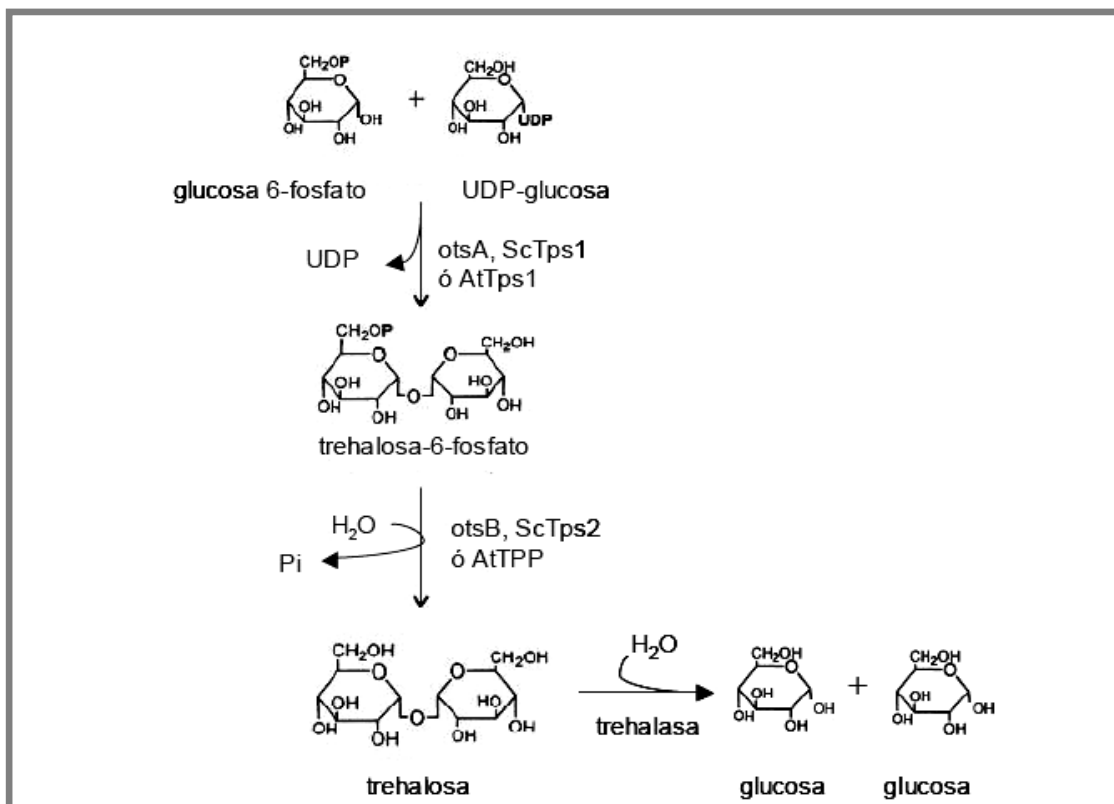


Figura 14. Vía TPS/TPP de biosíntesis de trehalosa, más frecuente encontrada en bacterias, hongos, plantas e insectos. Vía de degradación de la trehalasa en dos moléculas de glucosa.

Fuente: Mascorro, Avonce e Iturriaga, 2005.

Funciones de la Trehalosa. La concentración variable en las que se produce la trehalosa es esencial para el cumplimiento de sus funciones, como (1) Energía de almacenamiento, el papel tradicional atribuido a la trehalosa; (2) un crioprotector, reduciendo el punto de sobreenfriamiento de algunos insectos evitando su congelación; (3) un estabilizador de proteínas durante el estrés osmótico y térmico, una función recientemente investigada en insectos y (4) un componente de un mecanismo de retroalimentación que regula el comportamiento de alimentación y la ingesta de nutrientes, donde los niveles de metabolitos en sangre incluyendo trehalosa actúan mediante la modulación de las respuestas del receptor del gusto y a través del sistema nervioso central para influir en la selección de alimentos. Todos estos son ejemplos de conservación funcional en la ausencia de la homeostasis. Esto se ha denominado enantioestasis, donde la conservación funcional sirve como un mecanismo de adaptación fisiológica a pesar de lo que parece ser un medio interno inestable (Thompson, 2003)

Metabolitos Secundarios de las Plantas

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Los metabolitos secundarios de las plantas están representados principalmente por terpenoides, fenilpropanoides/bencenoides, compuestos fenólicos y sus derivados, derivados de ácidos grasos y compuestos nitrogenados o alcaloides (Dudareva *et al.*, 2004). Los aceites volátiles o aceites esenciales constituyen el 1% de los metabolitos secundarios de las plantas y pueden actuar como señales para otros organismos y aún más para la comunicación entre plantas y su interacción con el ambiente circundante, modificando incluso el entorno de las especies que los producen, sus vecinos y sus enemigos (Marín y Céspedes, 2007). Además de que los volátiles químicos sirven a las plantas para su reproducción, al atraer polinizadores o dispersores de semillas; como defensa para repeler insectos o detener la colonización de bacterias y hongos fitopatógenos; para atraer enemigos naturales de herbívoros; y en general como mensajeros intra e interespecíficos (Marín y Céspedes, 2007).

Terpenos. Son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno. Las unidades de isopreno pueden ser biosintetizadas por medio de dos vías; a través de intermediarios de la Ruta del Ácido Mevalónico (MVA) o bien de la ruta del metileritritol fosfato (MEP) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Compuestos Fenólicos y sus derivados. Son un numeroso grupo de compuestos orgánicos que en su estructura poseen al menos un grupo funcional fenol (es decir, un -OH), unido a un anillo aromático. Estos compuestos presentan estructuras sencillas como los ácidos fenólicos hasta estructuras muy complejas como los taninos y lignina. En su clasificación en base a su esqueleto carbonado se encuentran, fenoles simples y complejos, también se pueden clasificar en flavonoides y no flavonoides.

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se localizan en todas las partes de la planta su concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo. Estos compuestos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente como el ataque de microorganismos fúngicos y bacterianos.

Los fenoles están asociados al color, características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), características nutritivas y propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal (Robbins, 2003). Los componentes fenólicos representan un grupo inmenso de moléculas con una gran variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Estos incluyen pigmentos y sabores que pueden atraer o repeler, así como compuestos que pueden proteger a la planta en contra de insectos, hongos, bacterias y virus. La mayoría de los compuestos fenólicos se representan como ésteres o glucósidos. Los taninos y lignanos son polímeros fenólicos. Los taninos son utilizados comercialmente como tintes y astringentes, y los lignanos juegan un papel importante en la rigidez celular y tejidos, son esenciales para el desarrollo vascular (Vermerris and Nicholson, 2006).

Fenoles simples. A este grupo pertenecen los fenilpropanoides simples que tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Las lactonas fenilpropanoides (o "ésteres cíclicos"), también llamadas cumarinas, las cuales también poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. Y por último los derivados del ácido benzoico (el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono). Son formados a partir de fenilpropanoides a los que se les delecionan dos carbonos de la cadena propánica (Vermerris and Nicholson, 2006; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Fenoles complejos. En este grupo se encuentran los lignanos, los cuales son polímeros altamente ramificado de fenilpropanoides, estos son metabolitos secundarios de una gran variedad de plantas. Se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico, de manera que cada uno de ellos puede formar numerosos enlaces y ramificaciones haciendo que cada lignina pueda ser única. Están presentes en bajas concentraciones en semillas y algunas bayas y se encuentran covalentemente unidas a la celulosa y a otros polisacáridos de la pared celular, siendo la segunda sustancia orgánica más abundante en las plantas (Robbins, 2003; Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Flavonoides: Este grupo forma parte de los fenoles complejos, presenta un esqueleto carbonado que contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos bencénicos unidos por un puente tricarbonado (C6-C3-C6) (Figura 15). Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los compuestos principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Su biosíntesis se puede dar por dos vías la vía del ácido shikímico (en plantas superiores) y la vía del ácido malónico (hongos y bacterias). Entre los principales flavonoides presentes en vegetales se encuentran, las Flavanonas, Antocianinas, Flavonoles, Proantocianinas, Flavanoles, Isoflavonas y Flavonas (Figura 16) (Dudareva *et al.*, 2004).

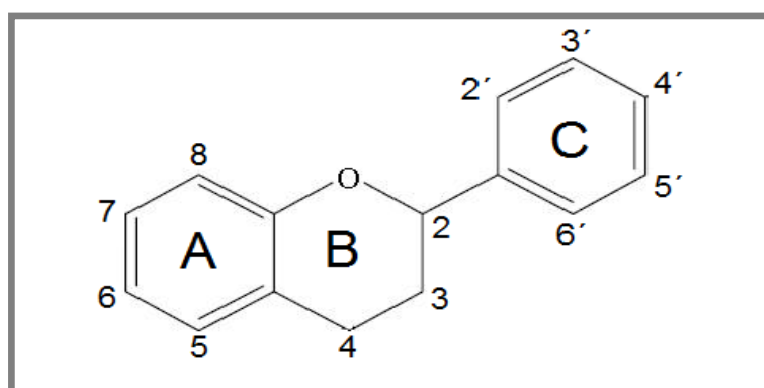


Figura 15. Esqueleto base de los Flavonoides C6-C3-C6.

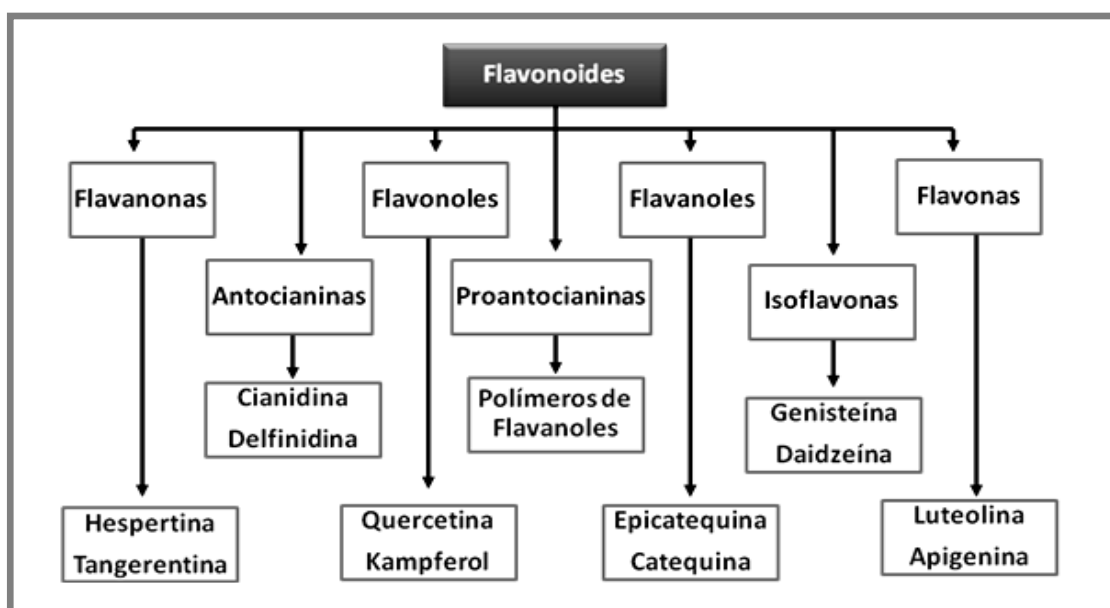


Figura 16. Principales flavonoides en vegetales, Dudareva *et al.*, 2004.

La Figura 17, muestra los principales flavonoides presentes en los cítricos, los cuales son naringina, naringenina, eriodictiol, quercetina, apigenina y kaempferol (Frydman *et al.*, 2004).

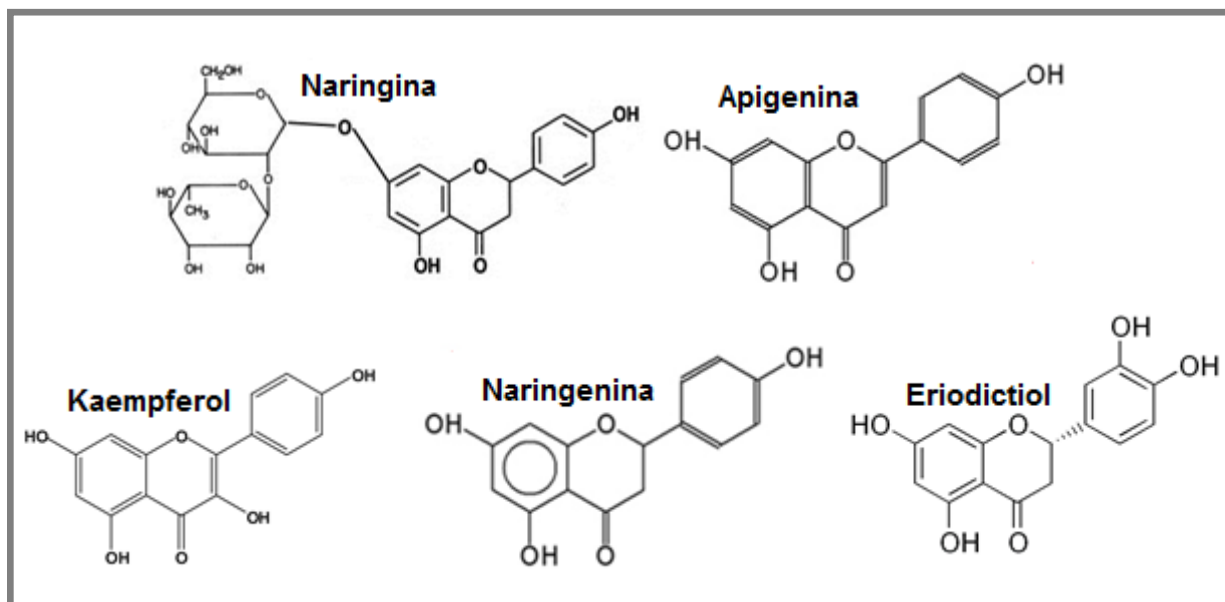


Figura 17. Flavonoides presentes en cítricos.

Constituyentes de los Cítricos

Numerosos estudios se han llevado a cabo para obtener la composición de los frutos cítricos, sin embargo, la composición de las diferentes partes de la planta (aérea o terrestre) y aún más la composición de ésta en diferentes estados fenológicos, no se ha determinado a detalle. En trabajos previos, se han determinado los compuestos volátiles presentes en los brotes menores a 5 cm de los cítricos, naranja, limón y toronja; así como el contenido de fenoles totales, previo al estudio fitoquímico de éstos (Martínez, 2012; Romo, 2012), También se han diseñado bioensayos *in vitro* para conocer la preferencia por la planta hospedero (atracción olfativa) y alimentaria a través de los compuestos fenólicos (Martínez, 2012; Romo 2012).

Respecto al contenido de metabolitos secundarios, el estudio reciente en fresco de brotes vegetativos jóvenes de cítricos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, obtuvo como resultado que los principales constituyentes volátiles eran del grupo de los

terpenos: monoterpenos, sesquiterpenos, terpeno aldehídos y terpeno alcoholes (Patt y Se'tamou, 2010, Martínez, 2012 y Romo, 2012). En los estudios realizados por Patt y Se'tamou se caracterizaron los compuestos volátiles en brotes vegetativos jóvenes de *Murraya paniculata* (L.) Jack y en cítricos de limón, naranja y toronja, en el cual los principales compuestos volátiles encontrados fueron del grupo de los monoterpenos, monoterpenos ésteres y sesquiterpenos, composición semejante a la encontrada por Martínez y Romo en el 2012 en los brotes vegetativos jóvenes de diferentes tamaños de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* S.), quienes identificaron como compuestos predominantes a los monoterpenos y sesquiterpenos. Además también se encontraron otros hidrocarburos saturados e insaturados, cíclicos o aromáticos; ésteres, aldehídos, alcoholes y cumarinas.

Además, otros estudios han indicado que los cítricos acumulan grandes cantidades de flavonoides, tanto en los frutos como en las hojas, especialmente flavanonas que son parcialmente responsables del aroma y del sabor del fruto. (Manthey *et al*, 2001).

Análisis de los Metabolitos de Plantas

Los productos naturales provenientes de plantas son fuente de principios activos reconocidos por el hombre, los cuales son de importancia en medicina, en la industria farmacéutica; industria de los perfumes y cosmética; en alimentos, en agricultura, entre otros; debido a sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios, que en la naturaleza funcionan como defensa química contra herbívoros y que actualmente se están empleando para el control de plagas de insectos (Farnsworth *et al.*, 2002; Marín y Céspedes, 2007).

La liberación de compuestos volátiles de las hojas es uno de los mecanismos de defensa química utilizados por las plantas para reducir el ataque por insectos herbívoros. La composición química de los volátiles de las hojas varía entre especies de plantas y su complejidad estructural puede determinar su actividad biológica por ello, los compuestos obtenidos mediante la extracción fitoquímica, cobran relevancia como nuevos recursos, así como el análisis de volátiles o de otros componentes químicos de las plantas, para lo cual se han desarrollado técnicas que actualmente se utilizan de manera rutinaria como la cromatografía de gases-masas, gases-liquido, el análisis por cromatografía líquida de alta

presión (HPLC), Infrarojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), entre otras (Rubinson y Rubinson, 2001).

A continuación se describen brevemente varias metodologías utilizadas en el análisis de plantas, algunas de las cuales utilizamos en este trabajo.

Extracción de los Constituyentes de las Plantas

Entre los procesos para la extracción de los diferentes fitoquímicos, aceites esenciales, componentes activos etc. destacan las nuevas tecnologías de extracción entre las que se encuentra la extracción en fluidos supercríticos (EFS). Sin embargo, en los laboratorios de investigación, aún se utilizan otros procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor, los de extracción por solución y los de extracción por centrifugación (Bruneton, 2001).

La extracción por solución precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse prácticamente todos los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. Por otra parte, precisa de equipos de vacío para poder obtener los extractos; además, es necesario utilizar disolventes orgánicos de distinta polaridad. También conlleva necesariamente establecer etapas adicionales de purificación según el destino o uso del producto. En laboratorios convencionales la metodología implica una extracción con disolventes orgánicos, que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación; no soluble en agua, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato (Palomino, 2001). Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70°C, se evapora fácilmente, pero es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, alcoholes como etanol y metanol, que son solubles en agua, entre otros (Palomino, 2001).

Análisis de Carbohidratos en Plantas

Para la determinación de carbohidratos en plantas o alimentos se han ideado números métodos de análisis, los cuales difieren en su complejidad, forma de acción, ventajas y desventajas de uso. Entre los métodos más utilizados se encuentran los métodos químicos, fluorimétricos, enzimáticos y físicos, además de la cromatografía de gases (CGL) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los carbohidratos que presentan grupos aldehídos libres o en forma hemiacetálica (grupos aldehídos potenciales) no bloqueados (por ejemplo formando parte de un enlace glucosídico) pueden ser oxidados por diferentes reactivos, por lo que se les denomina azúcares reductores (Suzuki *et al.*, 1992; Vérette *et al.*, 1995).

Hay diferentes métodos de determinación de azúcares reductores (Fehling, Benedict, Bradford, Nelson-Somogyi, etc.). En todos ellos, el azúcar reductor es oxidado por el catión cúprico (Cu^{+2}) en medio alcalino, con formación de óxido cuproso insoluble, lo que da la típica coloración rojizo-amarillenta. Los iones Cu^{+2} se pueden mantener en disolución, formando complejos coloreados con tartratos y citratos, lo que permite la determinación de azúcares reductores. Estos métodos se emplean comúnmente por su sensibilidad, alta especificidad y rápida ejecución (Badui.2006).

Actualmente, los métodos cromatográficos se están empleando ampliamente y su uso está siendo de gran valor en el análisis donde se presenta una mezcla de azúcares. Se utiliza tanto la cromatografía gaseosa (GC) como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos métodos ofrecen gran especificidad y la capacidad de detectar varios azúcares al mismo tiempo (McDonald y Garby, 1983; Silverstein, Bassler y Morrill, 1991; Méndez, 2009).

Antes de realizar la determinación de carbohidratos, las muestras deben someterse a una hidrólisis para facilitar la identificación de los azúcares. En los métodos reportados en la bibliografía se recomienda una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico y antes de pasar la muestra a analizar se debe neutralizar con carbonato de sodio (Na_2CO_3), a fin de que el sulfúrico no perjudique la columna. Según algunos autores el riesgo que se obtiene con esta hidrólisis es el de destruir algunos de los azúcares, especialmente pentosas y ácidos urónicos (Hausalo, 1995; Tenkanen *et al.*, 1995). Es por eso que algunos investigadores se inclinan por la utilización de ácido trifluoroacético (TFA), cuya hidrólisis parece ser más suave (Rydman y Dahlman 1995),

aunque otros consideran que el riesgo de esta hidrólisis está en que sea incompleta (Tenkanen *et al.*, 1995). También existen estudios de la posibilidad de utilizar enzimas para conseguir una hidrólisis eficiente de la muestra (Hausalo, 1995; Tenkanen *et al.*, 1995), la limitación es el costo de las enzimas.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica analítica de separación e identificación de estructuras químicas más ampliamente utilizada actualmente debido a su alta sensibilidad, a su fácil adaptación para realizar determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias como ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, esteroides, antibióticos, carbohidratos, hidrocarburos de diferentes tipos, entre ellos los terpenos, fármacos, plaguicidas, especies organometálicas y gran variedad de sustancias inorgánicas.

En el análisis de azúcares y de otros compuestos la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se ha convertido en una técnica muy utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación y su aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en este caso la alimentaria (Skoog *et al.*, 2003).

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida de alta resolución, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Los distintos compuestos presentes en una muestra se separan según su mayor o menor afinidad con la fase móvil y estacionaria.

La separación de los compuestos a analizar se obtiene haciendo pasar una muestra por una columna cromatográfica (fase estacionaria, la cual presenta ciertas características químicas en su superficie), mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas realizadas con la fase estacionaria a medida que pasan por la columna.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención (T_r) y se considera una propiedad que permite identificar las características de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados en este tipo de cromatografía son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayuden a la correcta separación de los compuestos.

El registro de la separación de la muestra para que pueda ser visualizada se da en los llamados detectores, los cuales se encuentran acoplados en el equipo de HPLC. Actualmente existe una gran diversidad de detectores utilizados según la naturaleza de la muestra a analizar, ya que no hay detector universal que puede controlar todos los compuestos, entre ellos podemos encontrar; detectores UV, VIS y PDA, índice de refracción (RI), Espectrómetro de Masas (MS), de Conductividad (CD), de Fluorescencia (FL), de Quimioluminiscencia, Rotación Óptica (OR) entre otros.

En el análisis por HPLC los resultados que se obtienen están en forma de un cromatograma, el cual visualiza los compuestos separados y el área del pico para cada uno de ellos, que es proporcional a su concentración (Méndez, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Material Vegetal

Las muestras de cítricos de la región fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro en Hermosillo, Sonora, y procedían de La Costa de Hermosillo y de Guaymas Sonora. El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora y en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) de Hermosillo, Sonora.

Obtención de Extractos por Maceración con Solventes

Se utilizaron hojas y brotes tiernos de tres cítricos limón, naranja y toronja con dos tamaños diferentes de 3-4 cm y 5 cm, obtenidos en el período correspondiente de brotación de las plantas, ciclo 2013-2014, los cuales tras su traslado al laboratorio de Investigación Química de la Universidad de Sonora, se secaron a temperatura ambiente por una semana y se trituraron hasta obtener un polvo fino. Posteriormente se sometieron a maceración individual en una solución alcohólica durante 7 días, después se realizó un filtrado de cada una de las soluciones, y se eliminó el solvente a presión reducida a una temperatura no mayor de 40 °C, utilizando un evaporador rotatorio IKA RV® 10 digital. Los extractos crudos se sometieron a liofilización y se almacenaron a 4°C para proceder posteriormente al análisis de carbohidratos. Sin embargo, hay que aclarar que para los brotes de toronja se contó solo con un tamaño de brote de 3 – 4 cm por lo cual se decidió fraccionar el extracto crudo de este cítrico de acuerdo a la metodología siguiente: el extracto crudo de los brotes tiernos de toronja se sometió a extracciones sucesivas con metanol a fin de lograr un mayor agotamiento del material vegetal seco. De esta forma se obtuvo una fracción metanólica y otra acuosa que fueron utilizadas en la determinación de carbohidratos.

Determinación de Carbohidratos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para realizar la determinación de azúcares por HPLC se utilizaron los extractos de los brotes vegetativos de naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus aurantifolia* S.) y de toronja (*Citrus x paradisi*) y las fracciones metanólica y acuosa de los brotes de toronja. Todas las muestras fueron sometidas primero a una hidrólisis ácida como se describe enseguida y después a filtración.

Hidrólisis de carbohidratos para muestras sólidas. Se pesaron entre 10 y 12 mg de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo de 10 mL. Enseguida se añadieron 500 uL de ácido trifluoroacético (TFA) 4N y se utilizó un pequeño magneto para disolver las muestras con ayuda de una placa con agitación (Termo Scientific). Los tubos fueron introducidos en un baño

maría, se usó aceite a 120°C como medio de calentamiento por un tiempo de 2 horas, la temperatura se verificó de tal manera que esta permaneciera estable. Transcurrido el tiempo de calentamiento, los tubos se pasaron a un baño de hielo durante unos minutos para detener la reacción. Por último, a cada tubo se le añadió 200 uL de agua ultra pura y después se colocaron en un concentrador de muestras (TECHNE, DB-3A) a una temperatura suave hasta sequedad (máx. 50 ° C), lo anterior se realizó dos veces; enseguida, para reconstituir se agregaron 500 uL de agua ultra pura a cada tubo; finalmente, los tubos se sometieron a congelación para su análisis posterior (Englyst y Cummings, 1987).

Filtración de las muestras. Antes de realizar el análisis de carbohidratos en el equipo de HPLC, cada una de las muestras fue filtrada utilizando un filtro de Nylon de 0.20 µm (Alltech) con ayuda de una jeringa estéril de 3 mL (BD Plastipak). Realizada la filtración, cada muestra fue colocada en un vial de plástico correctamente etiquetado.

Preparación de la Fase Móvil. Como fase móvil se utilizó un litro de agua ultra pura, previamente filtrada en un Kit de filtración (Millipore), y acidificada con ácido sulfúrico (H₂SO₄) hasta obtener un pH de 3.6 (Hanna Instruments); una vez preparada la fase móvil, se colocó en un recipiente de un litro, el cual fue adecuadamente etiquetado.

Inyección de Muestras en HPLC. Las muestras se corrieron en un equipo HPLC (Varian ProStar, 9012) en una columna de 30 cm de largo (Agilent Hi-Plex). El flujo fue de 0.6 mL/min. Antes de inyectar las muestras se corrió una línea base (para ajuste del equipo). El tiempo de corrida fue de 15 min. Se inyectaron 20 µL de los extractos de los brotes previamente hidrolizados a una temperatura de 65° C. Se utilizó un detector de índice de refracción (IR) (Varian, 9040). Los cromatogramas obtenidos fueron almacenados en la base de datos del equipo (Galaxie Chromatography Workstation System Control Version 5.50), para su análisis e identificación posterior (Ball y Lloyd, 2011).

Identificación de Carbohidratos en las muestras. La identidad de los carbohidratos solubles de las muestras de los brotes vegetativos jóvenes se confirmó usando estándares auténticos de carbohidratos: Glucosa, arabinosa, manitol, sacarosa, inositol, fructosa, manosa, galactosa, xilosa y ac. Galacturónico (Sigma, USA). Se corrieron en el equipo de HPLC y se obtuvo tiempo de retención (Tr) y área para cada estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de los tres brotes de cítricos (Limón, naranja y toronja), se extrajeron eficientemente. Después de ser filtrados y evaporados para eliminar el solvente, presentaron las características que se describen a continuación.

Los extractos hidroalcohólicos de los brotes de toronja de 3 - 4 cm exhibieron un color caramelo debido a la presencia de pigmentos, además de tener una consistencia viscosa, probablemente por el elevado contenido de carbohidratos, lo cual hizo difícil su manipulación y liofilización. Los extractos obtenidos a partir de los brotes vegetativos de limón de 3 - 4 y 5 cm, presentaron una consistencia viscosa al igual que los de toronja; el color exhibido fue de un verde oliváceo. En los extractos obtenidos a partir de los brotes de naranja de 3 - 4 y 5 cm, se obtuvo un color ocre claro, en comparación con los otros extractos la consistencia de estos fue la de un polvo muy fino. Los tres extractos presentaron un olor característico de cada cítrico, muy agradable.

Después de someter los diferentes extractos a una hidrólisis suave, previo a la determinación de carbohidratos se obtuvieron precipitados de color café oscuro en todas las muestras, las cuales al ser reconstituidas con agua ultra pura y posteriormente filtradas, se tornaron de un café claro amarillento o incoloras.

Identificación de Carbohidratos por HPLC

La identidad de los carbohidratos solubles de las muestras de los brotes vegetativos jóvenes de los tres cítricos, naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus aurantifolia* S.) y toronja (*Citrus x paradisi*), se confirmó usando estándares auténticos de carbohidratos (Sigma, USA). Las condiciones del análisis de HPLC para los estándares y muestras de los extractos cítricos, fueron idénticas. La concentración de cada uno de los carbohidratos identificados se estimó usando como referencia la concentración de cada estándar. En la Tabla 1, se muestran los estándares (SIGMA) utilizados, su tiempo de retención (min), área (μ RIU.Min) y concentración (mg/g).

Tabla 1. Tiempos de retención, área y concentración de estándares individuales

Estándares	TR (min)	Área (μRIU.Min)	Concentración (mg)
Glucosa	10.87	15.10	4.5
Arabinosa	12,5	7.9	2.0
Manitol	12,04	22.9	4.1
Sacarosa	10,52	23.1	6.0
Inositol	11,28	9.2	4.0
Fructosa	11,71	43.9	10.0
Manosa	11,48	18.7	4.1
Galactosa	11,50	12.8	5.0
Xilosa	11,57	26	4.7
Ac. Galacturónico	10,10	11.7	5.0

Los estándares se analizaron individualmente y en las figuras 18-27 se observan los cromatogramas obtenidos para cada uno de ellos, así como la estructura química correspondiente.

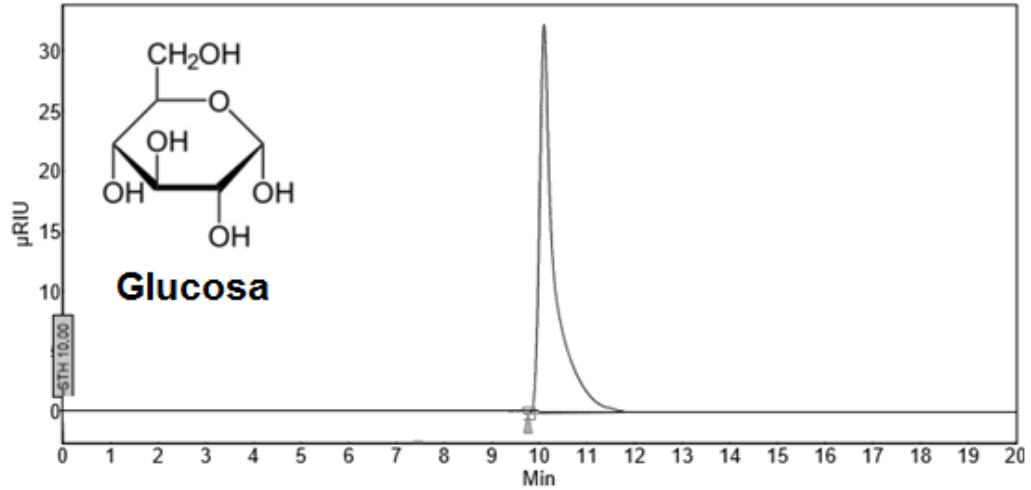


Figura 18. Cromatograma HPLC del estándar de glucosa y su estructura química.

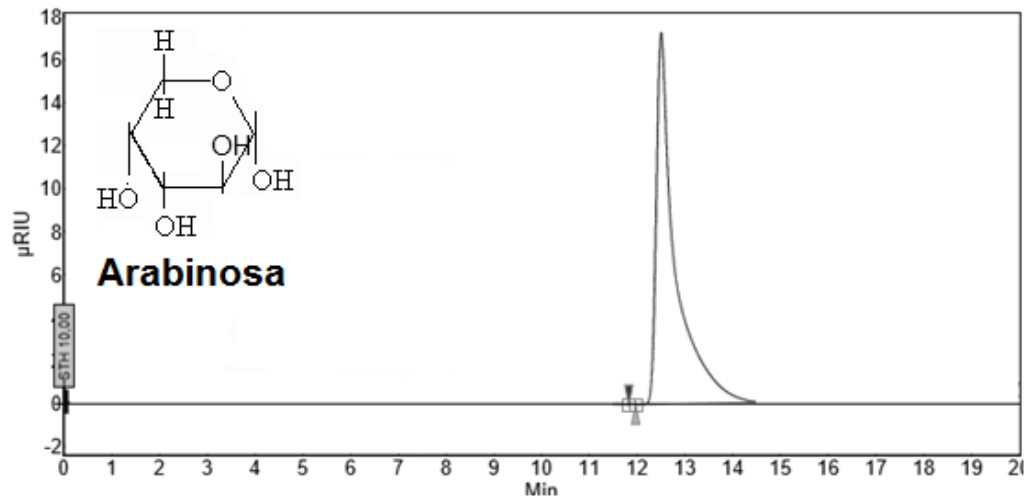


Figura 19. Cromatograma del estándar de arabinosa y su estructura química.

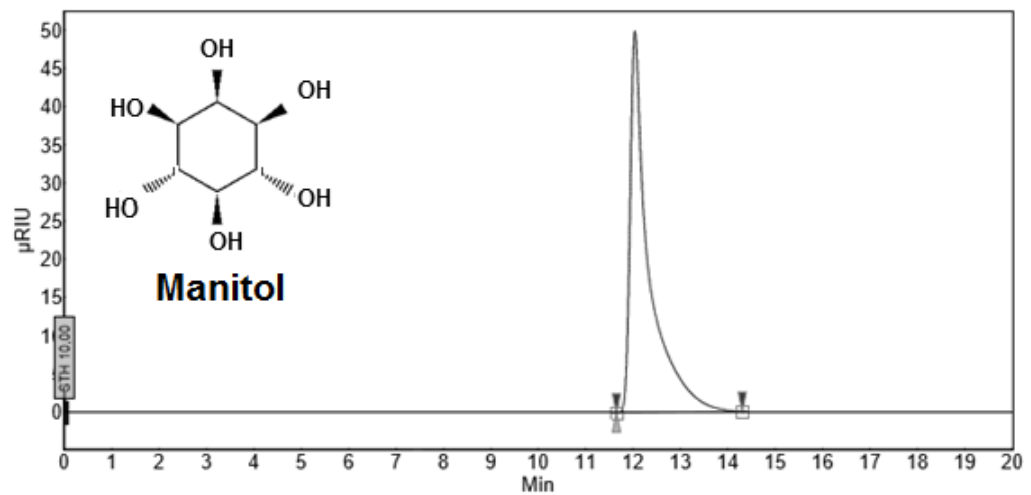


Figura 20. Cromatograma del estándar de manitol y su estructura química.

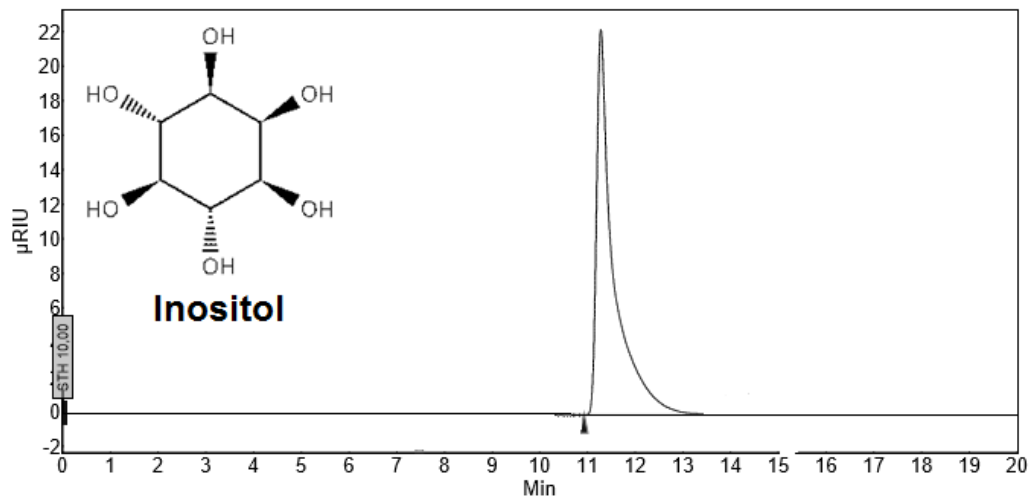


Figura 21. Cromatograma del estándar de inositol y su estructura química.

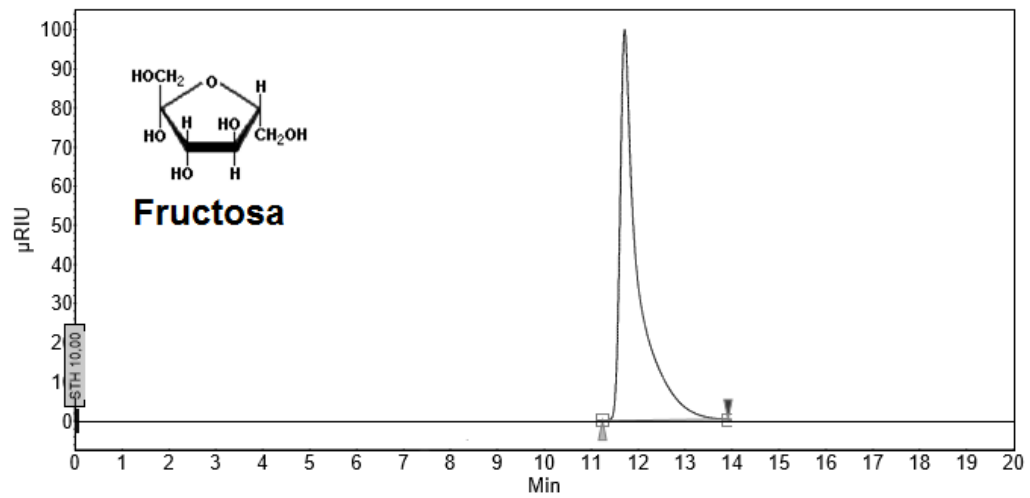


Figura 22. Cromatograma del estándar de fructosa y su estructura química.

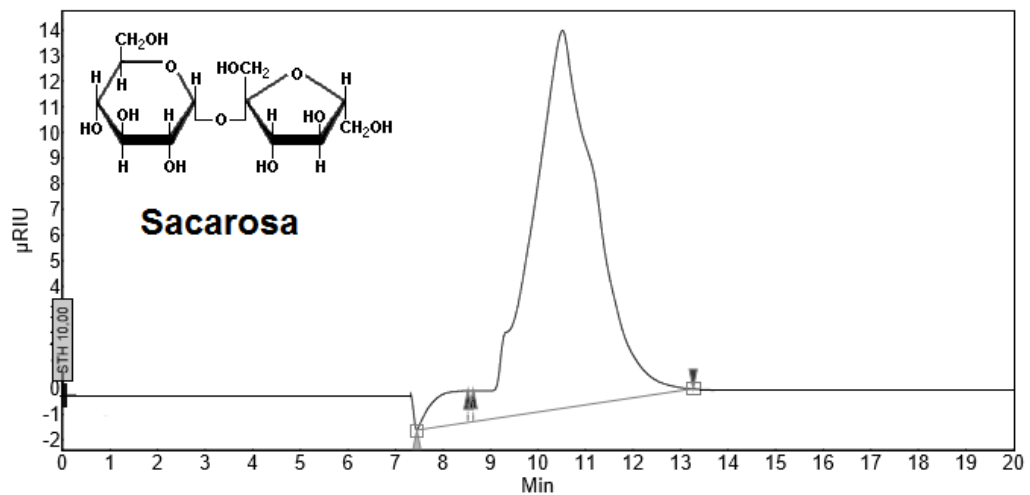


Figura 23. Cromatograma del estándar de sacarosa y su estructura química.

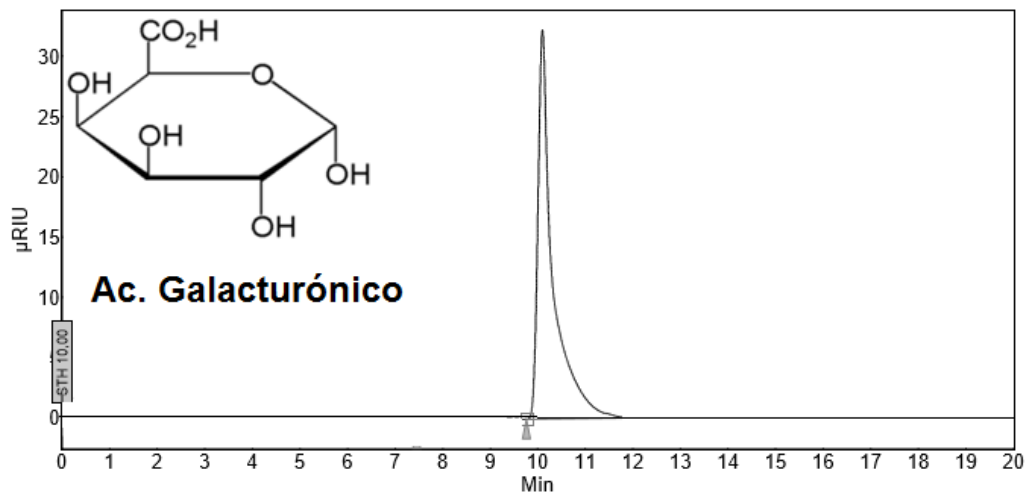


Figura 24. Cromatograma del estándar de ácido galacturónico y su estructura química.

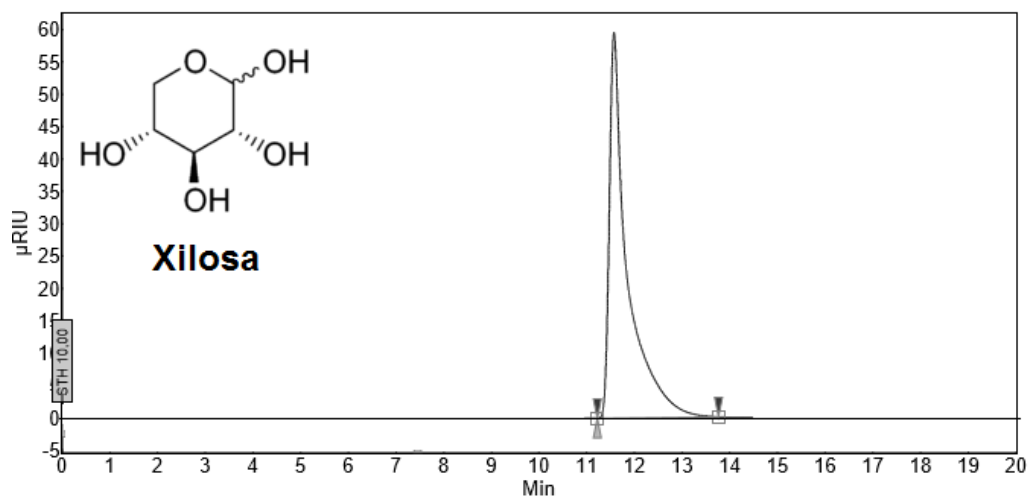


Figura 25. Cromatograma del estándar de xilosa y su estructura química.

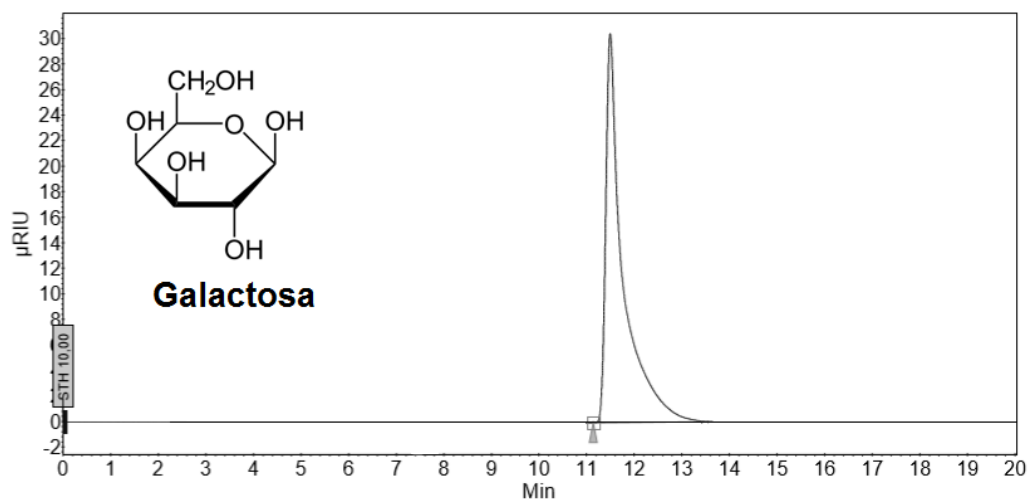


Figura 26. Cromatograma del estándar de galactosa y su estructura química.

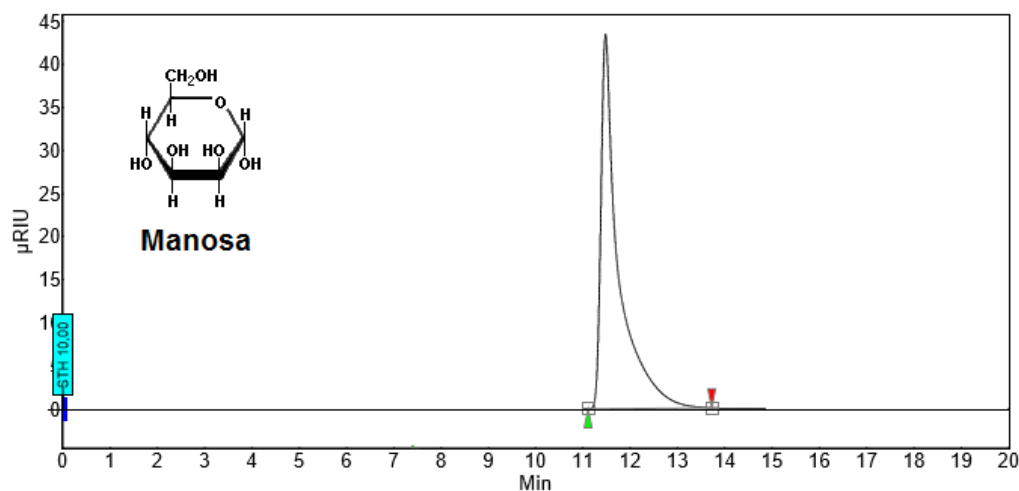


Figura 27. Cromatograma del estándar de manosa y su estructura química.

Identificación de Carbohidratos en Brotes Vegetativos de Cítricos

Los resultados obtenidos a partir del análisis por HPLC para los diferentes extractos de cítricos, mostró la composición de carbohidratos presentes que fueron identificados por comparación con los estándares; la mayoría de ellos contenía arabinosa, galactosa y glucosa, además, se identificó inositol y sacarosa. Los principales carbohidratos encontrados son importantes para los insectos, ya que en su metabolismo pueden ser aprovechados para la obtención de energía o síntesis de otras metabolitos de interés. Análisis de diferentes tejidos de vegetales muestran que la arabinosa forma parte de pectinas y hemicelulosas (Prinsen 2010; Sun *et al.*, 2000). La galactosa puede convertirse en glucosa para la obtención de energía o puede formar parte de los glucolípidos y las glucoproteínas de las membranas celulares, sobre todo de las neuronas. Otros estudios relacionan la alimentación alta en carbohidratos benéfica para el desarrollo y crecimiento de insectos (Dale, 2013).

El análisis de carbohidratos de los brotes de cítricos de 3 – 4 cm (Tabla 2), mostró la presencia de glucosa en los diferentes extractos, encontrándose la mayor concentración de glucosa en los brotes de toronja (T1), 13557.31 mg/gr de extracto. En el brote de toronja analizado, además de la presencia de glucosa, también se encontró arabinosa y sacarosa. En los brotes de naranja (N1) y limón (L1 y L2) de 3 – 4 cm se encontró glucosa y galactosa,

presentando la mayor concentración de galactosa los brotes de naranja: 10617.90 mg/gr de extracto. En la figura 28, se observa una mayor resolución de los picos en el cromatograma para cada carbohidrato identificados de los brotes de toronja, mientras que para los brotes de naranja (Figura 28) y limón (Figura 29) fue necesario hacer un ajuste para realizar la identificación de los carbohidratos.

Tabla 2. Carbohidratos identificados en brotes de cítricos de 3 – 4 cm y concentración (mg/g de extracto)

TR (min)	Carbohidratos	Toronja	Naranja	Limón	
		T1	N1	L1	L2
12:36	Arabinosa	4303.80	-----	-----	-----
11:40	Galactosa	-----	10617.90	4367.9	2876.42
11:02	Glucosa	13557.31	9644.27	3223.96	2627.935
10:55	Sacarosa	991.74	-----	-----	-----

En los extractos de limón de 5 cm se identificaron galactosa, arabinosa y glucosa; el carbohidrato con mayor concentración en ambos extractos fue la glucosa 12450.59 y 10592.89 mg/gr de extracto, respectivamente; seguido de galactosa y arabinosa (Tabla 3). En los cromatogramas de la figura 30 para la identificación de los carbohidratos se realizó un ajuste de cada uno debido a que la separación de los picos no fue completa.

En el análisis de los brotes de naranja (N1) de 5 cm se identificó galactosa, glucosa e inositol y en el otro extracto (N2), galactosa, glucosa y arabinosa. Haciendo una comparación entre los brotes de limón y naranja se encontraron diferencias respecto a los carbohidratos identificados, en un extracto se encontró inositol y en el otro arabinosa. En ambos extractos de limón (L1 y L2) de 5 cm como se puede observar en la tabla 3, los carbohidratos presentes en mayor concentración fueron galactosa y glucosa. Respecto a los cromatogramas obtenidos en estos extractos, fue necesario ajustarlos para lograr identificar los carbohidratos presentes,

debido a que los picos no presentaron una buena separación probablemente por el tipo de hidrólisis realizada (Figura 31).

En estudios previos de composición de carbohidratos presentes en aceites esenciales, cascara y tejido vegetal de cítricos analizados independientemente por Nisperos-Carriedo *et al.*, 1992, Roman *et al.*, 1994 y Grohmann 1999, se encontró glucosa, fructosa, sacarosa en los aceites esenciales, por otro lado en el análisis de cascara y tejidos vegetales se encontró la presencia de galactosa, glucosa, fructosa y sacarosa. En la revisión bibliográfica realizada en el presente estudio se encontró escasa información sobre la composición de carbohidratos en tejidos de plantas cítricas.

Tabla 3. Carbohidratos identificados en brotes de cítricos de 5 cm y concentración (mg/g de extracto)

TR (min)	Carbohidratos	Naranja		Limón	
		N1	N2	L1	L2
12:36	Arabinosa	-----	368.24	391.26	138.09
11:39	Galactosa	3835.23	6214.49	6356.53	5007.11
10:94	Glucosa	2953.10	8932.80	12450.59	10592.89
11:11	Inositol	3833.99	-----	-----	-----

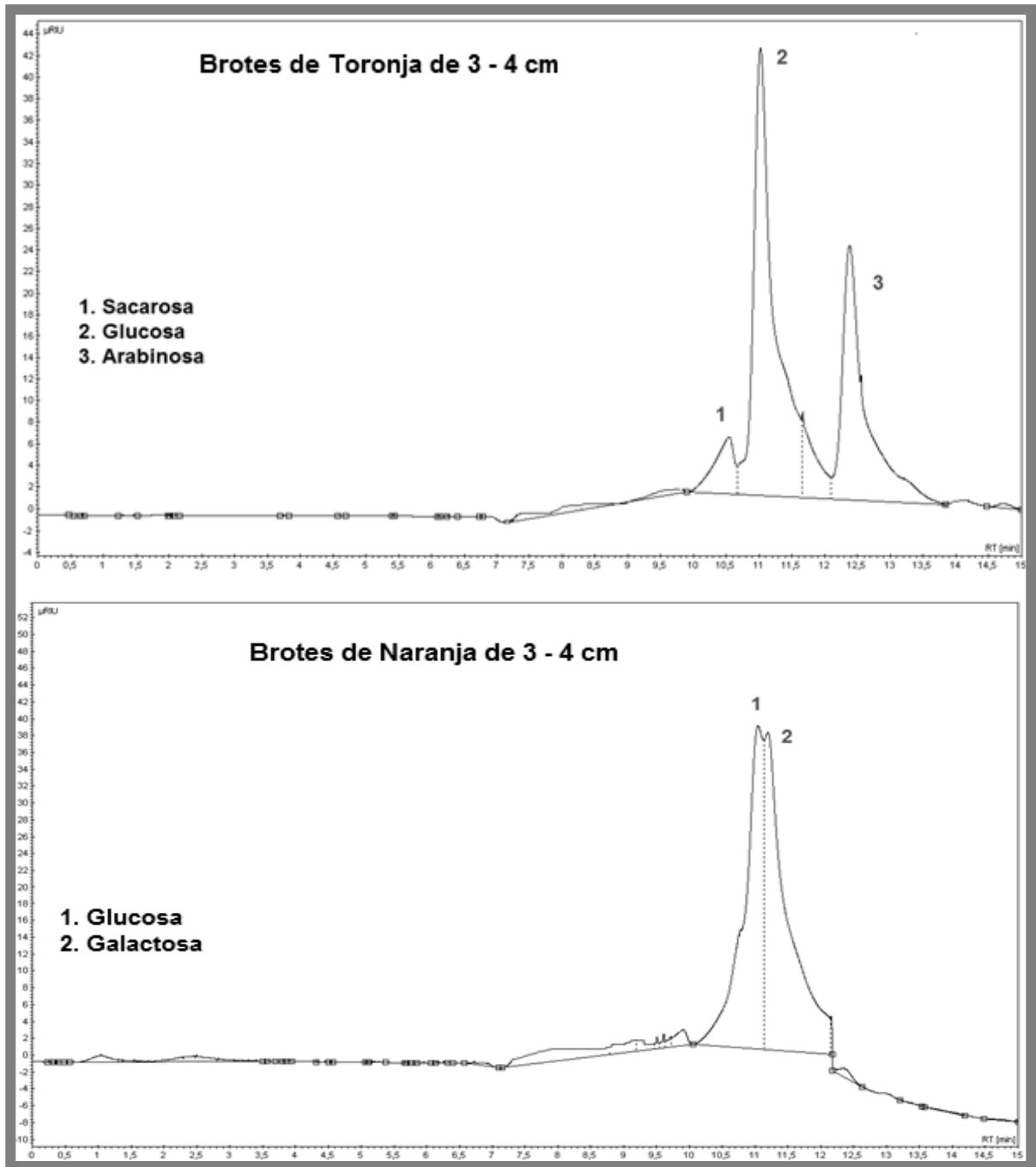


Figura 28. Cromatogramas HPLC de brotes de toronja y naranja de 3 - 4 cm, y carbohidratos identificados.

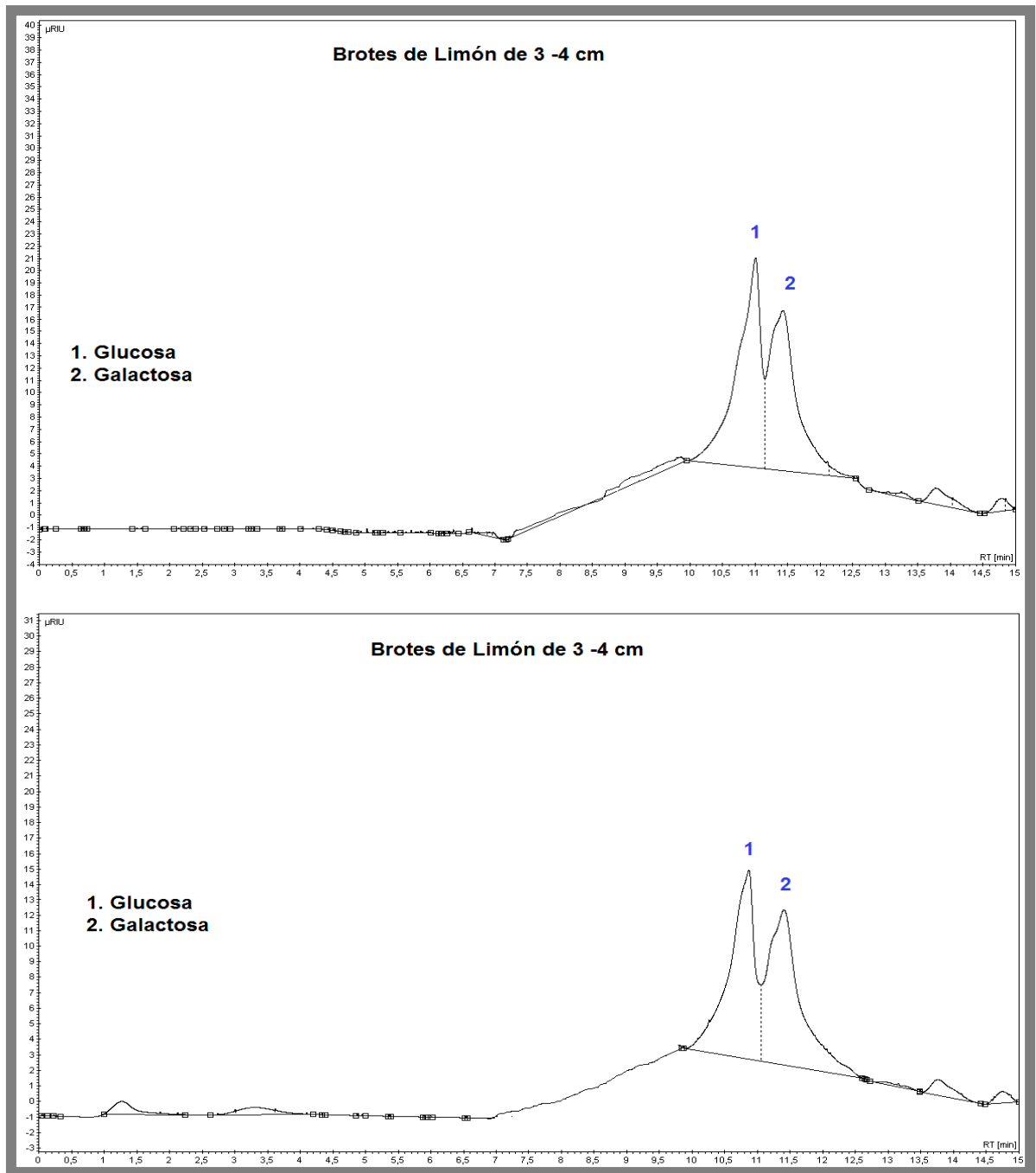


Figura 29. Cromatogramas HPLC de brotes de limón de 3 - 4 con carbohidratos identificados.

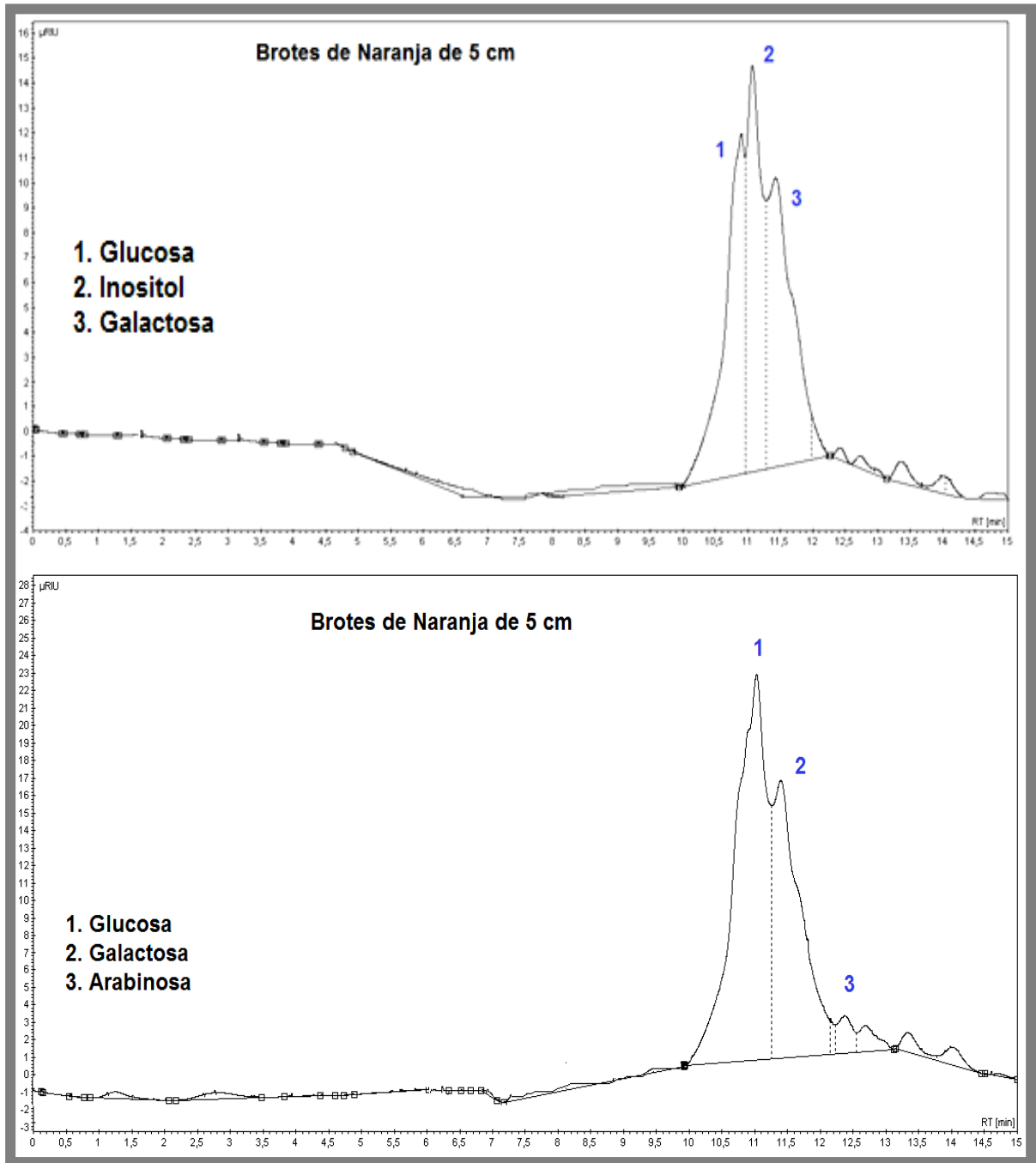


Figura 30. Cromatogramas HPLC de brotos de naranja de 5 cm con carbohidratos identificados.

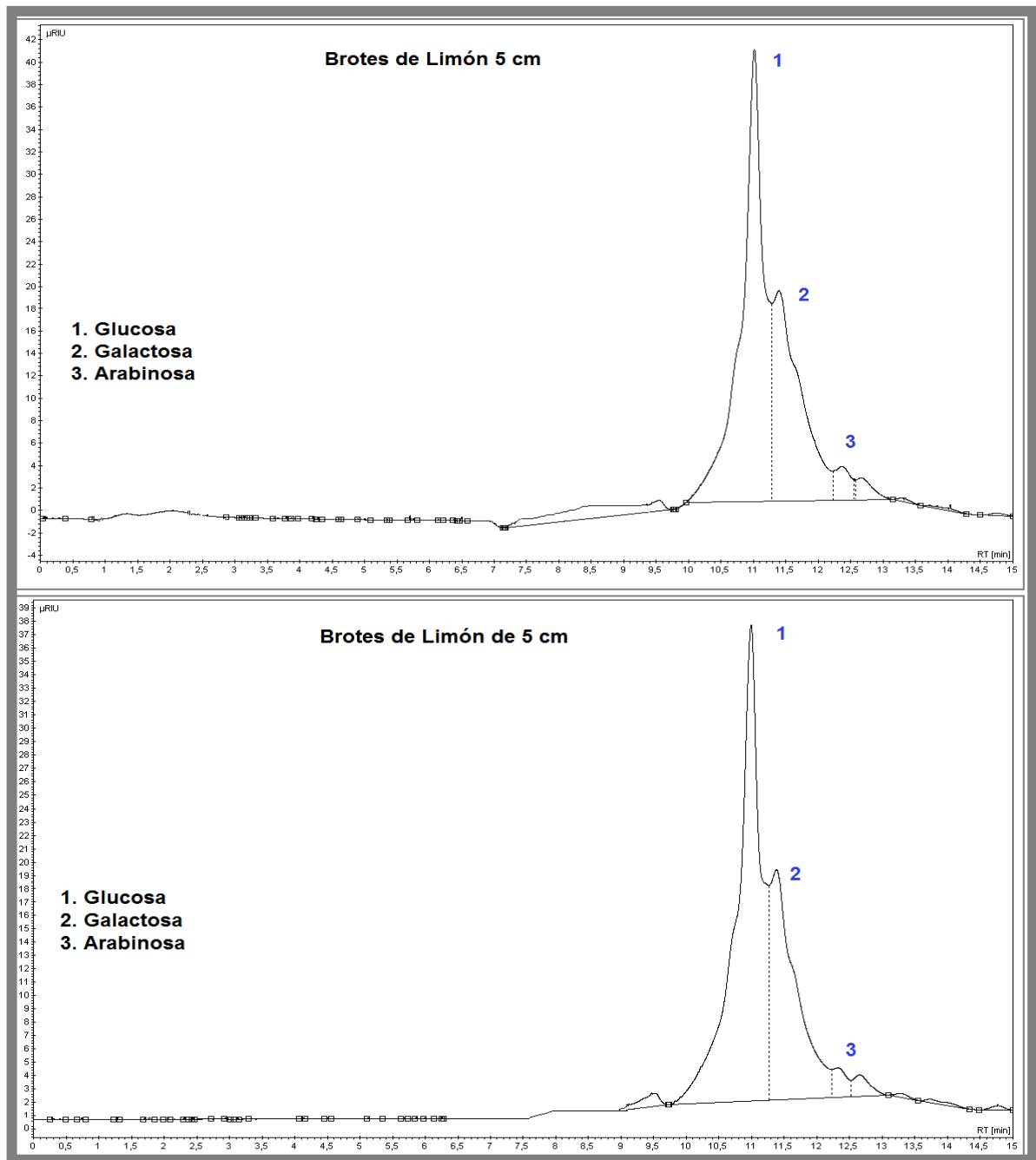


Figura 31. Cromatograma HPLC de brotes de limón de 5 cm con carbohidratos identificados.

Identificación Carbohidratos en Fracciones de Brotes de Toronja por HPLC

Debido a que los carbohidratos son solubles en solventes polares, se analizaron las fracciones metanólica y acuosa obtenidas del fraccionamiento por polaridad creciente del extracto crudo de toronja de 3 – 4 cm. En el análisis de los cromatogramas obtenidos por HPLC de estas fracciones, se identificaron los carbohidratos: glucosa, arabinosa, fructosa y sacarosa. Comparando con el análisis del extracto crudo en el cual se identificaron glucosa, arabinosa y sacarosa se observó que fructosa no fue identificada, debido a que el fraccionamiento permite la extracción exhaustiva de los componentes del material vegetal.

En la fracción metanólica de los brotes de 3 – 4 cm se identificaron glucosa, arabinosa y sacarosa, como se muestra en el cromatograma de la Figura 32. La mayor concentración fue la de glucosa con 11304.35 mg/g de extracto y en menor concentración la arabinosa con 1227.87 mg/g de extracto (Tabla 4).

En el extracto acuoso de los brotes de 3 – 4 cm se identificaron glucosa, arabinosa y fructosa, como se muestra en el cromatograma de la Figura 32; encontrándose en mayor concentración la glucosa con 750.99 mg/g de extracto, al igual que en el extracto metanólico, y en menor concentración la arabinosa con 322.21 mg/g de extracto (Tabla 4).

Tabla 4. Carbohidratos identificados en extracto acuoso y metanólico de brotes de toronja de 3-4 cm (mg/g de extracto)			
TR (Min)	Carbohidratos	Acuoso	Metanólico
11:02	Glucosa	750.99	11304.35
12:36	Arabinosa	322.21	3521.3
11:66	Fructosa	352.04	-----
10:61	Sacarosa	-----	1227.87

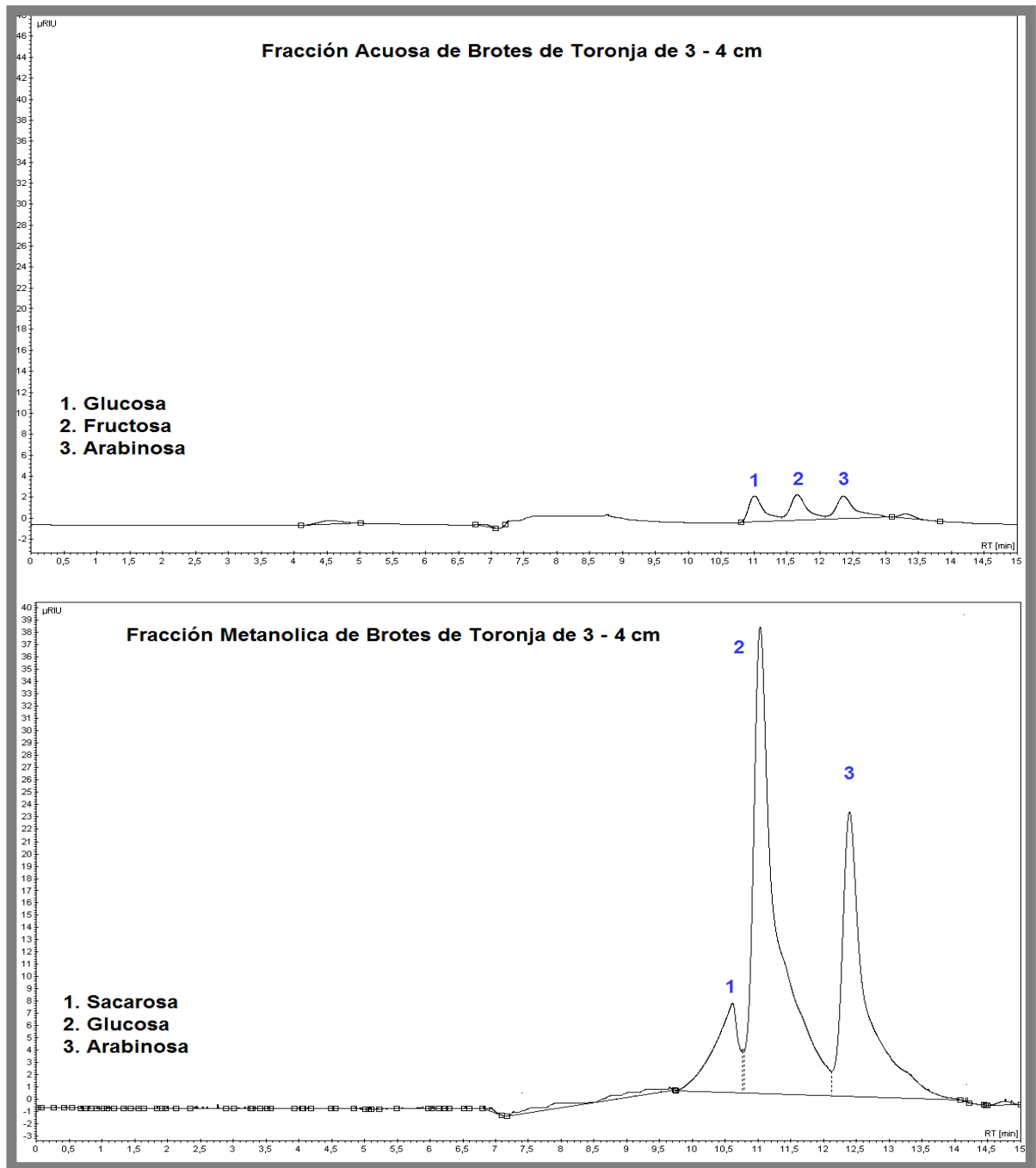


Figura 32. Cromatograma HPLC de la fracción acuosa y metanólica de los brotes de toronja de 3 – 4 cm con carbohidratos identificados.

CONCLUSIONES

- ✓ Se identificaron los carbohidratos presentes en los diferentes brotes cítricos de 3 - 4 y de 5 cm utilizando el método de HPLC, previa hidrólisis suave con TFA. A pesar de que se logró identificar los diferentes carbohidratos, se observó que el uso del TFA interfirió en la hidrólisis completa de los extractos de limón y naranja, teniendo como evidencia la mala resolución de los picos obtenidos en los cromatogramas.
- ✓ El análisis por HPLC de los brotes de los cítricos que comprendió el estudio, indicó principalmente la presencia de glucosa, galactosa y arabinosa, además de fructosa, sacarosa e inositol; siendo estos carbohidratos utilizados por las ninfas e insectos adultos de *D. citri* en su alimentación. Una manera de evidenciar esto es por las secreciones (cera y mielecilla) que produce a partir del exceso de carbohidratos consumidos.
- ✓ No se encontraron diferencias en la composición cualitativa de los carbohidratos identificados en los extractos de los tres brotes de cítricos, por lo cual podemos inferir que la atracción del insecto hacia sus plantas hospedero no se debe a la composición de carbohidratos presentes, sino a las diferentes moléculas de señalización (compuestos volátiles) que emiten estas plantas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de ácido sulfúrico para realizar la hidrólisis de las muestras y compararlo con los resultados obtenidos en este trabajo.
- Se recomienda la caracterización de carbohidratos en las distintas plantas hospederas y el análisis de azúcares en la hemolinfa de los insectos para determinar cuáles carbohidratos están presentes.
- Canalizar restudios biotecnológicos que desarrollen compuestos que inhiban la síntesis o el aprovechamiento de los carbohidratos por parte de los insectos.

BIBLIOGRAFÍA

- Achor D. S., Etxeberria E., Wang N., Folimonova S.Y., Chung K.R., Albrigo L.G. 2010. Sequence of Anatomical Symptom Observations in Citrus Affected with Huanglongbing Disease. *Plant Pathology Journal* 9(2): 56-64.
- Alfonso M. C. 2009. Desarrollo de Métodos para el Aislamiento y la Detección de Toxinas Marinas en Productos de la Pesca y la Acuicultura. Tesis Doctoral. Universidad De De Santiago De Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. 42p
- Ávalos G. A., Pérez-Urria C E. 2009. Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145 p.
- Badui D. S. 2006. Carbohidratos: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. *Bioquímica de los Alimentos*. 4ta ed. México. 31, 47, 75p.
- Baldwin E, Plotto A, Manthey J, McCollum G, Bae J, Irely M, Cameron R, Luzio G. 2010. Effect of Liberibacter Infection (Huanglongbing Disease) of Citrus on Orange Fruit Physiology and Fruit/Fruit Juice Quality: Chemical and Physical Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(2): 1247-1262.
- Baldwin T. I., Dicke M. 2010. The Evolutionary Context for Herbivore-Induced Plant Volatiles: Beyond the 'Cry For Help'. *Cell Press*. 15 (3): 167–175.
- Bruneton J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª Edición. Acribia, Zaragoza.
- Cabrera-Mireles, H., F. D. Murillo-Cuevas, J. A. Villanueva-Jiménez, U. A. Díaz-Zorrilla, y S.Cerezo-Aparicio. 2010. Enemigos naturales de *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae) en la región centro de Veracruz. En: Memoria del 1er Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México – 2010. Monterrey, N.L., Méx. p. 46-53.
- Camarena G. 2009. Señales en la Interacción Planta Insecto. *Rev. Chapingo* 15(1): 82- 83.
- Cárdenas R J. 2005. Producción Nacional de Cítricos, Gobierno de Veracruz. Obtenido en: http://www.concitver.com/15_9citricultura.html
- Casado D., Gemeno C., Avila J., Riba M. 2008. Diurnal Variation of Walnut Tree Volatiles and Electrophysiological Responses in *Cyndia pomonella* (Lepidoptera: tortricidae). *Pest Management Science*. 64: 736-747.
- Cataldi T. R. I., Campa, C. & De Benedetto, G. E. 2000. Carbohydrate Analysis By High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection: The Potential is Still Growing. *Fresenius J Anal Chem*. 368(8):739-758.

- Champam R F., Boer G. 1995. Regulatory mechanisms in insect feeding. 1ra ed. Champman & Hall. New York NY. 60-79 p.
- Chen P. S. (1985). Amino acid and protein metabolism. Comparative Insect Coquet, A., Haerdi, W., Degli, R. & Veuthey, J. L. 1994. Determination of sugars by liquid chromatography with post-column catalytic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia*. 38: 12-16.
- Dale E. W. 2013. Anatomía y Fisiología de Insectos: Nutrición. Curso en linea. Lima, Peru. 1-7 p.
- Deshpande S S., Cheryan M. 1987. Determination of Phenolic Compounds of Dry Beans Using Vanillin, Redox And Precipitation Assays. *J. Food Sci.* 52(2):332-334.
- Díaz C. C. 2010. Panorama Actual de la Citricultura en México, Secretaria de Gobernación, Instituto de Biotecnología de UNAM. Revista. 197p.
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.* 135(4): 1893–1902.
- Durón N. L., Valdez G.B., Nuñez M. J., Durazo A R., Martinez D.G. 2006. Calendario de Labores en Huertas de Naranja de la Costa de Hermosillo. Folleto Técnico Núm.29. Campo Experimental de la Costa de Herosillo, CIRNO-INIFAP. 80.
- Englyst H. N; Cummings J.H. 1987. Determination of Dietary Fiber in Cereals and Cereal Products. Collaboratives Trials. Part II: Study of Modified Englyst Procedure. Part III: Study of Further Simplified Procedures. *J. Assoc. Publ. Anal.* 25: 59-71, 73-110.
- Esquivel C. F., Valdovinos P G., Mora A G., Gómez J R., Velázquez M J., Manzanilla R M., Flores S L., López A I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por Candidatus *Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782.
- Fujikawa T1, Iwanami T. 2012. Sensitive and Robust Detection of Citrus Greening (Huanglongbing) Bacterium "Candidatus *Liberibacter Asiaticus*" By DNA Amplification With New 16S Rdna-Specific Primers. *Mol Cell Probes.* 26(5):194-7
- Frydman A., Weissshaus O., Bar-Peled M., Huhman D V., Sumner L. W., Marin F . R., Lewinsohn E., Fluhr R., Grassel J., Eyal Y. 2004. Citrus Fruit Bitter Flavors: Isolation and Functional Characterization of the Gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2-rhamnosyltransferase, a Key Enzyme in the Biosynthesis of the Bitter Flavonoids of Citrus. *Plant J.* 40: 88-100 p.
- García M R. 2009. Diferencias entre Metabolitos Primarios y Secundarios. *Mundo Científico* 7: 730-736.
- García N. M. 2007. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro.

- Gómez H. D. 2008. Experiences on HLB (Huanglongbing) Symptoms Detection in Florida. USDA-APHIS-PPQ-Citrus Health Response Program.
- Gottwald R. T. 2010. Current Epidemiological understanding of Citrus Huanglongbing. *Anna, Rev. Phytopathol.* 48: 119-139.
- Grafton-Cardwell E. E., Godfrey K. E., Rogers M. E., Childers C.C., Stansly P.A. 2006. Asian Citrus Psyllid. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Publication 8205.
- Grohmann K., Manthey J A., Cameron R C., Buslig B S. 1999. Purification of Citrus Peel Juice and Molasses. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4859–4867.
- Hall D., Matthew R., El-Desouky A., Halbert S. 2012. Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*, Vector of Citrus Huanglongbing Disease. Agriculture Research Service. United States. 207-218.
- Halliwell B., Murcia M. A., Chirico S., Aruoma O. I. 1995. Free Radicals and Antioxidants in Food and in vivo: What they do and how they work?. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35(1-2): 7-20.
- Harborne J. B. 1982. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic. 4th ed. San Diego, California. USA.
- Hausalo T. 1995. Analysis of Wood and Pulp Carbohydrates by Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. The 8th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Helsinki, Finland, Vol. III. 131-136 p.
- Hern A., Dorn S. 2004. A Female-Specific Attractant for the Codling Moth, *Cydia pomonella* from Apple Fruit Volatiles. *Die Naturwissenschaften.* 91(2): 77-80.
- INIFAP, 2011. Campo Experimental Costa de Hermosillo INIFAP. Fu Castillo A A. Principales plagas de cítricos en el estado de Sonora.
- Jagoueix S, Bove J. M., Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 44(3): 379-386.
- Loera G J., Reyes R A., López A J., Buck M. 2011. Forrajeo y Capacidad Depredadora de *Brachygastra Mellifica* (Hymenoptera: Vespidae) Nuevo Enemigo Natural de Ninfas de *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae) en México. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México.
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Camargo, L.E.A., Wulff, N.A., Texeira, D.C., Bassanezi, R.B., Beattie, G. A.C. & Ayres, A.J. 2010. Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: incidence in urban areas and relatedness to citrus liberibacter. *Plant Pathology*, 59: 1044-1053.
- López M. M. Plan de Trabajo Periodo 2009 – 2012 en Campo Agrícola, Situación Nacional de la Citricultura, Cámara De Diputados Del H. Congreso De La Unión. 8.

- Luis M., Collazo C., Llauger R., Peña I., Batista L., Texeira D., Kitajima E., Bové J. M. 2010. Identificación y Diagnóstico de la Bacteria *Candidatus Liberibacter Asiaticus* Asociada a la Enfermedad "Huanglongbing" de los Cítricos en Cuba. Simposio Internacional Citricola.
- Marin J. C., Céspedes C.L. 2007. Compuestos Volátiles de Plantas. Origen, Emisión, Efectos, Análisis y Aplicaciones al Agro. Rev. Fitotec. Mex. 30 (4): 327-351.
- Martínez J., Suárez A., Valenzuela J. 2011. Manejo Regional del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) Management in Southern Sonora, México. 20 Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y El Huanglongbing En México.
- Martínez L. P. 2012. Identificación de Volátiles de Brotes Tiernos de Limón Mexicano, *Citrus aurantifolia* S. por MEFS y CG/EM y su Potencial de Atracción en *Diaphorina citri* K., Plaga de los Cítricos. Tesis Profesional. Hermosillo, Sonora, México.
- Martínez, F. 2005. Inducción de Defensas en los Cultivos, Productos Fitofortificantes. ICEA. Barcelona: Servalesa. 33p.
- Mascorro-Gallardo J.O., Avonce N., Iturriaga G. 2005. Biotecnología de la Trehalosa en las Plantas. Revista Chapingo: Serie Horticultura. 11(2): 193-202.
- Manthey, J.A., Grohmann, K. 2001, Phenols in Citrus Peel Byproducts: Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. Journal of Agricultural Food Chemistry 49: 3268 p.
- McDonald K. L.; Garby A.C. 1983. Gas Chromatography for Carbohydrates. Teppi Journal. 66(2).
- Melo V., Cuamatzi O. 2007. Carbohidratos: Estructura y Función Biológica. Bioquímica de los Procesos Metabólicos. 2da ed. México D.F. México. 43-52p.
- Mello M. O. y Silva-Filho M. C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms Braz. J. Plant Physiol., 14(2):71-81.
- Montoliu V.A. 2010. Respuestas Fisiológicas de los Cítricos Sometidos a Condiciones de Estrés Biótico y Abiótico. Aspectos comunes y específicos. Advances in Insect Physiology. Vol 31.
- Mullins, D. E. 1985. Chemistry and physiology of the hemolymph. Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. New York. 3: 355–400p.
- Murray R G, Stackebrandt E. 1995. Taxonomic note: Implementation of the Provisional Status *Candidatus* for incompletely Described Procaryotes. International Journal Of Systematic Bacteriology. 45(1): 186-187.
- Nisperos-Carriedo M O., Baldwin E A., Moshonas M G., Shaw P E. 1992. Determination of Volatile Flavor Components, Sugars, and Ascorbic, Dehydroascorbic, and Other Organic Acids in Calamondin (*Citrus mitis* Blanco). J. Agrlc. Food Chem. 40: 2464-2466.

- OEPP/EPPO, 2005.. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Diagnostic of *Diaphorina citri*. (35): 331-333.
- Palomino, O. 2001. Métodos Analíticos para la Identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
- Patt J M., Se'tamou M. 2010. Responses of the Asian Citrus Psyllid to Volatiles Emitted by the Flushing Shoots of Its Rutaceous Host Plants. *Environ. Entomol.* 39(2): 618-624.
- Pedro C. Gonzalez, Ed Etxeberria, Diann Achor, William Dawson, Timothy Spann, Jamie D. Yates and Gene Albrigo. 2012. Uso de la Reacción Almidón – Yodo para la Selección de Hojas Sospechosas con HLB: Distribución Anatómica de Niveles Anormalmente Altos de Almidón en Arboles de Naranja Valencia Positivos al HLB. Citrus Research and Education Center.
- Petiard, V., Bariaud F A. 1987. El Cultivo de Células. *Mundo Científico* 7: 730-736.
- Prinsen P. 2010. Composición Química de Diversos Materiales de Interés Industrial y Análisis Estructural de Ligninas. Departamento de Biología Vegetal. Sevilla. 13p.
- Robbins R. 2003. Phenolic acids in foods: an Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2866-2887.
- Romani A., Baldi A., Tattini M., Vincieri F. F. 1994. Extraction, Purification Procedures and HPLC-RI Analysis of Carbohydrates in Olive (*Olea europaea* L.) Plants. *Chromatographia.* 39: 35-39.
- Romo López N A. 2012. Caracterización Química Preliminar de los Brotes Tiernos de Naranja, Limón y Toronja y Evaluación de sus Extractos en Bioensayos para *Diaphorina citri* K. Plaga de los Cítricos. Tesis Profesional. Hermosillo Sonora.
- Rubinson A. K., Rubinson F. J. 2001. Análisis Instrumental: Introducción General de las Separaciones y la Cromatografía. 1er ed. Madrid. 584 p.
- Rydlund A., Dahlman O. 1995. Analysis of Wood-derived Oligosaccharides Using Capillary Electrophoresis. The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Helsinki, Finland, Vol. III. 159-164 p.
- SAGARPA, 2014. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Sanidad Vegetal. Situación fitosanitaria actual: Huanglongbing de los cítricos.
- Segura, J. 2006. Desarrollo Vegetal. Introducción al Desarrollo. Concepto de Hormona Vegetal. *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* 351-376.
- SENASICA, 2014. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Principales Estados Infectados con HLB en México.

- SENASICA, 2014. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Ficha Técnica: *Diaphorina citri* Kuwayama Psílido asiático de los cítricos.
- SIACON-SAGARPA, 2012. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Producción de Cítricos a Nivel Mundial en 2012.
- SIAP-SAGARPA, 2011. Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Producción Nacional Agrícola por Cultivo de Cítricos, Cíclicos y Perennes.
- SIAP-SAGARPA, 2012. Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Producción de Cítricos a Nivel Mundial en 2012.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. 1991. Spectrometric identification of organic compounds. 5ª ed., Wiley, Nueva York, E.E.U.U.
- Simpson S J., Abisgold J D. 1985. Compensation by locusts for changes in dietary nutrients: behavioural mechanism. *Physiol. Entomol.* 10: 443-452.
- Skoog D. A. 2003. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 6th ed. Barcelona.
- Solomon P. E., Berg R. L., Martin W. D. 2008. *Carbohidratos de Reserva y Estructurales. Biología*. 8va ed. México D.F. México.
- Soon kim, J. Shankar Sagaram, U. Burns, J., Liang Lin, J. y Wang, N. 2008. Responses of Sweet Orange (*Citrus sinensis*) to 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' Infection: Microscopy and Microarray Analyses. Department of Microbiology and Cell Science. University of Florida.
- Stephen Ball, Linda Lloyd. 2011. Agilent Technologies, Inc. Published in USA.
- Sun R.C., Tomkinson J., Wang Y.X. y Xiao B. 2000. Physico-chemical and Structural Characterization of Hemicelluloses from Wheat Straw by Alkaline Peroxide Extraction. *Carbohydrate Polymers*. 41: 2647-2656.
- Suzuki, J., Umeda, Y., Kondo, A., Kato, I. 1992. Analysis of Oligosaccharides by on-line High-Performance Liquid Chromatography and Ion-Spray Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 207(2):203-207.
- Thatcher, L. 2005. Plant Defense Response: What have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology*. 1-19.
- Teleman A., Tenkanen M., Vuorinen T. 1995. Identification of the Acidic Degradation Products of Hexenuronic Acid by NMR spectroscopy. The 8th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, Helsinki, Finland, Vol. III. 109-114 p.

- Tenkanen M., Hausalo T., Siika-ako M., Buchert J., Viikari L. 1995. Use of Enzymes in Combination with Anion Exchange Chromatography in the Analysis of Carbohydrate Composition of Kraft Pulps. The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Helsinki, Finland, Vol. III. 189-194 p.
- Thompson S. N. 2003. Trehalose – The Insect ‘Blood’ Sugar. *ADVANCES IN INSECT PHYSIOLOGY*. 31: 234.
- Tofiño A., Fregene M., Ceballos H., Cabal D. 2006. Regulación de la Biosíntesis del Almidón en Plantas Terrestres: Perspectivas de Modificación. *Acta Agronómica, Colombia*. 55(1).
- Vallat A., Dorn S. 2005. CHanges in Volatiles Emissions from Apple Trees and Associated Response to Adult Female codling Moths over the Fruit-Growing Season. *J Agric Food Chem*. 53: 4083-4090.
- Vérette, E., Qian, F., Mangani, F. 1995. On-line Dialysis with High Performance Liquid Chromatography for the Automated Preparation and Analysis of Sugars and Organic Acids in Foods and Beverages. *J. Chromatogr*. 705(2):195-203.
- Vermerris W., Nicholson R. 2006. Phenolic Compound Traditional Medice in the State of Perak, Penisular Malaysia. *Fitoterapia*. 75: 68-73
- Waldbauer G P., Bhattacharya A K. 1988. Diversity of Self-selection by insects pp 403-422. In *physiological insect Ecology Vol I Poland Tech Univ Press*

ANEXOS

ANEXO A

Importancia de la Citricultura en México

Los cítricos constituyen un producto agrícola de gran importancia en México, siendo fuente de ingresos y empleo en zonas rurales, además de formar parte importante de la dieta de la población. Nuestro país ocupa el 4to. lugar en producción de cítricos a nivel mundial y se reporta una superficie de 526 mil hectáreas de estos frutales, distribuidas en 23 entidades federativas, con una producción de 6.7 millones de toneladas anuales, y un valor superior a los 8 mil 50 millones de pesos. (SIAP, 2006). México tiene el primer lugar en producción de limón “mexicano” y el segundo en limón “persa”. La citricultura es una actividad redituable en aspectos económicos para el productor, ecológicos al no utilizar demasiados agroquímicos como en otros cultivos e importante desde el punto de vista social al generar mano de obra durante todo el año (SENASICA, 2014).

Se estima que de la actividad citrícola dependen más de 90,000 familias mexicanas, quienes desarrollan su actividad en la superficie establecida de cítricos que supera las 512 mil hectáreas las cuales producen un promedio anual de 6.97 millones de toneladas de frutas (SIACON-SAGARPA, 2012).

La citricultura en México se realiza en regiones con clima tropical y sub-tropical, localizadas en 26 entidades federativas (SAGARPA, 2012). Dentro de las especies de cítricos más importantes desde el punto de vista agronómico para nuestro país, se encuentra la naranja dulce (*Citrus sinensis* [L.] Osbec), el limón ácido: limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) y limón persa (*Citrus limón* Burnm. F.), la mandarina (*Citrus reticulata*), la toronja (*Citrus x paradisi* Macf.), y que en suma representan más del 94 % de la superficie sembrada y cosechada de cítricos (SIAP-SAGARPA, 2011; López, 2011).

La información proporcionada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el 2012, indicó que la producción de naranja (*Citrus sinensis*) alcanzó entre 3.5 y 4 millones de toneladas, constituyéndose México como el quinto productor a nivel mundial de naranja y jugo, después de Brasil y los Estados Unidos.

La geografía productiva se encuentra bien definida, 91% de la producción total está concentrada en solo 10 estados. La mayoría de las entidades se encuentran en la costa del Golfo de México, abarca los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán, y cercanos a estos Nuevo León y Puebla. Por el otro lado, en la costa del Pacífico encontramos a Sonora, Colima, Michoacán y Oaxaca (SIACON-SAGARPA, 2012). Siendo los principales productores de cítricos en el país los estados de Veracruz (55% del total nacional), San Luis Potosí y Tamaulipas, así como Puebla y Nuevo León (Figura A1) (SIAP-SAGARPA, 2012).

En Sonora, los cítricos después de la vid son los frutales de mayor importancia, destacándose en la producción de naranja (*Citrus sinensis*) variedad: Valencia y Navel, toronja (*Citrus x paradisi*), mandarina (*Citrus reticulata*) y limón (*Citrus aurantifolia* S.). Sonora presenta una superficie comercial de 605,700.16 Ha con un rendimiento promedio de 24 ton/ha, distribuidas en los municipios de Caborca, Altar, Carbó, San Miguel de Horcasitas, Costa de Hermosillo, Guaymas, Empalme, Cajeme, Bácum, Benito Juárez, San Ignacio Río Muerto, Navojoa y Etchojoa (SIAP-SAGARPA, 2012).

Factores que Afectan la Producción de Cítricos

Los principales factores que influyen en la producción de cítricos en nuestro país y en otras naciones de Iberoamérica se encuentran fundamentalmente vinculados a la expansión de plagas y enfermedades, así como a la falta de programas de certificación del material de propagación. Por otro lado, el impacto de huracanes y las frecuentes inundaciones intercaladas con prolongados periodos de sequía que han estado presentes en los últimos años como consecuencia del cambio climático, han provocado grandes pérdidas en la producción de cítricos a nivel nacional, particularmente en la Cuenca del Caribe y el Golfo de México (Díaz, 2010). Sonora, no es la excepción y actualmente las plantaciones de vid y nogal han sido

opciones importantes en la reconversión agrícola que ha experimentado esta zona del país (Durón *et al.*, 2006).

Enfermedades de los cítricos

La problemática fitosanitaria de los cítricos es muy amplia, ya que son afectados por una gran cantidad de insectos, hongos, virus, bacterias y otros organismos parásitos. La importancia del ataque de insectos no radica únicamente en el daño directo que producen, sino en problemas conexos como es el caso de los insectos transmisores de enfermedades virósicas, infecciones bacterianas y toxinas.

Entre las enfermedades en los cítricos causadas por bacterias, se encuentra el “Cancro” o cáncer de los cítricos producido por la Bacteria *Xanthomonas campestris*; el Stubborn de los Cítricos, cuyo agente causal es *Spiroplasma citri*. La Clorosis variegada de los cítricos (CVC), la cual tiene como agente causal a la bacteria limitada al xilema, Gram negativa *Xylella fastidiosa*, y actualmente de mayor importancia a nivel mundial es la enfermedad de Huanglongbing (HLB) o enverdecimiento de los cítricos por sus devastadores síntomas, la cual es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* limitada al floema que tiene como vector al insecto *Diaphorina citri* Kuwayama (INIFAP, 2011).

Enverdecimiento de los Cítricos

Huanglongbing

Actualmente una de las enfermedades más graves a nivel mundial que sufren los cítricos es la conocida Huanglongbing (HLB), enverdecimiento de los cítricos o enfermedad del dragón amarillo, la cual fue detectada en México desde el 2009 (SAGARPA, 2014). El principal medio de transmisión de esta enfermedad es *Diaphorina citri* Kuwayama, psílido asiático de los cítricos; el cuál ha invadido Centro y Norte América desde 1990 (Hall *et al.*, 2012).

HLB al ser adquirida no tiene cura y provoca el debilitamiento y/o muerte de miles de árboles de cítricos en pocos años, la enfermedad se caracteriza por el desarrollo de clorosis y/o un moteado amarillo en las hojas y pérdida de las mismas (Balwin *et al.*, 2010, Hall *et al.*, 2012 y Gottwald, 2010). En los árboles infectados se puede observar un retraso en el crecimiento de la planta y de las raíces, venas de las hojas taponeadas, brotes amarillos, y en estadios avanzados de esta infección se pueden observar que el rendimiento y la calidad de los frutos se reducen, haciendo a estos poco adecuados para su procesamiento. En general, los síntomas aparecen primero en las hojas maduras cercanas a las puntas (parte superior) de las ramas y luego progresa a través del árbol entero (Lopes *et al.*, 2010).

Principales Estados de México Infectados con HLB

De acuerdo con datos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), la enfermedad de HLB se ha detectado en huertos comerciales y de traspatios en 16 de los 23 estados productores de cítricos de nuestro país, como son la península de Yucatán, Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche, Colima, Sinaloa, Michoacán, Chiapas, Baja California Sur, Hidalgo, Tabasco, Guerrero, Puebla, Zacatecas y por último Oaxaca. Figura A2 (SENASICA, 2014).

Esta situación ha dirigido los esfuerzos para detener esta enfermedad hacia el desarrollo de planes estratégicos que reduzcan las poblaciones y/o eliminen el insecto vector (*Diaphorina citri* Kuwayama), al mismo tiempo que se están llevando a cabo intensas investigaciones químicas, bioquímicas y moleculares tanto de las plantas de cítricos como del insecto, cuyos resultados permitan sumarse al esfuerzo de control de esta plaga (SENASICA, 2014).

En Sonora, se tiene la presencia del vector desde el año 2006, pero HLB no se ha detectado, sin embargo, ya ha sido reportado en estados vecinos. Ante esta amenaza se decidió establecer un plan piloto para el manejo del vector (Martínez *et al.*, 2011). Actualmente los municipios en los que se ha detectado la presencia de *Diaphorina citri* en el estado son San Ignacio Río Muerto, Benito Juárez, Villa Hidalgo, Soyopa, San Miguel de Horcasitas, San Luis Río Colorado, Navojoa, Huatabampo, Hermosillo, Guaymas, Etchojoa, Empalme, Carbo, Cajeme, Caborca, Bacum, Altar (SENASICA, 2014).

En el invierno del 2010 y primavera del 2011, se diseñó y estableció un plan piloto en el sur del estado de Sonora. El plan se fundamenta en la información generada a nivel nacional e internacional para el manejo de esta problemática. El principal objetivo es reducir el riesgo de dispersión del HLB, en caso de que se detecte, manteniendo controladas las densidades de población del vector y de esta forma proteger la citricultura del estado de Sonora (Martínez *et al.*, 2011).