



UNA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL DE MEZCLA-CANTIDAD PARA
EVALUAR EL EFECTO DE TRES FLAVONOIDES Y DOS ÁCIDOS
FENÓLICOS EN EL DESARROLLO DE LA MOSCA MEXICANA DE LA
FRUTA, *Anastrepha ludens* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

TESIS QUE PRESENTA **CARLOS ANDRÉS PASCACIO VILLAFÁN**
PARA OBTENER EL GRADO DE **MAESTRO EN CIENCIAS**

Xalapa, Veracruz, México 2012






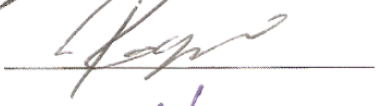

Aprobación final del documento de tesis de grado:

Título de la tesis en comillas:

"Una aproximación experimental de mezcla-cantidad para evaluar el efecto de tres

flavonoides y dos ácidos fenólicos en el desarrollo de la Mosca Mexicana de la Fruta,

Anastrepha ludens (Diptera: Tephritidae)"

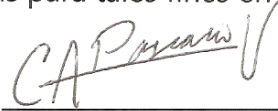
	Nombre	Firma
Director	Dr. Martín Ramón Aluja Schuneman Hofer	
Comité Tutorial	Dr. Trevor Williams	
	Dr. John Sivinski	
Jurado	Dr. Roger Enrique Guevara Hernández	
	Dra. Laura Teresa Hernández Salazar	

DECLARACIÓN

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Carlos Andrés Pascacio Villafán como estudiante de la carrera de Maestría en Ciencias entre septiembre de 2010 y agosto de 2012, bajo la supervisión del Dr. Martín Ramón Aluja Schuneman Hofer.

Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Candidato: Carlos Andrés Pascacio Villafán



Director de tesis: Dr. Martín R. Aluja Schuneman Hofer



RECONOCIMIENTOS

Especialmente a mi director de tesis, Dr. Martín Aluja, por la oportunidad de integrarme como estudiante al “Grupo Moscas de la Fruta” y realizar mi tesis dentro de una de sus líneas de investigación, así como por el total y absoluto apoyo académico y económico que me brindó durante el proceso de mis estudios.

A mi Comité Tutorial, Dr. Trevor Williams y Dr. John Sivinski por su tiempo, apoyo y orientación durante mis estudios, así como por sus importantes aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Roger Guevara y Dra. Laura Hernández por su participación como jurado de tesis y por sus comentarios y sugerencias en la redacción final del documento.

A la Dra. Andrea Birke, Dra. Larissa Guillén, Dr. Juan Rull y Dr. Rodrigo Lasa por sus valiosos comentarios a mi trabajo de tesis, e invaluable apoyo logístico en diferentes situaciones académicas. También a la Dra. Birke por su ayuda con la impresión de la tesis.

Al Dr. Stephen Lapointe y Dr. Randall Niedz por introducirme a los experimentos de mezclas, y por su asesoría durante la construcción y evaluación del diseño experimental usado en este estudio. Al Dr. Joerg Samietz y Dra. Eva Arrigoni por la información sobre las cantidades de compuestos fenólicos en manzanas y orientación en la compra de (+)- catechina.

A Stat-Ease, Inc, por las extensiones de prueba del software Design-Expert ® 8.

A Juan Carlos Moreno, Jovita Martínez, Israel Peralta, Alejandra Robledo, Lizbeth Gonzáles, Olinda Velázquez, Rafael Casas, Emilio Acosta y Lizette Cicero por su ayuda en diferentes etapas de este trabajo. A Nery Encarnación y Alma Fuentes por su ayuda, en la última fase experimental, con la preparación de las dietas, cría de moscas y toma de datos. A Violeta Navarro por su apoyo con diferentes trámites administrativos e impresión de la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para desarrollar estudios de Maestría en el Posgrado del Instituto de Ecología, A.C. (Becario No. 250320).

Este estudio fue financiado con fondos del convenio de colaboración APEAM-INECOL.

DEDICATORIA

Con amor a

Freya y Freyita

Fam. Pascacio Villafán

Fam. Ramírez Huber

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	9
1.1 Generalidades sobre los compuestos fenólicos.....	10
1.2 Los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas contra insectos herbívoros.....	11
1.3 Compuestos fenólicos vs. moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae).....	14
1.4 Efecto conjunto de metabolitos secundarios sobre insectos.....	16
1.5 Los experimentos de mezcla	20
2. SISTEMA DE ESTUDIO Y OBJETIVOS.....	21
2.1 Mosca Mexicana de la Fruta, <i>Anastrepha ludens</i> (Loew) (Diptera: Tephritidae).....	22
2.2 Flavonoides.....	22
2.2.1 Rutina.....	23
2.2.2. Floridzina	23
2.2.3 (+)- Catequina.....	24
2.3 Ácidos fenólicos.....	24
2.3.1 Ácido clorogénico.....	24
2.3.2 Ácido p-cumárico	25
LITERATURA CITADA	26
3. A MIXTURE-AMOUNT APPROACH TO ASSESS THE EFFECT OF THREE FLAVONOIDS AND TWO PHENOLIC ACIDS ON DEVELOPMENTAL PERFORMANCE OF <i>Anastrepha ludens</i> (Diptera: Tephritidae)	36
Abstract	38
Introduction	39
Materials and methods	42
<i>Test compounds</i>	42
<i>Source of insects</i>	43
<i>General procedure</i>	43
<i>Experimental approach</i>	44
<i>Data analysis</i>	45
Results.....	46
<i>Larval weight</i>	46
<i>Larval development time</i>	47

<i>Pupal development time</i>	47
<i>Emergence of deformed adults</i>	48
Discussion	48
Acknowledgments	53
References	54
Figure legends.	62
Figures	63
Tables.....	67
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	72
LITERATURA CITADA.	74

1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LA LITERATURA

Una de las interacciones más comunes y predominantes en la naturaleza es la que ocurre entre plantas y herbívoros, incluidos insectos (Carmona *et al.* 2011). De hecho, se estima que más del 40% de la biodiversidad del planeta la conforman las plantas y los insectos que se alimentan de ellas (Price 2002), y que cada especie de planta es consumida por al menos una especie de insecto (Gatehouse 2002). Esta relación entre plantas e insectos ha tenido lugar desde hace más de 350 millones de años, periodo durante el cual, las plantas han desarrollado diversos sistemas de defensa para resistir el impacto de la herbivoría (Gatehouse 2002). Uno de estos sistemas defensivos incluye el uso de metabolitos secundarios como armas químicas que afectan negativamente el crecimiento, reproducción o fecundidad del herbívoro (Wu y Baldwin 2010).

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que, a diferencia de los metabolitos primarios (e.g., carbohidratos y proteínas), no son esenciales para el metabolismo básico de fotosíntesis o respiración (Theis y Lerdau 2003). Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios los cuales varían de una especie a otra (Croteau *et al.* 2000). Muchos de estos compuestos tienen un significado adaptativo importante en la protección contra la herbivoría e infecciones microbianas, como atrayentes de polinizadores y animales dispersores de semillas, y como agentes alelopáticos, es decir, aleloquímicos que influyen en la competencia entre especies de plantas (Croteau *et al.* 2000). Los metabolitos secundarios pueden ser clasificados en tres grandes grupos: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Croteau *et al.* 2000), siendo estos últimos uno de los grupos más comunes y extensos de metabolitos secundarios de plantas (Lattanzio *et al.* 2006).

1.1 Generalidades sobre los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sintetizados por la vía del ácido shikímico y/o la vía del ácido malónico durante el desarrollo de las plantas así como en respuesta a daños físicos, infecciones o estrés (Lattanzio *et al.* 2006, Ferrazzano *et al.* 2011). Químicamente constan de un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.), y comprenden una amplia variedad de moléculas como los flavonoides, ácidos fenólicos y lignanos, entre otros (Lattanzio *et al.* 2006, Ferrazzano *et al.* 2011). Aunque están presentes en todas las partes vegetativas, flores y frutos de las plantas (Ferrazzano *et al.* 2011), su concentración varía de un tejido a otro y es afectada por diversos factores tales como la estacionalidad (Zou y Cates 1995), y en particular en las plantas cultivadas, por las prácticas de cultivo (e.g., orgánica o inorgánica), el manejo poscosecha de frutos, o la etapa de maduración del tejido que los contiene (Cisneros-Cevallos 2003, Veberic *et al.* 2005, Xu *et al.* 2008).

Los compuestos fenólicos son importantes para la supervivencia de las plantas, pues están involucrados en la protección contra radiación solar, en la reproducción, crecimiento, y resistencia al ataque de patógenos y herbívoros (Lattanzio *et al.* 2006). De hecho, han sido propuestos como la única clase de moléculas de defensa putativa ubicua en plantas (Appel 1993). El modo de acción defensivo de los compuestos fenólicos se debe a sus propiedades antibióticas, anti nutritivas o repulsivas (Lattanzio *et al.* 2006), y actúan como compuestos tóxicos, inhibidores de digestión o disuasorios de alimentación en herbívoros vertebrados e invertebrados (Appel 1993, Schoonhoven *et al.* 2005). Sin embargo, los efectos de estos compuestos en insectos herbívoros no son solamente negativos, sino también pueden ser positivos. Por ejemplo, algunos flavonoides pueden ser secuestrados en la cutícula del cuerpo del insecto para protegerse de patógenos y depredadores, o en las alas

para atraer parejas (Simmonds 2003). También, algunos flavonoides pueden estimular la alimentación u oviposición de insectos, y por lo tanto influir en la selección de plantas hospederas (Simmonds 2001).

1.2 Los compuestos fenólicos en la defensa de las plantas contra insectos herbívoros

El papel de los compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, así como su efecto en el desarrollo y comportamiento de insectos herbívoros, ha sido un tema de investigación por más de 50 años (e.g., Fraenkel 1959, Pree 1977, Diawara *et al.* 1993, Onyilagha *et al.* 2012), donde generalmente se han seguido dos aproximaciones experimentales. Por un lado, diversos estudios han determinado el perfil de algunos metabolitos secundarios en una serie de cultivares, genotipos o especies de plantas, en las cuales se han realizado pruebas de alimentación con insectos para evaluar su desarrollo y comportamiento en relación al contenido y concentración de estos compuestos en los tejidos vegetales de los que se alimenta (e.g., Pree 1977, Fulcher 1998, Patton *et al.* 1997, Mallikarjuna *et al.* 2004, Gogi *et al.* 2010). Por otro lado, numerosos experimentos han utilizado dietas artificiales o material vegetal del que se alimentan los insectos, donde el metabolito secundario de interés es agregado variando su cantidad de tal manera que cause un efecto (e.g., Stamp 1990, Stamp y Osier 1997, Lindroth y Peterson 1998, Calatayud 2000, Ikonen *et al.* 2001, Salvador *et al.* 2010).

Por ejemplo, Mallikarjuna *et al.* (2004) determinaron el contenido de los flavonoides quercetina y rutina, y del ácido fenólico ácido clorogénico en hojas de plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), cacahuete silvestre (*A. kempff-mercadoidi* Krapov. & W.C. Greg.), así como en derivados interespecíficos (*A. hipogea* x *A. kempff-mercadoidi*), y evaluaron la influencia de estos en el desarrollo del gusano soldado del tabaco, *Spodoptera*

litura (Fab) (Lepidoptera). En su estudio demostraron que existe una correlación positiva entre el contenido de flavonoides en las plantas y la mortalidad de larvas de *S. litura*, siendo el cacahuete silvestre y algunos derivados interespecíficos las plantas con mayor concentración de estos compuestos, y por lo tanto las más resistentes al ataque de esta plaga.

Fulcher *et al.* (1998) llevaron a cabo pruebas de alimentación con el escarabajo japonés, *Popillia japonica* Newman, en diez taxones de manzana, *Malus* spp., bajo condiciones de elección (i.e., el escarabajo pudo elegir entre los diez taxones) y no-elección (i.e., el escarabajo estuvo limitado a solo un taxón), así como experimentos con dieta artificial donde probaron el efecto individual de ocho compuesto fenólicos en concentraciones que variaron de 0 a 100 mM. Bajo condiciones de elección, ocho taxones resultaron resistentes, y en condiciones de no-elección tres. El contenido de los compuestos fenólicos en el follaje de los 10 taxones varió considerablemente, y se identificó a floridzina como el único compuesto relacionado con la resistencia de los taxones en las pruebas de elección y no-elección. En los experimentos con dieta artificial, se encontró que floridzina, floretina, naringenina y catequina son disuasorios de alimentación, mientras que quercetina y rutina fueron fagoestimulantes, y el ácido clorogénico actuó como disuasorio de alimentación en concentraciones altas y fagoestimulante en concentraciones bajas.

En experimentos con dietas artificiales, el consumo de rutina incrementó el tiempo de muda y en consecuencia la duración del estadio larval, y disminuyó la tasa relativa de crecimiento del gusano del tabaco, *Manduca sexta* (Linnaeus) (Lepidoptera), (Stamp 1990). Individuos del piojo harinoso de la yuca, *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera), que se alimentaron desde neonatos en dietas artificiales adicionadas con rutina, tuvieron un tiempo de desarrollo mayor y un peso de adultos menor en comparación

con individuos que se alimentaron de una dieta sin rutina (Calatayud 2000). Cuando la oruga del frijol terciopelo, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera), se alimentó en una dieta artificial adicionada con rutina y un bajo contenido de la proteína caseína, su tiempo de desarrollo aumentó, y la cantidad de dieta consumida y el peso de pupas disminuyeron, mientras que cuando se alimentó en una dieta con rutina y alto contenido de caseína o bajo contenido de caseína sin rutina, estos parámetros no se vieron afectados en relación a una dieta control, lo que demuestra que el efecto de este flavonoide varía en función del contenido proteínico de la dieta (Salvador *et al.* 2010).

El ácido clorogénico retrasó el crecimiento de la oruga bellotera *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera), y redujo el peso y tiempo de desarrollo de larvas del gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera) (Stamp y Osier 1997). También inhibió la alimentación del escarabajo del sauce, *Plagioderia versicolora* Laicharting (Coleoptera), (Jassbi 2003). Beninger *et al.* (2004) encontraron que concentraciones de 100 y 1000 ppm de ácido clorogénico agregado a la dieta artificial de los lepidópteros *Trichoplusia ni* Hübner y *Lymantria dispar* L. causaron una reducción en el peso y crecimiento de larvas.

Ikonen *et al.* (2001) evaluaron el efecto de ácido clorogénico aplicado en hojas de *Salix cinerea* L. y *S. phylicifolia* L. sobre el comportamiento de alimentación de cuatro especies de escarabajos de las hojas (Chrysomelidae), y encontraron que *Lochmaea capreae* L. siempre fue disuadido de alimentarse, *Phratora polaris* SP.-Schn. fue disuadido en hojas de *S. phylicifolia* pero no en hojas de *S. cinerea*, mientras que las otras dos especies de escarabajos no se vieron afectadas. Cuando larvas del quinto estadio del lepidóptero *Spodoptera eridiana* (Cramer) se alimentaron en hojas de haba de lima (*Phaseolus lunatus* L.) a las que previamente se aplicó una solución del flavonoide rutina,

la mortalidad aumentó, y los índices de crecimiento y de consumo de alimento disminuyeron (Lindroth y Peterson 1988).

1.3 Compuestos fenólicos vs. moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae)

Las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) son insectos holometábolos, distribuidos mundialmente en regiones templadas, sub tropicales y tropicales, donde algunas especies de los géneros *Bactrocera*, *Anastrepha*, *Rhagoletis*, *Ceratitis* y *Toxotrypana*, entre otros, son consideradas como plagas agrícolas de importancia económica (Christenson y Foote 1960, Aluja 1999). Las hembras de estas especies insertan sus huevos dentro de frutos o vegetales en proceso de maduración o maduros, y dependiendo de la especie, sus larvas se alimentan de la pulpa o semillas de estos, causando pérdidas económicas importantes pues estos frutos y vegetales ya no son comerciables (Christenson y Foote, 1960, Stonehouse *et al.* 1998, Aluja *et al.* 2000, Aluja y Mangan 2008).

Aparentemente, el primer estudio que abordó el tema de los compuestos fenólicos en la resistencia de las plantas al ataque de estas moscas fue el de Pree (1977), quien evaluó la resistencia de 19 cultivares de manzanas silvestres (*Malus* spp.) y una de tejocote (*Crataegus* sp.) al ataque de *Rhagoletis pomonella* (Walsh), y la correlacionó con el contenido de los compuestos fenólicos presentes en cada variedad. Además, determinó el efecto individual de algunos compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos) agregados a la dieta artificial de la que se alimentaron las larvas de esta mosca. Seis cultivares de manzana silvestre resultaron ser total o casi totalmente resistentes al desarrollo de larvas de *R. pomonella*, y el contenido total de los compuestos fenólicos fue mayor en los cultivares resistentes y menor en los susceptibles. La mayoría de los compuestos

fenólicos agregados a la dieta artificial en bajas concentraciones (10 y 100 ppm) resultaron en una mayor producción de pupas en comparación con la dieta control; sólo el ácido o-cumárico agregado a la dieta artificial a 100 ppm inhibió el desarrollo larval y redujo el número de pupas, mientras que todos los flavonoides (quercetina, naringenina y d-catequina [(+)-catequina]) evaluados a 1000 ppm causaron que ninguna larva sobreviviera hasta pupa.

En experimentos con dieta artificial, Manoukas (1993) determinó el efecto de cinco compuestos fenólicos relacionados estructuralmente (catecol, resorcinol, hidroquinona, pirogalol y floroglucinol), en seis concentraciones diferentes, sobre el crecimiento de larvas y desarrollo de *Dacus (Bactrocera) oleae* Gmel. El crecimiento y supervivencia de larvas, así como el peso de pupas disminuyó significativamente cuando se agregó catecol a la dieta artificial en concentraciones de 0.005 a 0.08%; los mismos parámetros fueron afectados por hidroquinona en concentraciones de 0.10 a 0.4%. El crecimiento y supervivencia de larvas disminuyó con concentraciones de 0.05 a 0.20% de resorcinol. Solo el catecol e hidroquinona disminuyeron la eclosión de huevos en concentraciones de 0.08 y 0.8%, respectivamente. Pirogalol y floroglucinol en concentraciones de 0.10 a 0.20 y 0.025 a 0.05% respectivamente, disminuyeron la supervivencia de larvas a pupas. Todos los fenoles evaluados, menos resorcinol, disminuyeron la emergencia de adultos.

Jalaluddin y Sadakathulla (1999) evaluaron el desarrollo y supervivencia de larvas de *Bactrocera correcta* (Bezzi), criadas en cuatro cultivares de guayaba, *Psidium guajava* L. Los cultivares con mayor contenido total de compuestos fenólicos fueron los más resistentes, y la emergencia y tamaño de adultos fue significativamente menor en estos cultivares.

Al evaluar las características bioquímicas en 13 genotipos de calabaza amarga, *Momordica charantia* L., asociadas a la resistencia contra *Bactrocera cucurbitae*

(Coquillet), en términos de infestación bajo condiciones de campo y densidad de larvas por fruto, Gogi *et al.* (2010) demostraron que la concentración total de los compuestos fenólicos (taninos, flavonoides y fenoles) en los genotipos resistentes fue significativamente mayor que en los genotipos susceptibles. Concluyen que, entre otras características biofísicas y bioquímicas de los frutos, los compuestos fenólicos (taninos, flavonoides y fenoles) están relacionados con la resistencia al ataque de esta mosca, por lo que estos pueden ser utilizados como rasgos marcadores en programas de fitotecnia para seleccionar genotipos resistentes.

En un estudio reciente, Aluja *et al.* (en preparación) realizaron infestaciones forzadas de la Mosca Mexicana de la Fruta, *Anastrepha ludens* (Loew), en 12 cultivares de manzana, *M. domestica* Borkh, con diferentes concentraciones de compuestos fenólicos. Encontraron que los cultivares con altas concentraciones de compuestos fenólicos fueron perjudiciales para *A. ludens*, pues inhibieron el desarrollo de larvas, y aumentaron los índices de mortalidad y deformidades en pupas, mientras que las larvas que se alimentaron en cultivares con bajas concentraciones de estos compuestos no fueron afectadas.

1.4 Efecto conjunto de metabolitos secundarios sobre insectos

No obstante se ha demostrado el efecto individual de varios metabolitos secundarios sobre el desarrollo de insectos herbívoros, diversos estudios han reconocido la importancia de evaluar el efecto en conjunto de estos compuestos ya que pueden existir interacciones antagónicas, aditivas o sinérgicas. Por ejemplo, Diawara *et al.* (1993) evaluaron la toxicidad individual de las furanocoumarinas lineales psoraleno, bergapteno y xantotoxina en siete concentraciones diferentes sobre *Spodoptera exigua*, y posteriormente probaron todas las combinaciones de la concentración letal al 25% (CL₂₅) de los tres compuestos

para estimar su efecto en conjunto. Los tratamientos fueron: control, psoraleno, bergapteno, xantotoxina, psoraleno + bergapteno, psoraleno + xantotoxina, bergapteno + xantotoxina, y psoraleno + bergapteno + xantotoxina. Individualmente, cada uno de los compuestos causó un aumento significativo en la mortalidad de *S. exigua*, mientras que las combinaciones psoraleno + bergapteno, psoraleno + xantotoxina, y psoraleno + bergapteno + xantotoxina resultaron tener un efecto antagónico en sus propiedades antiherbívoro, pues la mortalidad de *S. exigua* en estas combinaciones fue significativamente menor que la mortalidad obtenida al usar los compuestos de manera individual. Por otro lado, la combinación bergapteno + xantotoxina resultó en un efecto aditivo, es decir, la mortalidad obtenida con esta combinación resultó en la suma del efecto individual de cada uno de los compuestos mezclados en esta combinación.

Stamp y Yang (1996) examinaron el efecto individual y combinado de un alcaloide (tomatina), un flavonoide (rutina) y un ácido fenólico (ácido clorogénico), bajo un régimen térmico fluctuante, en tres especies de lepidópteros. Cada compuesto fue evaluado a la máxima concentración en la que se encuentra naturalmente en hojas de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill. Observaron interacciones entre los compuestos y la temperatura en dos especies. En el régimen térmico más cálido, rutina usada de manera individual, no causó ningún efecto en el crecimiento de *S. exigua*, el ácido clorogénico lo disminuyó ligeramente, y la combinación de ambos resultó en un efecto sinérgico, pues el crecimiento fue significativamente menor al de los compuestos individuales. También, reportaron una interacción aditiva de tomatina con ácido clorogénico o rutina, la cual retardó significativamente la tasa de desarrollo de *M. sexta*.

En bioensayos con discos de hoja, bajo condiciones de elección doble (control vs. tratamiento), Calcagno *et al.* (2002) estudiaron el efecto antialimentario de cinco

furanocoumarinas (cuatro lineales y una angular), usadas de manera individual y en combinaciones (mezclas) binarias, sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval). El rango de concentraciones usado para las furanocoumarinas lineales y la angular fue de 0-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja y 0-30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja respectivamente. Todas las furanocoumarinas examinadas de manera individual causaron varios grados antialimentarios; bergapteno fue la más activa en dosis bajas; conforme la dosis incrementó, xantotoxina mostró un mayor incremento en la actividad antialimentaria que lo mostrado por psoraleno, imperatorin y angelicin. La disuasión de alimentación relativa fue: bergapteno = xantotoxina > psoraleno = imperatorin = angelicin. Para las mezclas se utilizaron concentraciones totales de 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja para imperatorin-xantotoxina, 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja para imperatorin-psoraleno, y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja para angelicin-psoraleno, mientras que para la combinación imperatorin-bergapteno se usaron 1, 2 y 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja. Para cada mezcla las concentraciones se mantuvieron constantes, y la composición se ajustó a intervalos del 10% en el rango de 0-100% de uno de los componentes. Cuando imperatorin se mezcló con xantotoxina, bergapteno, o psoraleno, en un 40-75% del total de la mezcla, el efecto antialimentario fue mucho mayor que la suma de los compuestos individuales (i.e., fue sinérgico). La mezcla angelicin + psoraleno también resultó en un efecto sinérgico cuando angelicin se utilizó en un rango de 20-80% del total de la mezcla. Por otro lado, la mezcla angelicin + xantotoxina fue solo aditiva. En la concentración total de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de hoja, el efecto de la mezcla imperatorin + bergapteno fue sinérgico cuando el porcentaje de imperatorin fue > 60%, y antagónico cuando fue usado en porcentajes menores.

Para probar la hipótesis de que mezclas binarias de cuatro compuestos disuasorios de alimentación (dos fenoles y dos terpenoides) mitigarían la disminución en la respuesta antialimentaria de larvas de *Trichoplusia ni* tras una exposición prolongada a estos

compuestos de manera individual, Akhtar e Isman (2003) criaron larvas de *T.ni*, desde neonatas hasta el tercer estadio, en hojas de col, *Brassica oleracea* var. Stonehead, tratadas con cada compuesto de manera individual, así como con combinaciones binarias de estos (larvas con experiencia). Otro grupo de larvas fue criado en hojas no tratadas (larvas sin experiencia). La concentración de los compuestos evaluados tanto de manera individual como en las mezclas fue equivalente a la DC_{50} (concentración que causó el 50% de disuasión) obtenida en un estudio preliminar. Primero evaluaron: timol, digitoxina, xantotoxina, timol + digitoxina, timol + xantotoxina, y digitoxina + xantotoxina. Posteriormente, en un segundo experimento, la digitoxina fue remplazada por toosendanina. Los resultados mostraron que la respuesta antialimentaria de las larvas de *T. ni* a los compuestos evaluados, disminuyó después de una exposición prolongada cuando fueron usados de manera individual (excepto por la digitoxina), pero no disminuyó con las mezclas binarias. Todas las mezclas provocaron un efecto disuasorio aditivo cuando fueron presentados a larvas sin experiencia. En larvas con experiencia, todas las mezclas tuvieron un efecto antialimentario sinérgico.

Sin embargo, existe la problemática de que al considerar únicamente combinaciones de las CL_{25} , concentraciones máximas o DC_{50} de los compuestos evaluados, los estudios de Diawara *et al.* (1993), Stamp y Yang (1996) y Akhtar e Isman (2003), fallaron en tomar en cuenta el efecto de la proporcionalidad de los compuestos que formaron su mezcla. Aunque en el estudio de Calcagno *et al.* (2002) se consideró el efecto de la concentración y proporción de los compuestos evaluados y se reconoció su importancia en el efecto sobre el insecto estudiado, el diseño experimental y análisis aplicado no fue el más adecuado para abordar problemáticas con mezclas, pues estas requieren un enfoque estadístico especial desarrollado por Scheffé conocido como experimentos de mezcla (Cornell 2002).

1.5 Los experimentos de mezcla

Los experimentos de mezcla (EM) son un tipo especial de diseño del “Método de Superficie de Respuesta”, donde los factores son los componentes o ingredientes de una mezcla, y la variable de respuesta es una función de su proporción (Montgomery 2001). En estos experimentos, los niveles de los ingredientes no son independientes, es decir, si x_1, x_2, \dots, x_p son proporciones de p ingredientes en una mezcla, entonces $0 \leq x_i \leq 1$, donde $i = 1, 2, \dots, p$; y $x_1 + x_2 + \dots + x_p = 1$ ó **100%** (Montgomery 2001). Los EM permiten el análisis simultáneo de múltiples componentes, proporcionando información sobre el efecto de las interacciones entre ellos, y modelando efectos sinérgicos y antagónicos (Busch y Phelan 1999; Lapointe *et al.* 2008).

Los EM han sido utilizados principalmente en la formulación de productos para la industria química, farmacéutica, textil y alimentaria (Dal Bello y Vieira 2011), mientras que su aplicación en investigación sobre temas de agricultura y ecología ha sido limitada hasta la fecha (Busch y Phelan 1999; Bondari 2005). En cultivos hidropónicos, Schrevens y Cornell (1993) fueron los primeros en aplicar un diseño tipo EM para optimizar soluciones nutritivas. Posteriormente, Busch y Phelan (1999) realizaron el primer estudio de EM para describir una interacción ecológica en un sistema donde examinaron el efecto interactivo de la nutrición mineral (nitrógeno, azufre y fósforo) en el crecimiento de plantas de soya (*Glycine max* Merrill) y el desarrollo de un insecto y dos ácaros que se alimentan de ésta. Recientemente, los EM se han utilizado para optimizar la dieta artificial del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, (Foster *et al.* 2010), del pez blanco europeo, *Coregonus lavaretus*, (Ruohonen *et al.* 2003; Ruohonen y Kettunen 2004), y del gorgojo *Diaprepes abbreviatus* (L.), una de las principales plagas de cítricos en el Caribe y sur de EUA (Lapointe *et al.* 2008, 2010a, 2010b). Los EM han sido de gran utilidad para

optimizar medios artificiales de cultivo *in vitro* de varias especies de cítricos (*Citrus* spp.) (Niedz y Evens 2008, Niedz y Evens 2011, Marutani-Hert *et al.* 2011), y continúan utilizándose en el estudio de interacciones ecológicas (Beanland *et al.* 2003).

En el área de ecología de plantas e insectos, en sistemas multivariados conceptualizados como mezclas, los EM pueden ser útiles para estudiar mezclas de feromonas, compuestos secundarios, volátiles de plantas, dietas artificiales, mezclas de especies de plantas (e.g., plantaciones mixtas), e interacciones ecológicas, por lo que su aplicación en investigaciones sobre estos temas siempre debe ser considerada (Busch y Phelan 1999, Beanland *et al.* 2003, Lapointe *et al.* 2008).

2. SISTEMA DE ESTUDIO Y OBJETIVOS

El sistema de estudio se basó en la Mosca Mexicana de la Fruta, *A. ludens*, los flavonoides rutina, floridzina y catequina, y los ácidos fenólicos clorogénico y p-cumárico. Se utilizó un diseño experimental de mezcla-cantidad, con el objetivo específico de evaluar el efecto de diferentes mezclas y concentraciones de los flavonoides y ácidos fenólicos antes mencionados, agregados a una dieta artificial, sobre el desarrollo de *A. ludens*, e identificar interacciones entre ellos.

Rutina, floridzina, catequina y el ácido clorogénico se encuentran en cultivares de manzanas resistentes al ataque de *A. ludens* (Aluja *et al.* en preparación); catequina, los ácidos clorogénico y p-cumárico fueron evaluados en un experimento con dieta artificial sobre el desarrollo de larvas de la mosca *R. pomonella* (Pree 1977), y en general, como se muestra más adelante, todos los compuestos evaluados en este estudio se han relacionado con la resistencia de plantas a insectos herbívoros y/o como compuestos que afectan el desarrollo de insectos.

Debido a que en la naturaleza las plantas tienen varios metabolitos secundarios en sus tejidos, y como otros estudios han demostrado que concentraciones altas de algunos de estos compuestos se relacionan con la resistencia de frutos al ataque de tefrítidos (e.g., Aluja *et al.* en preparación, Gogi *et al.* 2010), la predicción de este estudio es que las mezclas de los compuestos evaluados en concentraciones altas, más que compuestos individuales en concentraciones bajas, afectarán el desarrollo de *A. ludens*.

2.1 Mosca Mexicana de la Fruta, *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae)

La mosca *A. ludens*, es una especie polífaga, multivoltina, nativa de México y distribuida en América Central y algunas regiones de EUA (Hernández-Ortiz y Aluja 1993, Aluja 1994, Aluja *et al.* 2000), considerada como plaga agrícola de frutos de importancia económica como mango (*Mangifera indica* L.) y varias especies de cítricos (*Citrus* spp.) (Aluja *et al.* 1996). Las hembras de esta especie pueden depositar entre uno y 40 huevos por puesta (Aluja *et al.* 2000), sus larvas se alimentan dentro del fruto hospedero y pasan por tres estadios antes de salir de este para enterrarse en el suelo a pupar (Aluja 1993). Los adultos pueden desplazarse largas distancias, ca. 80 millas aéreas, para invadir nuevos sitios (Christenson y Foote 1960). Su promedio de longevidad en laboratorio es de 163.4 ± 9.25 días cuando las larvas se desarrollan en toronja Marsh, *Citrus paradisi* Macfad., un hospedero principal, y 94.6 ± 10.6 días cuando se desarrollan en durazno criollo, *Prunus persica* L., un hospedero marginal (Birke 2011).

2.2 Flavonoides

Con más de 5,000 compuestos descritos, los flavonoides son el grupo más grande de compuestos fenólicos (Yang *et al.* 2001); se clasifican principalmente en flavones, flavanoles (catequinas), isoflavones, flavonoles, flavanones, chalconas, dihidrochalconas y

antocianinas (Ferrazzano *et al.* 2011, Yang *et al.* 2001). Los flavonoides poseen una amplia gama de actividades biológicas. Por ejemplo, pueden actuar como preventivos de enfermedades crónicas en humanos, y en plantas como compuestos defensivos contra patógenos y herbívoros (Yang *et al.* 2001, Ferrazzano *et al.* 2011).

2.2.1 Rutina

Rutina es un flavonol ubicuo en la naturaleza (Kalinova y Dadakova 2009), toma su nombre de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), y es uno de los flavonoides más bioactivos (Ghica y Oliveira 2005; Atanassova y Bagdassarian 2009). Como compuesto defensivo de plantas contra insectos, se ha observado que puede reducir el crecimiento e incrementar el tiempo de desarrollo de larvas; reducir peso de larvas, pupas y adultos; y aumentar mortalidad en especies de lepidópteros y homópteros (Elliger *et al.* 1980; Stamp 1990; Lindroth y Peterson 1998; Calatayud 2000; Hoffman-Campo *et al.* 2001; Salvador *et al.* 2010).

2.2.2. Floridzina

Floridzina pertenece al grupo de las dihidrochalconas; es un flavonoide predominante en manzanas (*Malus* spp.), y sólo se ha reportado su presencia en otras 17 especies de plantas, principalmente dentro de las familias Rosaceae y Ericaceae (Gosch *et al.* 2010).

Gutbrodt *et al.* (2011) sugirieron que floridzina tiene un papel general en la defensa de plantas de manzana al ataque de herbívoros. Lauzon *et al.* (2003) observaron una mortalidad del 100% en adultos de la mosca *R. pomonella* cuando estos bebieron soluciones de floridzina en concentraciones de 0.001, 0.01 y 1 M. Se ha observado que este compuesto tiene un efecto antialimentario en coleópteros (Fulcher *et al.* 1998), y también

afecta sistemas enzimáticos que aumentan la susceptibilidad de insectos a insecticidas (Hunter *et al.* 1994).

2.2.3 (+)- Catechina

Las catequinas son un pequeño grupo de compuestos fenólicos presentes en una amplia variedad de especies de plantas, incluidas algas marinas (Yoshie *et al.* 2000). En experimentos con dieta artificial, este compuesto mostró una alta actividad antialimentaria en machos del escarabajo de la corteza *Ips typographus* (L.) (Facoll y Schlyter 2007), inhibió el desarrollo de larvas de *R. pomonella* (Pree 1977), y causó elevada mortalidad y bajo peso de pupas en el lepidóptero *Heliothis zea* (Boddie) (Guerra *et al.* 1990). En experimentos con estiércol como dieta, redujo el porcentaje de emergencia y peso del díptero *Musca domestica* L. (Littlefield *et al.* 2011).

2.3 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son abundantes en alimentos de origen vegetal, particularmente en frutas de sabor ácido, y se dividen en dos clases: derivados de ácido benzoico y derivados de ácido cinámico (Pandey y Rizvi 2009). Los ácidos hydroxycinámicos son más comunes que los ácidos hydroxybenzóicos, y consisten básicamente en ácido p-cumárico, ceféico, felúrico y sinápico, siendo el ácido clorogénico uno de los derivados de mayor interés (Yang *et al.* 2001, Pandey y Rizvi 2009).

2.3.1 Ácido clorogénico

Como compuesto defensivo, se ha observado que el ácido clorogénico puede retrasar el crecimiento y reducir el peso de larvas en varias especies de lepidópteros (Stamp y Osier 1997, Beninger *et al.* 2004). También actúa como inhibidor de alimentación en diversas especies de coleópteros (Ikonen *et al.* 2001, Jasbi 2003).

2.3.2 Ácido p-cumárico

El ácido p-cumárico es un precursor de cumarinas y furanocumarinas (Bassman 2004). Este compuesto está relacionado con la resistencia de tallos de maíz, *Zea mays* L., al ataque del barrenador de tallos *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera) (Santiago *et al.* 2005), y de semillas de trigo, *Triticum aestivum* L. y *T. durum* Desf., al ataque del díptero *Sitodiplosis mosellana* (Géhin) (Ding *et al.* 2000). Además, en experimentos con dieta artificial mostró ser un inhibidor de alimentación del escarabajo *P. japonica* (Patton *et al.* 1997).

LITERATURA CITADA

- Akhtar, Y., y M.B. Isman. 2003. Binary mixtures of feeding deterrents mitigate the decrease in feeding deterrent response to antifeedants following prolonged exposure in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemoecology* 13:177-182.
- Aluja, M. 1993. Manejo Integrado de la Mosca de la Fruta. Editorial Trillas. 241 p.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* 39:155-178.
- Aluja, M. 1999. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 28:565-594.
- Aluja, M., y R.L. Mangan. 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annual Review of Entomology* 53: 473-502.
- Aluja, M., H. Celedonio-Hurtado, P. Liedo, M. Cabrera, F. Castillo, J. Guillén y E. Rios. 1996. Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 89:654-667.
- Aluja, M., J. Piñero, I. Jácome, F. Díaz-Fleischer, y J. Sivinski. 2000. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini), pp. 375-406. En: M. Aluja y A. Norrbom [eds.], *Fruit flies (Diptera: Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC, Boca Raton, FL.
- Appel, H.M. 1993. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 19:1521-1552.

- Atanassova, M., y V. Bagdassarian. 2009. Rutin content in plant products. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 44:201-203.
- Bassman, J.H. 2004. Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. *Photochemistry and Photobiology* 79:382-398.
- Beninger, C.W., M.M. Abou-Zaid, A.L. Kistner, R.H. Hallett, M.J. Iqbal, B. Grodzinski, y C. Hall. 2004. A flavone and two phenolic acids from *Chrysanthemum morifolium* with phytotoxic and insect growth regulating activity. *Journal of Chemical Ecology* 30:589-606.
- Beanland, L., P.R. Phelan, y S. Salminen. 2003. Micronutrient interactions on soybean growth and the developmental performance of three insect herbivores. *Environmental Entomology* 32:641-651.
- Birke, A. 2011. Uso de hospederos en *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae): efecto sobre sus parámetros de adecuación y mecanismos de resistencia en plantas. Tesis Doctoral inédita. Universidad Veracruzana, Instituto de Neuroetología. Xalapa, Veracruz, México. 111 pp.
- Busch, J., y L. Phelan. 1999. Mixture models of soybean growth and herbivore performance in response to nitrogen-sulphur-phosphorus nutrient interactions. *Ecological Entomology* 24:132-145.
- Bondari, K. 2005. Mixture experiments and their applications in agricultural research. In: SAS[®] Users Group International Conference 30., Pennsylvania. (Proceedings) Pennsylvania: SAS Institute Inc., 2005. p. 1-8.

- Calatayud, P.-A. 2000. Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus manihoti* in artificial diets. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 96: 81-86.
- Calcagno, M.P., J. Coll, J. Lloria, F. Faini, y M.E. Alonso-Amelot. 2002. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 28:175-191.
- Carmona, D., M.J. Lajeunesse, y M.T.J. Johnson. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology* 25:358-367.
- Christenson, L.D., y R.H. Foote. 1960. Biology of fruit flies. *Annual Review of Entomology* 5:171-192.
- Cisneros-Cevallos, L. 2003. The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Science* 68:1560-1565.
- Cornell, J.A. 2002. *Experiments with Mixtures*. 3ra ed., Wiley & Sons, New York. 649 pp.
- Croteau, R., T.M. Kutchan, y N.G. Lewis. 2000. Chapter 24 Natural products (secondary metabolites). En: *Biochemistry & molecular biology of plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologist. pp. 1250-1318.
- Dal Bello, L.H.A., y A.F.C. Vieira. 2011. Tutorial for mixture-process experiments with an industrial application. *Pesquisa Operacional* 31:543-564.
- Diawara, M.M., J.T. Trumble, K.K. White, W.G. Carson, y L.A. Martinez. 1993. Toxicity of linear furanocoumarins to *Spodoptera exiguua*: evidence for antagonistic interactions. *Journal of Chemical Ecology* 19:2473-2484.

- Ding, H., R.J. Lamb, y N. Ames. 2000. Inducible production of phenolic acids in wheat and antibiotic resistance to *Sitodiplosis mosellana*. *Journal of Chemical Ecology* 26:969-985.
- Elliger, C.A., B.C. Chan, y A.C. Waiss Jr. 1980. Flavonoids as larval growth inhibitors. *Naturwissenschaften* 67:358-360.
- Faccoli, M., y F. Schlyter. 2007. Conifer phenolic resistance markers are bark beetle antifeedant semiochemicals. *Agricultural and Forest Entomology* 9:237-245.
- Ferrazzano, G.F., I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, y A. Pollio. 2011. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* 16:1486-1507.
- Foster, I.P., W.G. Dominy, A.L. Lawrence, F.L. Castille, y S. Patnaik, S. 2010. Optimization of a research diet for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using mixture model methodology. *Aquaculture* 298:260-266.
- Fraenkel, G.S. 1959. The raison d'Être of secondary plant substances. *Science* 29:1466-1470.
- Fulcher, A.F, T.G. Ranney, y J.D. Burton. 1998. Role of phenolics in host plant resistance of *Malus* taxa to adult Japanese beetle. *HortScience* 33:862-865.
- Gatehouse, J.A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist* 156:145-169.
- Ghica, M-E., y B.A.M. Oliveira. 2005. Electrochemical oxidation of rutin. *Electroanalysis* 17:313-318.
- Gogi, M.D., M. Ashfaq, M.J. Arif, R.M. Sarfraz, y N.N. Nawab. 2010. Investigating phenotypic structures and allelochemical compounds of the fruits of *Momordica*

- charantia* L. genotypes as sources of resistance against *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae). *Crop Protection* 29:884-890.
- Gosch, C., H. Halbwirth, y K. Stich. 2010. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71:838-843.
- Guerra, D.J., J.T. Cothren, y J.R. Phillips. 1990. Influence of selected phenolic compounds on development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Economic Entomology* 83:2115-2118.
- Gutbrodt, B., K. Mody, R. Wittwer, y S. Dorn. 2011. Within-plant distribution of induced resistance in apple seedlings: rapid acropetal and delayed basipetal responses. *Planta* 233:1199-1207.
- Hernández-Ortíz, V., y M. Aluja. 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana* 88:89-105.
- Hoffman-Campo, C.B., N.J.A. Ramos, M.C. Neves de Oliveira, y L.J. Oliveira. 2006. Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41:1453-1459.
- Hunter, M.D., E.J. Biddinger, E.J. Carlini, B.A. McPheron, y L.A. Hull. 1994. Effect of apple leaf allelochemistry on tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae) resistance to azinphosmethyl. *Journal of Economic Entomology* 87:1423-1429.
- Ikonen, A., J. Tahvanainen, y H. Roininen. 2001. Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willow against leaf beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99:47-54.

- Jalaluddin, S.M., y S. Sadakathulla. 1999. Development and survival of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera:Tephritidae) on selected guava cultivars. *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 5:24-27
- Jassbi, A.M. 2003. Secondary metabolites as stimulants and antifeedants of *Salix integra* for the leaf beetle *Plagioderia versicolora*. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 58:573-579.
- Kalinova, J., y E. Dadakova. 2009. Rutin and total quercetin content in Amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant Foods for Human Nutrition* 64:68-74.
- Lapointe, S. L., T.J. Evens, y R.P. Niedz. 2008. Insect diets as mixtures: optimization for a polyphagous weevil. *Journal of Insect Physiology* 54:1157-1167.
- Lapointe, S. L., R.P. Niedz, y T.J. Evens. 2010a. An artificial diet for *Diaprepes abbreviatus* optimized for larval survival. *Florida Entomologist* 93:56-62.
- Lapointe, S. L., T.J. Evens, R.P. Niedz, y D.G. Hall. 2010b. An artificial diet optimized to produce normative adults of the tropical weevil *Diaprepes abbreviatus*. *Environmental Entomology* 39:670-677.
- Lattanzio, V., V.M.T. Lattanzio, y A. Cardinali. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. En: Filippo Imperato (ed). *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, Kerala, India. pp. 23-67.
- Lauzon, C., S.E. Potter, y R. Prokopy. 2003. Degradation and detoxification of the dihydrochalcone phloridzin by *Enterobacter agglomerans*, a bacterium associated with the apple pest, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 32:953-962.

- Lindroth, R.L., y S.S. Peterson. 1988. Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larvae. *Oecologia* 75:185-189.
- Littlefield, K.A., J.P. Muir, B.D. Lambert, y J.K. Tomberlin. 2011. Condensed tannins inhibit house fly (Diptera: Muscidae) development in livestock manure. *Environmental Entomology* 40:1572-1576.
- Mallikarjuna, N., K.R. Kranthi, D.R. Jadhav, S. Kranthi, y S. Chandra, S. 2004. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology* 128:321-328.
- Manoukas, A.G. 1993. The effects of some phenols on the larval performance of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Dipt., Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 116:303-307.
- Marutani-Hert, M., T.J. Evens, G.T. McCollum, y R.P. Niedz. 2011. Bud emergence and shoot growth from mature citrus nodal stem segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106:81-91.
- Montgomery, D.C. 2001. Design and analysis of experiments. Wiley, Inc. New York, EUA. 5ta ed. 694 pp.
- Niedz, R.P., y T.J. Evens. 2008. The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenetic tissue of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *BMC Plant Biology* 8:126.
- Niedz, R.P., y T.J. Evens. 2011. Mixture screening and mixture-amount designs to determine plant growth regulator effects on shoot regeneration from grapefruit (*Citrus paradisi* macf.) epicotyls. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 47:682-694.

- Onyilagha, J.C., M.Y. Gruber, R.H. Hallett, J. Holowachuck, A. Buckner, y J.J. Soroka. 2012. Constitutive flavonoids deter flea beetle insect feeding in *Camelina sativa* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 42:128-133.
- Pandey, K.B., y S.I. Rizvi. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:270-278.
- Patton, C.A., T.G. Ranney, J.D. Burton, y J.F. Walgenbach. 1997. Feeding responses of Japanese beetle to naturally occurring metabolites found in rosaceous plants. *Journal of Environmental Horticulture* 15:222-227.
- Pree, D.J. 1977. Resistance to development of larvae of the apple maggot in crab apples. *Journal of Economic Entomology* 70:611-614.
- Price, P.W. 2002. Resource-driven terrestrial interaction webs. *Ecological Research* 17:241-247.
- Ruohonen, K., y J. Kettunen. 2004. Effective experimental designs for optimizing fish feeds. *Aquaculture Nutrition* 10:145–151.
- Ruohonen, K., J. Koskela, J. Vielma, y J. Kettunen. 2003. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): analysis of growth and nutrient utilization in mixture model trials. *Aquaculture* 225:27–39.
- Salvador, M.C., A.L. Boica Jr., M.C.N. Oliveira, J. P da Graca, J.P., D. M da Silva, y C.B. Hoffmann-Campo. 2010. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? *Neotropical Entomology* 39:774-783.
- Santiago, R., R.A. Malvar, M.D. Baamonde, P. Revilla, y X.C. Souto. 2005. Free phenols in maize pith and their relationship with resistance to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) attack. *Journal of Economic Entomology* 98:1349-1356.

- Schrevens, E., y J. Cornell. 1993. Design and analysis of mixture systems: applications in hydroponic, plant nutrition research. *Plant and Soil* 154:45-52.
- Schoonhoven, L.M., J.J.A. van Loon, y M. Dicke. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press, New York. 421 pp.
- Simmonds, M.S.J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56:245-252.
- Simmonds, M.S.J. 2003. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64:21-30.
- Stamp, N.E. 1990. Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *Oecologia* 82:107-113.
- Stamp, N.E., y T.L. Osier. 1998. Response of five insect herbivores to multiple allelochemicals under fluctuating temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88:81-96.
- Stamp, N.E., y T.L. Osier. 1997. Combined effects of night-time temperature and allelochemicals on performance of a generalist insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83:63-72.
- Stamp, N.E., y Y. Yang. 1996. Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. *Ecology* 77:1088-1102.
- Stonehouse, J.M., J.D. Mumford., y G. Mustafa. 1998. Economic losses to tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Pakistan. *Crop Protection* 17:159-164.
- Theis, N., y M. Lerchau. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Science* 104:S93-S102.

- Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, D., y Stampar, F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1687-1694.
- Wu, J., y I.T. Baldwin. 2011. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics* 44:1-24.
- Xu, G., X. Ye, D. Liu, Y. Ma, y J. Chen. 2008. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyo (*Citrus paradisi* Macfad. Changshanhuoyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:382-389.
- Yang, C.S., J.M. Landau, M.T. Huang, y H.L. Newmark. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*: 21: 381-406.
- Yoshie, Y., W. Wang, D. Petillo, y T. Suzuki. 2000. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fisheries Science* 66:998-1000.
- Zou, J., y R.G. Cates. 1995. Foliage constituents of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Pinaceae)): their seasonal variation and potential role in douglas fir resistance and silviculture management. *Journal of Chemical Ecology* 21:387-402.

**3. A MIXTURE-AMOUNT APPROACH TO ASSESS THE EFFECT OF THREE
FLAVONOIDS AND TWO PHENOLIC ACIDS ON DEVELOPMENTAL
PERFORMANCE OF *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)**

FOR: *Physiological Entomology*

PLEASE CORRESPOND WITH:

Carlos Pascacio

Instituto de Ecología,
A.C.

Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores

Antigua Carretera a Coatepec No. 351

Xalapa, Veracruz CP 91070

MEXICO

E-mail: cpascacio@hotmail.com

A mixture-amount approach to assess the effect of three flavonoids and two phenolic acids on developmental performance of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)

CARLOS PASCACIO^{1,4}, TREVOR WILLIAMS¹, JOHN SIVINSKI², STEPHEN LAPOINTE³ and MARTÍN ALUJA¹

¹ Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México

²Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology, Gainesville, Florida, U.S.A.

³United States Horticultural Research Laboratory, Fort Pierce, Florida, U.S.A.

⁴ Corresponding author cpascacio@hotmail.com

Short Title: Pascacio *et al.*: Effect of individual phenolics and their mixtures on *A. ludens*

Abstract.

In experiments with artificial diets, some phenolic compounds have been shown to affect the development of several species across various orders of insects. Using a mixture-amount experimental design and response surface modeling we investigated the effects of the flavonoids rutin (Ru), phloridzin (Ph), and (+)-catechin (Ca), and the phenolic acids chlorogenic (ChA) and p-coumaric (pCoA), added to an artificial larval diet, on the development of the Mexican Fruit Fly, *Anastrepha ludens* (Loew). Pupal weight, percentage of pupation, adult emergence, and survival from neonate larvae to adults were not affected by phenolic compounds in the larval diet. Weight of seven day old larvae increased with the concentration of Ca, as it did with a mixture of Ph and Ru. In contrast, mixtures of ChA with Ca or pCoA resulted in larval weight decrease. pCoA concentration was positively correlated to larval development time, but this effect was neutralized when mixed with Ph. Pupal development time increased with the concentration of Ph, although the opposite occurred when it was mixed with Ru, Ca, or pCoA. Higher concentrations of ChA mixed with Ca or Ru resulted in faster development time. Ca was positively correlated with physical malformations of adults. Overall, models explained no more than 26% of the variation in the data, suggesting high variance in flies response to the compounds tested, possibly because the artificial diet used was super-optimal nutritionally, and this may have modulated the effect of the compounds tested.

Key words. Response surface modeling, phenolic compounds, artificial diet, larval weight, pupal weight, development time, malformed adults, Mexican Fruit Fly.

Introduction

Phenolic compounds are one of the most common and widespread group of plant secondary metabolites and can occur in all vegetative structures, flowers and fruits (Lattanzio *et al.*, 2006; Ferrazzano *et al.*, 2011). They encompass several classes of molecules generated through the shikimate/phenylpropanoid and/or the “polyketide” acetate/malonate secondary metabolic pathway, including flavonoids, phenolic acids, and lignans, among others (Ferrazzano *et al.*, 2011). Their antibiotic, antinutritional or unpalatable properties, are involved in plant defense against pathogens and herbivores (Lattanzio *et al.*, 2006). In fact, they are considered the only putative defensive molecules that are ubiquitous in plants (Appel, 1993). Phenolic compounds, however, do not always deter herbivores, prevent their feeding or inhibit their growth. In instances where insects have adapted to metabolically manage the phenolic contents of their hosts, phenols may actually stimulate feeding and oviposition (Simmonds 2001).

The role of secondary metabolites, including phenolic compounds, on plant defense, and their effect on phytophagous insects, has been studied for over 50 years (e.g., Fraenkel 1959, Pree 1977, Diawara *et al.* 1993, Onyilagha *et al.* 2012). To address this subject, two complementary experimental approaches have been mostly used. On one hand, various studies have identified the profile of secondary metabolites in a number of plant cultivars, genotypes or species, and used feeding trials with insects to determine correlatively the relationship between the content and concentration of these compounds on the resistance to insect attack and its effect on the development and behavior of the insect (e.g., Pree 1977; Fulcher 1998; Patton *et al.* 1997; Mallikarjuna *et al.*, 2004; Gogi *et al.*, 2010). Alternatively, several experiments have used artificial diets or plant material on which an insect feeds and then added putative secondary metabolites in varying amounts to precisely test the nature of

their effects (e.g., Stamp 1990, Stamp & Osier 1997, Lindroth & Peterson 1988, Calatayud 2000, Ikonen *et al.* 2001, Salvador *et al.* 2010). As an example of the first approach, Gogi *et al.* (2010) investigated the biochemical (and biophysical) traits of 13 genotypes of bitter gourd, *Momordica charantia* L., and related these to their resistance to melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae), infestation. Those genotypes with lower larval density per fruit, and reduced percentage of fruit infestation had significantly higher concentrations of tannins and flavonols. In an experiment using the second, artificial-diet, approach, Manoukas (1993) tested the adverse effect of five structurally related phenols, in six different concentrations, against the olive fruit fly, *Dacus* (*Bactrocera*) *oleae* Gmel, by assessing hatchability, larval and pupal weight and survival, and adult emergence. Catechol adversely affected all parameters at much lower concentrations (0.005 to 0.08%) than did resorcinol or hydroquinone (0.05 to 0.8%), whereas pyrogallol and phloroglucinol did not affect hatchability, larval survival or pupal weight when present at concentrations up to 0.4%.

Although individual phenolic compounds can deter feeding, suppress larval growth and decrease weight, and increase mortality on species in at least four orders of insects (e.g., Pree 1977, Dowd & Vega 1996, Fulcher *et al.* 1998, Lindroth & Peterson 1988, Ikonen 2001, Salvador *et al.* 2010), it has been suggested that secondary metabolites mixtures may result in synergistic or antagonistic interactions (Diawara *et al.* 1993, Calcagno *et al.* 2002). However, studies testing combinations of secondary metabolites, generally lack an appropriate experimental design and analysis, as they fail to consider the effect of concentration and proportions of each compound within the mixture they test (Diawara *et al.* 1993, Stamp & Yang 1996, Akhtar & Isman 2003).

Studies addressing mixtures require a statistical approach based on mixture polynomials developed by Scheffé (Cornell 2002). These so called mixture experiments (MEs) allow simultaneous examination of multiple components, providing information about their interactions, and modeling synergistic and antagonistic effects (Busch & Phelan 1999, Lapointe *et al.* 2008). MEs have been primarily used in engineering, chemical, pharmaceutical, and food industries (Dal Bello y Vieira 2011), while their application in agricultural and ecological research has lagged (Busch & Phelan 1999, Bondari 2005). However, recently, MEs have been used to optimize the artificial diet of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Foster *et al.* 2010), the European white fish *Coregonus lavaretus* (Ruohonen *et al.* 2003; Ruohonen y Kettunen 2004), and the polyphagous weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.), a major citrus pest in USA and the Caribbean (Lapointe *et al.* 2008, 2010a, 2010b). Furthermore, mixture experiments have been useful in describing ecological interactions between plant nutrition and phytophagous insect performance (Busch & Phelan, 1999; Beanland *et al.*, 2003). In the field of plant and insect ecology, in multivariate systems conceptualized as mixtures, MEs may be useful in the study of mixtures of pheromones, secondary compounds, plant volatiles, artificial diets, mixtures of plant species (e.g., mixed plantations), and ecological interactions (Busch y Phelan 1999; Beanland *et al.* 2003; Lapointe *et al.* 2008). Therefore, MEs represent a highly valuable tool in various fields.

Here we used a mixture-amount design, which considers the effect of both mixture and concentration (Piepel & Cornell 1985), to study, under laboratory conditions, the effect of the flavonoids rutin, phloridzin, and (+)- catechin, and of the phenolic acids chlorogenic and p-coumaric, on the development of the Mexican Fruit Fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Mexican Fruit Fly is a major pest of economically important fruit

such as mango (*Mangifera indica* L.), and citrus (*Citrus* spp.), from southern Texas southward through Central America (Hernández-Ortiz y Aluja 1993, Aluja *et al.* 1996). In a recent study, Aluja *et al.* (in preparation), showed that apple, *Malus domestica* Borkh, cultivars with high concentrations of phenolic compounds, including those considered in this research, were highly deleterious to *A. ludens*, as they inhibited larval development, increased mortality and the prevalence of deformities in pupae, whereas larvae that fed on apple cultivars with low concentrations of phenolic compounds were not affected. Our specific objectives were to examine the effect of different mixtures and concentrations of rutin, phloridzin, (+)- catechin, chlorogenic and p-coumaric acid, added to an artificial diet used to feed larvae of *A. ludens*, upon larval and pupal weight, larval and pupal development times, percent of pupation, adult emergence, and survival to adulthood, and to identify biologically relevant interactions between these compounds. Because in nature host plants can defend themselves against herbivores with mixtures of secondary metabolites, and because high concentrations of phenolic compounds in host fruit are deleterious to tephritid flies (Aluja *et al.* in preparation), we predicted that blends of the phenolic compounds tested and high concentrations, rather than individual compounds and low concentrations, would affect the variables measured.

Materials and methods

Test compounds

Chemical properties of the phenolic compounds tested are described in Table 1. All compounds were purchased from Sigma-Aldrich Company (Toluca, Mexico State, Mexico).

Source of insects

Anastrepha ludens individuals used in the experiments were obtained from stock cultures maintained in the laboratories of the Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores at the Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz State, Mexico, which had been maintained in artificial diet for approximately 14 years at the time of the study (for rearing details see Aluja *et al.* 2009).

General procedure

Artificial diet was prepared using the ingredients reported by Aluja *et al.* (2009). Samples of 25 g of artificial diet were placed inside a Petri dish (5 cm diameter x 2 cm tall) together with 30 *A. ludens* neonate larvae. Petri dishes with diet and larvae were placed inside plastic containers (7 cm diameter x 6 cm tall) which had a 3 cm layer of vermiculite on the bottom as a pupation medium. Plastic containers were closed with a lid that had a 5 cm diameter hole covered with organdy cloth, and placed in a dark room at 30 ± 1 °C and $70 \pm 5\%$ of RH. Larvae were allowed to feed, and pupation was checked daily beginning seven days after the start of the experiment. When ready to pupate, larvae crawled from Petri dishes with artificial diet into vermiculite. At this point all pupae found in vermiculite were removed and held individually inside clean Petri dishes (4 cm diameter x 1.5 cm tall) with vermiculite and a perforated lid to allow ventilation. These Petri dishes were attached to cardboard plates (20 x 36 cm) and incubated at 27 ± 1 °C, $63 \pm 5\%$ RH, and photoperiod of 12: 12 (light: dark). Three days following pupation, pupae were weighted with an analytical balance (Sartorius CP64), and then returned to their Petri dishes until adult emergence.

Experimental approach

The experiment was designed as a mixture-amount, and included five mixture components: (+)-catechin (Ca), phloridzin (Ph), rutin (Ru), chlorogenic acid (ChA), and p-coumaric acid (pCoA), and one numeric factor (total concentration of phenolic compounds as mg 100 g⁻¹ artificial diet). Because Ca, Ph, Ru, ChA, and pCoA were treated as components of a mixture, the range of each component was expressed as a percentage of the total amount in each mixture and sum to 100%. In preliminary tests, we observed that Ph, and Ru, added individually to an artificial diet in concentrations up to 100 mg could affect larval and pupal development time. Total amount of phenolic compounds ranged from 75 to 225 mg 100 g⁻¹ fresh weight of artificial diet. Lower total amount (75 mg 100 g⁻¹ fresh weight of artificial diet) was the sum of individual amounts of each phenolic compound tested naturally found in *M. domestica* (J. Samietz pers. comm., Biedrzycka & Amarowicz 2008), and this value was multiplied by three to produce a maximum of 225 mg 100 g⁻¹ fresh weight of artificial diet. Design points (combinations of phenolic compounds mixtures and concentrations) were selected using modified D-optimal criteria suitable for fitting a quadratic polynomial, and totaled 53 different model points (phenolic compounds blends at different concentrations), each replicated between one and three times for a total of 100 runs (Table 2). The experiment included 45 model points, 5 lack-of-fit points, 45 replicated points, and 5 additional center points. The design had four block, 44 model, six lack of fit, and 45 pure error degrees of freedom. The experiment included five blocks to account for the number of treatments that could be managed at one time. The whole experiment (100 runs, Table 2) was performed twice. The first experiment was run until the seventh day to recover and weight all larvae found, and the second experiment continued until adult emergence.

Prior to its addition to the artificial diet, Ca and Ru (hydrate), and Ph (dihydrate) were dissolved in water. Because ChA and pCoA were anhydrous they were dissolved in 0.5 ml of 95% ethanol. We tested for the possible deleterious effect of 0.5 and 1 ml of 95% ethanol in the response variables with a factorial experiment, analyzed by means of one way ANOVA and found no significant effect (Table 3). Thus, ethanol, like water, was considered only as a solvent and not taken into account for the analysis.

Data analysis

The measured responses at each design point were the mean values of all individuals found in Petri dishes with artificial diet and 30 *A. ludens* larvae. For each measured response, the highest order polynomial model in which additional model terms were significant at the $\alpha = 0.05$ level was analyzed by ANOVA. A battery of adequacy tests described by Anderson & Whitcomb (2005) were performed: normality and homoscedasticity were determined graphically via normal probability plots of residuals; Box-Cox plots were used to identify, if required, the necessity and type of data transformation; overly influential data points were identified with DFFITS (a measure of influence based on the difference in fits in each predicted value) and DFBETAS (a measure of influence based on difference in model coefficients) plots; adequate precision of the model was determined by comparing the range of the predicted values at the design points to the average variance of the prediction; potential outlier points were checked with externally studentized “outlier-t” and Cook’s distance graphical plots. The multiple correlation coefficients (R^2 , and adjusted R^2) were estimated for each selected model. The lack of fit test was set to a p value >0.05 . The software Design-Expert ® 8 (Stat-Ease, Inc,

Minneapolis, MN) was used for experimental design construction, model evaluation, and in all analyses performed.

Results

A summary of the ANOVA, lack of fit tests, the best fitting models, the R^2 and the adjusted R^2 statistics for responses affected significantly by particular mixtures and concentrations of Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA are presented in Table 4. The diagnostics were all within acceptable limits, that is, the data were normally distributed, and displayed a constant variance. Furthermore, there were no outlier- t points, no points exceeded a Cook's distance of one, and the predicted versus actual value plots showed close agreement (data not shown). Only for larval weight one point (Run 37) was identified as suspect by the outlier t -test and the cook's distance analysis, and was therefore ignored for the analysis.

No significant effect of particular mixtures and concentrations of Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA were found for pupal weight ($F = 1.4$; $df = 6, 45$; $p = 0.2$), percentage of pupation ($F = 0.5$; $df = 4, 45$; $p = 0.7$), adult emergence (%) ($F = 1.5$; $df = 5, 45$; $p = 0.2$), or percentage of survival from neonate larva to adult ($F = 0.6$; $df = 4, 45$; $p = 0.7$).

Larval weight

A reduced quadratic mixture x linear concentration model was selected. The model was significant ($p = 0.0001$), indicating significant factor effects on the observed response. Linear mixture was not significant ($p = 0.07$) which means that there was no difference in larval weights between pure compounds. The lack of fit test was not significant ($p = 0.55$) and indicated that additional variation in the residuals could not be removed with a better model. The model explained 24% of the observed variance ($R^2_{\text{adjusted}} = 0.24$), and the

ANOVA contained four significant model terms (Table 4). Larval weight ranged from 14.4 – 26.5 mg. Increasing Ca in the artificial diet resulted in heavier larvae, and mixtures of Ca with ChA resulted in lower weights than were obtained when either of these compounds were used alone (Fig. 1a). ChA x pCoA mixture caused the lower weights, independent of concentration (Fig. 1b), while Ph x Ru mixtures resulted in higher weights (Fig. 1c).

Larval development time

A reduced quadratic mixture x linear concentration model was selected. The model was highly significant ($p < 0.0001$), and the lack of fit test was not significant ($p = 0.99$). The model explained 22 % of the observed variance ($R^2_{\text{adjusted}} = 0.22$). The linear mixture, Ph x pCoA, and pCoA x (concentration) were significant terms in the ANOVA model (Table 4). Larval development time ranged from 9.9 – 11.9 days. This increased with the concentration of pCoA in the artificial diet, while Ph concentration has no effect. The mixture of Ph x pCoA resulted in shorter development times than those obtained when these compounds were present individually in diet (Fig. 2).

Pupal development time

Pupal development time ranged from 14.1 – 16 days, and the best fitting model (lack of fit $p = 0.88$) was a reduced quadratic mixture x linear concentration. The model was highly significant ($p < 0.0001$), and explained 26% of overall variation. The ANOVA revealed six significant terms (Table 4). Development time increased with the concentration of Ph, but an opposite tendency resulted from the Ph x Ru mixture, where development times were >15.4 days at the lower concentrations, and < 14.6 days at the highest (Fig. 3a). A similar pattern was observed in the Ca x Ph, and the Ph x pCoa mixtures (Figs. 3c, and

3e) with higher concentrations of Ca x ChA, and ChA x Ru resulting in shorter development times (Figs. 3b and 3d).

Emergence of deformed adults

Some adults emerged with atrophied wings, atrophied ovipositor, or lacked one wing. The percentage of adults that were deformed ranged from 0 to 8 %. A reduced linear mixture x linear concentration model was selected ($p = 0.003$). Following an $(x + 1)$ transformation (to avoid working with zeros), data were transformed by power transformation as identified by the Box-Cox plot analysis. Lack of fit was not significant ($p = 0.06$), and $R^2_{\text{adjusted}} = 0.13$. ANOVA indicated that Ca at high concentrations was a factor significantly correlated with adult malformations (Table 4, Fig. 4).

Discussion

Both individual phenolic compounds and binary mixtures had significant effects on *A. ludens* development, but quinary mixtures did not, and the effects of mixtures were not predictable from the activities of their individual compounds. Neither ChA nor pCoA significantly reduced larval weight but ChA x pCoA mixtures did. High concentrations of Ca resulted in significantly heavier larvae, but when ChA was added larval weights were reduced. In contrast, Ph x Ru mixture resulted in increased larval weight. Larval development time was delayed as the concentration of pCoA increased, but this effect was counteracted by Ph, thus the mixture of Ph x pCoA resulted in faster larval development than that observed with individual compounds. Pupal development time increased with the concentration of Ph, although mixtures of Ph with Ru, Ca, or pCoa, and ChA mixed with

Ca or Ru resulted in an opposite trend. Ca showed a significant effect on the prevalence of adult deformities.

It is possible that the deformities observed in adults of *A. ludens* were a consequence of a nutritional deficiency caused by increased concentrations of Ca in the artificial diet. Wing deformities in insects have been linked with nutritional deficiencies during larval stage (Cohen, 2005), and phenolic compounds have the ability to directly bind to target proteins and digestive enzymes, and inhibit the absorption of amino acids (Appel, 1993). In particular, catechin can inhibit protein digestion by insect larvae (Schopf, 1986), resulting in nutritional deficiencies. Mallikarjuna *et al.* (2004) observed malformed adults of *Spodoptera litura* (Fab.) when larvae fed on resistant host plants with high concentrations of phenolic compounds including ChA, that was previously shown to interfere with protein digestion and absorption of amino acids in lepidopteran larvae (Felton *et al.*, 1992).

If Ca was interfering with protein digestion of *A. ludens* larvae, then it is possible that larvae may compensate for this effect with an increase in feeding rates, thereby gaining more weight. A similar situation was reported by Simpson & Simpson (1990) with locusts (Acrididae), in which a marked increase in feeding occurred when certain amino acids were deficient in the diet. To confirm this, in the future it will be necessary to measure the feeding rates of larvae reared on artificial diet with Ca, and correlate these rates with larval weight. Other studies with insects reared on artificial diet have suggested that heavier individuals exhibit reduced survival rates (Lapointe *et al.*, 2008). Therefore, heavier insect body weight may correlate with lower fitness. In our study high concentrations of Ca were associated with increased larval weights and malformed adults. On the other hand, low larval weights resulting from the interactive effects of Ca x ChA and ChA x pCoA, may

have been related to the ability of phenolics to negatively affect the conversion of ingested food into biomass (Hoffman-Campo *et al.* 2006).

Leyva *et al.* (1991) observed that larval and pupal development times of *A. ludens* varied significantly when reared on grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.), orange (*C. sinensis* Osbeck), mango (*M. indica*), or peach (*Prunus persica* L.). Larval development took longer in both citrus species, and was faster in peach, whereas pupal development took longer in grapefruit, and was shorter in the other three fruits. Both orange and grapefruit have pCoA in their pulp (Gorinstein *et al.* 2001), whereas peach apparently does not (Andreotti *et al.* 2008; Blanda *et al.* 2008), and as we observed, pCoA content was correlated with prolonged larval development time.

In a previous study with artificial diet and phenolic compounds additives, Pree (1977) found no effect of either ChA or pCoA tested individually at concentrations of 100 and 1000 ppm on larval development of the tephritid fly *Rhagoletis pomonella* (Walsh). Similarly, in our study the presence of ChA alone had no observable effect in the variables we measured, but it affected larval weight when mixed with Ca or pCoA, and pupal development time when mixed with Ca or Ru. Therefore, the effect of ChA in development of some tephritid species appears to be conditioned to the presence of other compounds. Unlike the results of Pree (1977), the presence of pCoA alone and at high concentrations prolonged larval development in our study.

The type and magnitude of effects caused by phenolic compounds depends on the organism and situation, and even from studies with the same species, it has often been difficult to predict when and where they will be active (Appel 1993). The results of the study of Aluja *et al.* (in preparation), indicated that high concentrations of phenolic compounds (including Ca, Ru, Ph, ChA, epicatechin procyanidin B1 and B2,

coumaroylquinic acid, phloretin-xyloglucoside, quercetin-galactoside and glucoside, and quercetin rhamnoside) such as found in ancestral apple cultivars, were correlated with increased mortality and lower pupal weights of *A. ludens*. These authors also reported a negative relationship between catechin content and pupal weight. In contrast, we observed no significant effect with any mixture or concentration of Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA on pupal weight, and percentages of pupation, emergence, and survival, even at the highest concentrations with quinary mixtures. Moreover, Ca not only did not reduce pupal weight, but was positively correlated with larval weight.

The statistical significance of the models for larval weight, larval development time, pupal development time, and percentage of adults emerged deformed, demonstrated that these variables were affected by particular phenolic compounds concentrations and mixtures. However, the low R-squared values indicate high variation in the responses, and a low predictive value of the models. We believe that the variation in the response of *A. ludens* to the phenolic compounds was in part due to the fact that the artificial diet used is super-optimal. That is, its protein content was approximately 8, 12, and 4 times greater than the protein content of the natural hosts grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.), mango (*Mangifera indica* L.) and white sapote (*Casimiroa edulis* [La Llave & Lex]), respectively (Cicero 2011). Indeed, the magnitude of adverse effects of secondary metabolites, such as phenolic compounds, upon development of herbivorous insects is strongly correlated with protein content, and carbohydrate-protein ratios in the diet (Simpson & Raubenheimer, 2001; Haukioja *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 2010). Therefore, the effects of these compounds on phytophagous insects may often be damped by the super-optimal nutrient concentration in artificial diets (Smith 2010; Rose *et al.*, 1988). In addition, part of the

variation may also depend on larval quality differences due to density effects of adult flies rearing procedure.

The selection and use of hosts by tephritid flies is a complex phenomenon that may have conditional outcomes depending on factors such as biochemical fruit traits (Aluja & Mangan 2008). Our results may give insights into these regard. For example, in nature, guava (*Psidium guajava* L.) is not infested by *A. ludens* (Birke & Aluja 2011), but under forced laboratory conditions, Birke (2011) observed that females oviposit on it, and larvae develop to adults. However, this flies had lower pupal weights and smaller adult sizes, with decreased nutritional status, fertility, and fecundity compared to individuals that developed on natural hosts. It was believed that plant secondary compounds were responsible of these effects. Ca occurs in guava pulp (Kondo *et al.* 2005), but apparently not in the suitable host orange (Gorinstein *et al.* 2001), and as we have shown, this compound can deleteriously affect larvae and adults.

Although mixture experiments have been successfully used in other areas of entomological research (Busch & Phelan, 1999; Beanland *et al.*, 2003; Lapointe *et al.*, 2008, 2010a, 2010b), apparently this is the first study that has employed a mixture experimental design to study the effect of phenolic compounds on the development of a phytophagous insect. Ongoing studies will focus on mixture experimentation to modify the artificial diet of *A. ludens* and test the hypothesis that the adverse effects of the phenolic compounds tested are modulated by the nutritional content of the larval diet.

Acknowledgments

Andrea Birke, Larissa Guillén, Juan Rull, Lizette Cicero, and Jovita Martínez made important suggestions on methodological aspects of *A. ludens* rearing. Joerg Samietz provided information on the phenolic content in apples. Eva Arrigoni provided guidance for the selection of (+)- catechin. Nery Martínez and Alma Fuentes helped with artificial diet preparation, *A. ludens* rearing and data collection during experiments. Juan Carlos Moreno, Rafael Casas, Jovita Martínez, Israel Peralta, and Alejandra Robledo supplied larvae for the experiments. Stat-Ease, Inc, provided trial extensions of the software Design-Expert ® 8 until the end of the study. This study was funded by the partnership agreement APEAM-INECOL. CP acknowledges a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

References

- Akhtar, Y. & Isman, M.B. (2003) Binary mixtures of feeding deterrents mitigate the decrease in feeding deterrent response to antifeedants following prolonged exposure in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemoecology*, **13**, 177-182.
- Aluja, M., H. Celedonio-Hurtado, P. Liedo, M. Cabrera, F. Castillo, J. Guillén & E. Rios. (1996) Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology*, **89**, 654-667.
- Aluja, M. & Mangan, R.L. (2008) Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annual Review of Entomology*, **53**, 473-502.
- Aluja, M., Sivinski, J., Ovruski, S., Guillén, L., López, M., Cancino, J., Torres-Anaya, A., Gallegos-Chan, G. & Ruíz, L. (2009) Colonization and domestication of seven species of native New World hymenopterous larval-prepupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Biocontrol Science and Technology*, **19**, 49-79
- Anderson, M. J., & Whitcomb, P.J. (2005) RSM simplified – optimizing processes using Response Surface Methods for design of experiments. Productivity, Inc., New York NY. 293 pp.
- Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A. & Costa, G. (2008) Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*, **153**, 11-23.
- Appel, H.M. (1993) Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 1521-1552.

- Biedrzycka, E. & Amarowicz, R. (2008) Diet and health: apple polyphenols as antioxidants. *Food Reviews International*, **24**, 235-251.
- Birke, A. (2011) Uso de hospederos en *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae): efecto sobre sus parámetros de adecuación y mecanismos de resistencia en plantas. Unpublished PhD thesis. Universidad Veracruzana, Instituto de Neuroetología. Xalapa, Veracruz, México. 111 pp.
- Birke, A. & Aluja, M. (2011) *Anastrepha ludens* and *Anastrepha serpentine* (Diptera: Tephritidae) do not infest *Psidium guajava* (Myrtaceae), but *Anastrepha obliqua* occasionally shares this resource with *Anastrepha striata* in nature. *Journal of Economic Entomology*, **104**, 1204-1211.
- Blanda, G., Cerratani, L., Bendini, A., Cardinali, A. & Lercker, G. (2008) Phenolic content and antioxidant capacity versus consumer acceptance of soaked and vacuum impregnated frozen nectarines. *European Food Research and Technology*, **227**, 191-197.
- Busch, J. & Phelan, L. (1999) Mixture models of soybean growth and herbivore performance in response to nitrogen-sulphur-phosphorus nutrient interactions. *Ecological Entomology*, **24**, 132-145.
- Beanland, L., Phelan, P.R. & Salminen, S. (2003) Micronutrient interactions on soybean growth and the developmental performance of three insect herbivores. *Environmental Entomology*, **32**, 641-651.
- Bondari, K. (2005) Mixture experiments and their applications in agricultural research. In: SAS[®] Users Group International Conference 30., Pennsylvania. (Proceedings) Pennsylvania: SAS Institute Inc., 2005. p. 1-8.

- Calatayud, P.-A. (2000) Influence of linamarin and rutin on biological performances of *Phenacoccus manihoti* in artificial diets. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **96**, 81-86.
- Calcagno, M. Coll, J., Lloria, J., Faini, F. & Alonso-Amelot, M.E. (2002) Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology*, **28**, 175-191.
- Cicero, L. (2011) Efecto de la calidad del hospedero en la dinámica ovárica y contenido nutricional de cuatro parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Unpublished PhD thesis. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, Mexico, 179 pp.
- Cohen, A.C. (2004) Insect diets: science and technology. CRC Press, Boca Raton. 312 pp.
- Cornell, J.A. (2002) Experiments with Mixtures. 3rd ed., Wiley & Sons, New York. 649 pp.
- Dal Bello, L.H.A. & Vieira, A.F.C. (2011) Tutorial for mixture-process experiments with an industrial application. *Pesquisa Operacional*, **31**, 543-564.
- Diawara, M.M., Trumble, J.T., White, K.K., Carson, W.G. & Martinez, L.A. (1993) Toxicity of linear furanocoumarins to *Spodoptera exiguua*: evidence for antagonistic interactions. *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 2473-2484.
- Dowd, P.F. & Vega, F.E. (1996) Enzymatic oxidation products of allelochemicals as a basis for resistance against insects: effects on the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. *Natural Toxins*, **4**, 85-91.
- Felton, G.W., Donato, K.K., Broadway, R.M. & Duffey, S.S. (1992) Impact of oxidase plant phenolics on the nutritional quality of a dietary protein to a noctuid herbivore *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, **38**, 277-285.

- Ferrazzano, G.F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G. & Pollio, A. (2011) Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, **16**, 1486-1507.
- Foster, I.P., Dominy, W.G., Lawrence, A.L., Castille, F.L. & Patnaik, S. (2010) Optimization of a research diet for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using mixture model methodology. *Aquaculture*, **298**, 260-266.
- Fraenkel, G.S. (1959) The raison d'Être of secondary plant substances. *Science*, **29**, 1466-1470.
- Fulcher, A.F; Ranney, T.G. & Burton, J.D. (1998) Role of phenolics in host plant resistance of *Malus taxa* to adult Japanese beetle. *HortScience*, **33**, 862-865.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y-S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, Milan, Caspi, A., Libman, I. & Trakhtenberg, S. (2001) Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, **74**, 309-315.
- Gogi, M.D., Ashfaq, M., Arif, M.J., Sarfraz, R.M. & Nawab, N.N. (2010) Investigating phenotypic structures and allelochemical compounds of the fruits of *Momocardia charantia* L. genotypes as sources of resistance against *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Crop Protection*, **29**, 884-890.
- Haukioja, E., Ossipov, V. & Lempa, K. (2002) Interactive effects of leaf maturation and phenolics on consumption and growth of a geometrid moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **104**, 125-136.
- Hernández-Ortíz, V. & Aluja, M. (1993) Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*, **88**, 89-105.

- Hoffman-Campo, C.B., Ramos, N.J.A., Neves de Oliveira, M.C. & Oliveira, L.J. (2006) Detrimental effect of rutin on *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **41**, 1453-1459.
- Ikonen, A., Tahvanainen, J. & Roininen, H. (2001) Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willow against leaf beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **99**, 47-54.
- Kondo, S., Kittikorn, M. & Kanlayanarat, S. (2005) Preharvest antioxidant activities of tropical fruit and the effect of low temperature storage on antioxidants and jasmonates. *Postharvest Biology and Technology*, **36**, 309-318.
- Lapointe, S. L., Evens, T. J., & Niedz, R. P. (2008) Insect diets as mixtures: optimization for a polyphagous weevil. *Journal of Insect Physiology*, **54**, 1157-1167.
- Lapointe, S. L., Niedz, R. P. & Evens, T. J. (2010a) An artificial diet for *Diaprepes abbreviatus* optimized for larval survival. *Florida Entomologist*, **93**, 56-62.
- Lapointe, S. L., Evens, T. J., Niedz, R. P. & Hall, D. G. (2010b) An artificial diet optimized to produce normative adults of the tropical weevil *Diaprepes abbreviatus*. *Environmental Entomology*, **39**, 670-677.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T. & Cardinali, A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Filippo Imperato (ed). *Phytochemistry: advances in research*. Research Signpost, Kerala, India. pp. 23-67.
- Leyva, J.L., Browning, H.W. & Gilstrap, F.E. (1991) Development of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) in several host fruit. *Environmental Entomology*, **20**, 1160-1165.

- Lindroth, R.L. & Peterson, S.S. (1988) Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larvae. *Oecologia*, **75**, 185-189.
- Mallikarjuna, N., Kranthi, K.R., Jadhav, D.R., Kranthi, S. & Chandra, S. (2004) Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, **128**, 321-328.
- Manoukas, A.G. (1993) The effects of some phenols on the larval performance of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Dipt., Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, **116**, 303-307.
- Onyilagha, J.C., Lazorki, J. Gruber, M.Y., Soroka, J.J. & Erlandson, M.A. (2004) Effect of flavonoids on feeding preference and development of the crucifer pest *Mamestra configurata* Walker. *Journal of Chemical Ecology*, **30**, 109-124.
- Onyilagha, J.C., Gruber, M.Y., Hallett, R.H., Holowachuck, J., Buckner, A. & Soroka, J.J. (2012) Constitutive flavonoids deter flea beetle insect feeding in *Camelina sativa* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, **42**, 128-133.
- Patton, C.A., Ranney, T.G., Burton, J.D. & Walgenbach, J.F. (1997) Feeding responses of Japanese beetle to naturally occurring metabolites found in rosaceous plants. *Journal of Environmental Horticulture*, **15**, 222-227.
- Piepel, G.F. & Cornell, J.A. (1985) Models for mixture experiments when the response depends on the total amount. *Technometrics*, **27**, 219-227.
- Pree, D.J. (1977) Resistance to development of larvae of the apple maggot in crab apples. *Journal of Economic Entomology*, **70**, 611-614.
- Rose, R.L., Sparks, T.C. & Smith, M. (1988) Insecticide toxicity to the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) as influenced by feeding on

- resistant soybean (PI 227687) leaves and coumestrol. *Journal of Economic Entomology*, **81**, 1288-1294.
- Ruohonen, K. & Kettunen, J. (2004) Effective experimental designs for optimizing fish feeds. *Aquaculture Nutrition*, **10**, 145–151.
- Ruohonen, K., Koskela, J., Vielma, J., & Kettunen, J. (2003) Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): analysis of growth and nutrient utilization in mixture model trials. *Aquaculture*, **225**, 27–39.
- Salvador, M.C., Boica Jr., A.L., Oliveira, Da Graca, J.P., Da Silva, D.M. & Hoffmann-Campo, C.B. (2010) Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? *Neotropical Entomology*, **39**, 774-783.
- Schopf, R. (1986) The effect of secondary needle compounds on the development of phytophagous insects. *Forest Ecology and Management*, **15**, 55-64.
- Simmonds, M.S.J. (2001) Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*, **56**, 245-252.
- Simpson, S.J. & Raubenheimer, D. (2001) The geometric analysis of nutrient-allelochemical interactions: a case study using locusts. *Ecology*, **82**, 422-439.
- Simpson, S.J. & Simpson, C.L. (1990) The mechanism of compensation by phytophagous insects. In Bernays, E.A. (ed): *Insect-plant interactions*, vol. 2. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., pp. 112-160.
- Smith, C.M. (2010) *Plant resistance to arthropods*. Springer. The Netherlands. 423 pp.
- Stamp, N.E. (1990) Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *Oecologia*, **82**, 107-113.

- Stamp, N.E. & Osier, T.L. (1997) Combined effects of night-time temperature and allelochemicals on performance of a generalist insect herbivore. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **83**, 63-72.
- Stamp, N.E. & Osier, T.L. (1998) Response of five insect herbivores to multiple allelochemicals under fluctuating temperatures. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **88**, 81-96.
- Stamp, N.E. & Yang, Y. (1996) Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. *Ecology*, **77**, 1088-1102.

Figure legends.

Figure 1. Contour plots from the Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA mixture-amount experiment showing significant model terms affecting larval weight (mg): a) Ca x ChA, and Ca x concentration; b) Cha x pCoA; and c) Ph x Ru. The proportional effects of mixture components are indicated along the *x*-axis and the concentration effect of mg of mixture/100g of artificial diet along the *y*-axis. Design points (in red) accompanied by “2” were replicated.

Figure 2. Contour plot from the Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA mixture-amount experiment showing significant model terms affecting larval development time (days).

Figure 3. Contour plots from the Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA mixture-amount experiment showing significant model terms affecting pupal development time (days): a) Ph x Ru x concentration; b) Ca x ChA x concentration; c) Ca x Ph x concentration; d) ChA x Ru x concentration; and e) Ph x pCoA x concentration.

Figure 4. Contour plot from the Ca-Ph-Ru-ChA-pCoA mixture-amount experiment showing significant model terms affecting percentage of adults that were deformed.

Figure 1.

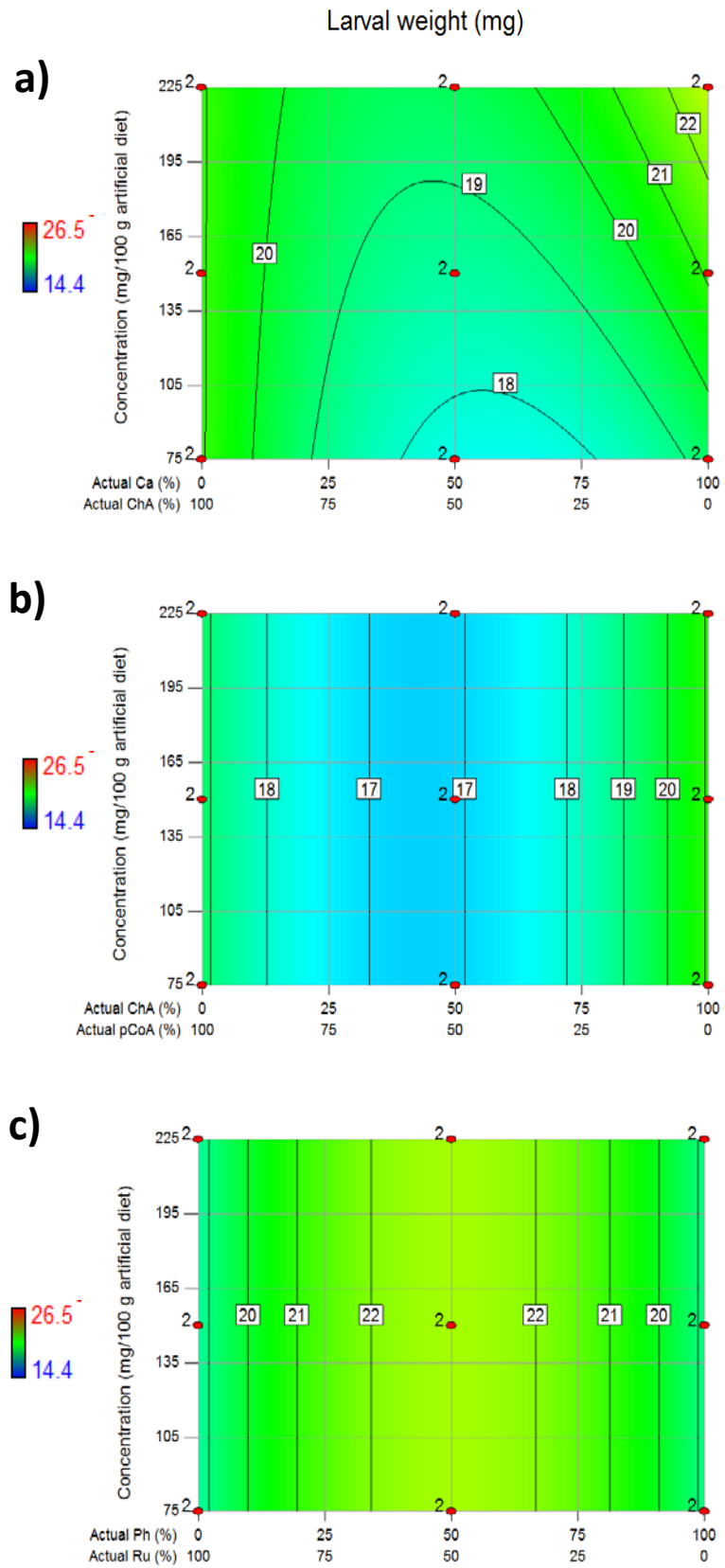


Figure 2.

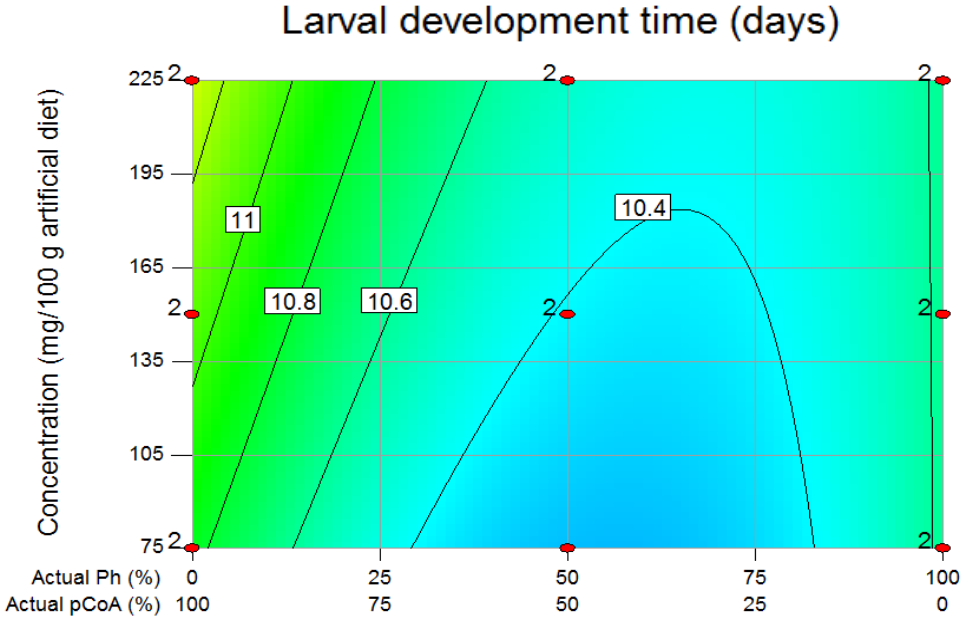


Figure 3.

Pupal development time (days)

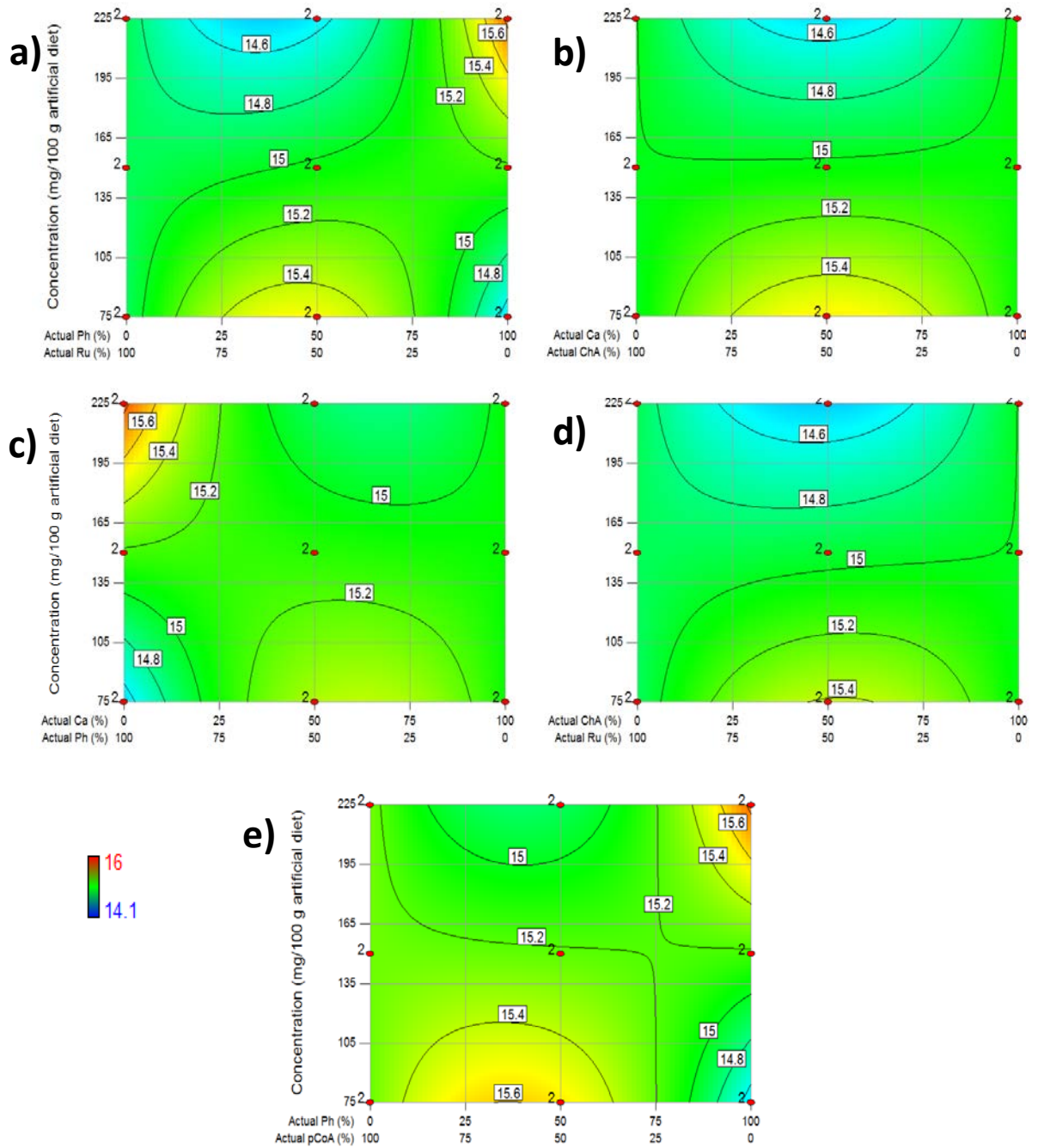


Figure 4.

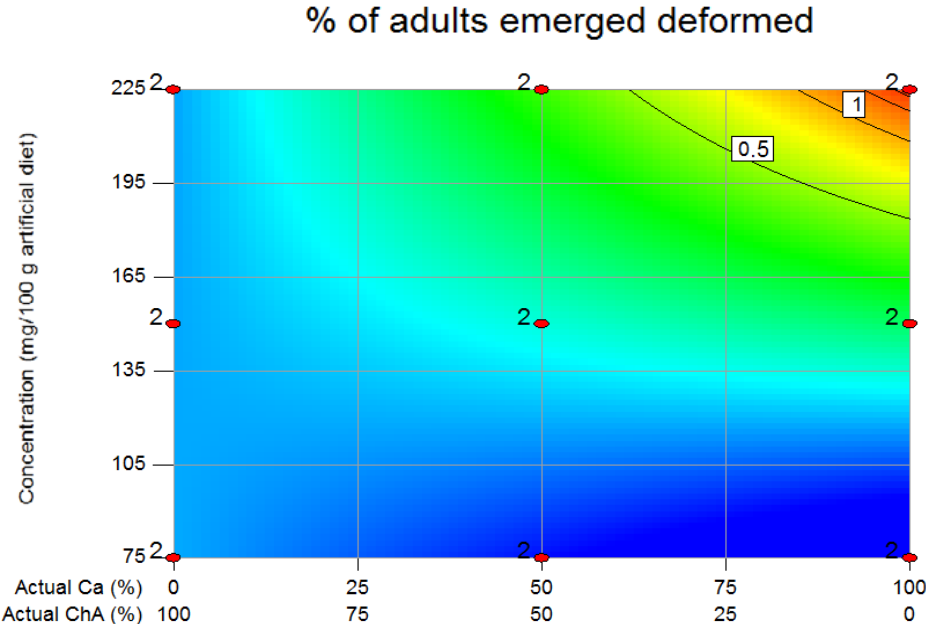
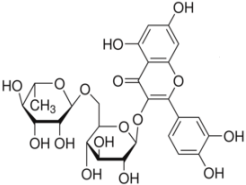
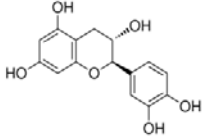
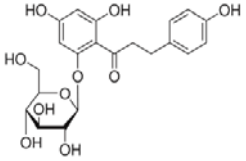
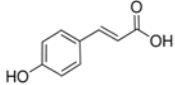
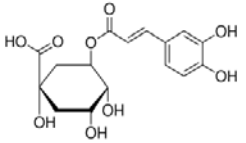


Table 1. Chemical properties of the phenolic compounds tested.

Compound	Purity (%) ^a	Empirical formula	Chemical class	Chemical subclass	Structure
Rutin (hydrate)	≥ 94	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Flavonoid	Flavonol	
(+)- Catechin (hydrate)	≥ 98	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Flavonoid	Flavanol	
Phloridzin (dihydrate)	≥ 99	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	Flavonoid	Dihydrochalcone	
p-Coumaric acid	≥ 98	C ₉ H ₈ O ₃	Phenolic acid	Hydroxycinnamic acid	
Chlorogenic acid	≥ 95	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Phenolic acid	Hydroxycinnamic acid	

^a As informed by the supplier.

Table 2. Ca-ChA-Ph-Ru-pCoA mixture-amount design points.

Design points	No. replicates	Mixture components (%)					Factor
		Ca	ChA	Ph	Ru	pCoA	Conc. (mg 100 g ⁻¹ AD)
1	2	0	0	0	0	100	75
2	1	60	10	10	10	10	113
3	2	50	0	0	50	0	225
4	2	0	0	0	50	50	225
5	2	0	0	0	50	50	150
6	3	20	20	20	20	20	150
7	2	50	0	50	0	0	225
8	2	0	0	100	0	0	75
9	2	0	50	0	50	0	225
10	2	50	50	0	0	0	225
11	2	0	0	50	50	0	225
12	1	10	10	10	60	10	113
13	1	50	50	0	0	0	225
14	2	0	0	50	0	50	75
15	2	50	0	50	0	0	75
16	2	0	50	0	0	50	75
17	1	10	10	10	10	60	188
18	2	0	0	100	0	0	150
19	2	50	0	0	0	50	75
20	2	0	0	100	0	0	225
21	2	0	100	0	0	0	150
22	2	0	0	0	100	0	225
23	1	50	0	0	0	50	75
24	2	0	0	0	50	50	75
25	2	0	0	50	0	50	225
26	2	0	50	50	0	0	75
27	2	0	50	0	0	50	225
28	2	0	0	0	100	0	150
29	2	100	0	0	0	0	150
30	2	50	0	0	50	0	75
31	2	0	0	50	50	0	75
32	2	0	50	50	0	0	225
33	2	0	0	0	0	100	150
34	2	50	0	0	50	0	150
35	2	50	0	0	0	50	150
36	2	0	50	0	50	0	150
37	2	50	0	50	0	0	150
38	2	0	0	50	0	50	150

Table 2. (Continued).

Design points	No. replicates	Mixture components (%)					Factor
		Ca	ChA	Ph	Ru	pCoA	Conc. (mg 100 g ⁻¹ AD)
39	2	0	0	50	50	0	150
40	2	50	50	0	0	0	150
41	2	0	50	50	0	0	150
42	2	50	50	0	0	0	75
43	2	0	50	0	0	50	150
44	2	100	0	0	0	0	225
45	2	0	0	0	100	0	75
46	2	100	0	0	0	0	75
47	2	0	50	0	50	0	75
48	2	0	0	0	0	100	225
49	2	50	0	0	0	50	225
50	1	10	10	10	60	10	188
51	2	0	100	0	0	0	75
52	2	0	100	0	0	0	225
53	1	10	10	10	10	60	113

Experiment is a five-component mixture of the phenolic compounds catechin (Ca), chlorogenic acid (ChA), phloridzin (Ph), rutin (Ru), and p-coumaric acid (pCoA), and one quantitative factor total concentration of polyphenol. The mixture components are listed as percentages with their amounts matched to the concentration of total phenolic compounds present in the mixture.

Table 3. ANOVA to assess the effect of 0.5 and 1 ml of 95% ethanol (EtOH) upon developmental performance of *Anastrepha ludens* . Means + SE.

Treatment	Larval weight (mg)	Larval developn time (days)	Pupal weight (mg)	Pupal developn time (days)	% pupation	% emergence	% survival neonate-adult
Control	24.5 (± 1.3)	10.2 (± 0.2)	21.4 (± 0.5)	13.4 (± 0.2)	85.5 (± 7.3)	98.5 (± 1.4)	84.4 (± 8)
0.5ml EtOH	23.5 (± 2.3)	10.3 (± 0.1)	22.9 (± 0.7)	13.5 (± 0.1)	85.5 (± 4.8)	98.5 (± 1.4)	84.4 (± 5.8)
1 ml EtOH	23.7 (± 0.3)	9.8 (± 0.2)	22.4 (± 0.6)	13.2 (± 0.1)	93.3 (± 5.1)	93.8 (± 3.5)	87.8 (± 7.3)
F	0.12	2.3	1.5	1.1	0.6	1.4	0.07
DF	2, 6	2, 6	2, 6	2, 6	2, 6	2, 6	2, 6
P	0.9	0.17	0.29	0.38	0.58	0.32	0.93

Table 4. ANOVA, coefficient estimates, and summary statistics for larval developmental performance in response to different mixtures and amounts of Ca-Ru-Ph-ChA-pCoA added to its artificial diet.

Model	7 d old larval weight			Larval development time			Pupal development time			Adults emerged deformed		
	F Value	p-values	Coefficient estimate	F Value	p-values	Coefficient estimate	F Value	p-values	Coefficient estimate	F Value	p-values	Coefficient estimate
Linear mixture	4.35	0.0001		5.55	< 0.0001		4.08	< 0.0001		3.88	0.0031	
Ca	2.26	0.0696		4.31	0.0031		1.54	0.1977		1.13	0.3467	
ChA	-	-	21.11	-	-	10.60	-	-	15.06	-	-	0.62
Ph	-	-	21.09	-	-	10.79	-	-	15.01	-	-	0.83
Ru	-	-	18.82	-	-	10.62	-	-	15.18	-	-	0.78
pCoA	-	-	18.71	-	-	10.68	-	-	14.89	-	-	0.75
Ca x ChA	-	-	19.17	-	-	11.07	-	-	15.25	-	-	0.96
Ca x Ru	5.38	0.0227	-10.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca x Ph	3.66	0.0589	7.97	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca x (concentration)	5.05	0.0272	1.76	-	-	-	-	-	-	14.89	0.0002	-0.50
ChA x pCoA	9.36	0.003	-12.68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ph x Ru	12.39	0.0007	14.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ph x pCoA	-	-	-	11.57	0.0010	-1.83	-	-	-	-	-	-
pCoA x (concentration)	-	-	-	5.00	0.0278	0.23	-	-	-	-	-	-
Ph x (concentration)	-	-	-	-	-	-	16.52	0.0001	0.66	-	-	-
Ca x ChA x (concentration)	-	-	-	-	-	-	7.81	0.0064	-2.04	-	-	-
Ca x Ph x (concentration)	-	-	-	-	-	-	7.77	0.0066	-2.32	-	-	-
ChA x Ru x (concentration)	-	-	-	-	-	-	6.57	0.0121	-1.86	-	-	-
ChA x pCoA x (concentration)	-	-	-	-	-	-	2.91	0.0917	-1.25	-	-	-
Ph x Ru x (concentration)	-	-	-	-	-	-	15.73	0.0002	-3.22	-	-	-
Ph x pCoA x (concentration)	-	-	-	-	-	-	10.73	0.0015	-2.67	-	-	-
Lack of fit	p = 0.5509			p = 0.99			p = 0.8848			p = 0.064		
Model type ^a	Reduced quadratic x linear			Reduced quadratic x linear			Reduced quadratic x linear			Reduced linear x linear		
Transformation ^b	None			None			None			Power (% of adults emerged deformed + 1) ^{2,6}		
R ²	0.31			0.27			0.35			0.18		
R ² _{adj}	0.24			0.22			0.26			0.13		

^a Model reduction by backward elimination

^b Determined by a Box-Cox plot analysis

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Dada la importancia de algunos metabolitos secundarios en la resistencia de las plantas al ataque de insectos herbívoros, muchos de los estudios que han abordado este tema, se han enfocado en especies de insectos plaga y metabolitos secundarios presentes en sus plantas hospederas (e.g., Fulcher *et al.* 1998, Salvador *et al.* 2010). Estudios de este tipo pueden ayudar a mejorar los programas de manejo del insecto plaga, pues la resistencia de las plantas puede ser incrementada si se induce en ellas la producción de aquellos compuesto que afecten negativamente el crecimiento, reproducción o supervivencia del insecto (Gogi *et al.* 2010). *A. ludens* es una plaga agrícola que ataca varios frutos de importancia económica (Aluja *et al.* 1996), y tiene el potencial de invadir nuevos sitios donde existen plantas que actualmente no son sus hospederas (Aluja *et al.* en preparación). Los resultados de este estudio sugieren que la expansión de *A. ludens* a nuevos hospederos, puede ser limitada no sólo por la presencia de compuestos defensivos individuales sino por sus diversas combinaciones.

Existen diversos estudios que han evaluado el efecto individual y en conjunto de varios metabolitos secundarios agregándolos a dietas artificiales o material vegetal del que se alimenta un insecto (e.g., Diawara *et al.* 1993, Stamp y Yang 1996). Las aproximaciones experimentales de estos estudios resultan inadecuadas, pues requieren dos experimentos independientes para evaluar, primero, el efecto particular de un solo compuesto, y después, el efecto de mezclarlo con otros. Además, las mezclas evaluadas en estos estudios, no consideran el efecto de la proporción y cantidad total de los compuestos estudiados, lo cual ha sido reconocido como un factor importante en los efectos sinérgicos que puedan tener dos o más compuestos (Calcagno *et al.* 2002). En ese sentido, la aproximación experimental utilizada en este trabajo resulta ser muy útil para estudiar simultáneamente el efecto de varios compuestos individuales en diferentes

concentraciones, así como de diferentes mezclas, por lo que se sugiere que en estudios donde se busque evaluar el efecto de metabolitos secundarios individuales y sus mezclas (agregados a dietas artificiales o material vegetal) en insectos, los experimentos de mezcla-cantidad siempre sean considerados.

Finalmente, se concluye que:

1. El efecto de algunos compuestos fenólicos en el desarrollo de *A. ludens* dependió de su interacción con otros, así como de la concentración en la que se agregaron a la dieta artificial.
2. Compuestos individuales y mezclas binarias afectaron el peso de larvas, tiempo de desarrollo de larvas y pupas, así como la incidencia de deformidades en adultos; mientras que las mezclas quinarias no mostraron ningún efecto.
3. ChA necesitó mezclarse con Ca o pCoA para disminuir el peso de larvas.
4. Ca en concentraciones elevadas aumentó el peso de larvas y la incidencia de deformidades en adultos, y su mezcla con Ph afectó el tiempo de desarrollo de pupas.
5. pCoA retrasó el tiempo de desarrollo de larvas, y cuando se mezcló con Ph este efecto fue debilitado.
6. El efecto de los compuestos fenólicos evaluados pudo haber sido enmascarado y/o amortiguado por el alto contenido de proteínas en la dieta artificial empleada. Para un próximo estudio, se sugiere usar un diseño experimental de mezclas para modificar la dieta artificial de las larvas y probar esta hipótesis.

LITERATURA CITADA

- Aluja, M., H. Celedonio-Hurtado, P. Liedo, M. Cabrera, F. Castillo, J. Guillén, y E. Rios. 1996. Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 89:654-667.
- Calcagno, M.P., J. Coll, J. Lloria, F. Faini, y M.E. Alonso-Amelot. 2002. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* 28:175-191.
- Diawara, M.M., J.T. Trumble, K.K. White, W.G. Carson, y L.A. Martinez. 1993. Toxicity of linear furanocoumarins to *Spodoptera exiguua*: evidence for antagonistic interactions. *Journal of Chemical Ecology* 19:2473-2484.
- Fulcher, A.F, T.G. Ranney, y J.D. Burton. 1998. Role of phenolics in host plant resistance of *Malus taxa* to adult Japanese beetle. *HortScience* 33:862-865.
- Gogi, M.D., M. Ashfaq, M.J. Arif, R.M. Sarfraz, y N.N. Nawab. 2010. Investigating phenotypic structures and allelochemical compounds of the fruits of *Momordica charantia* L. genotypes as sources of resistance against *Bactrocera cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae). *Crop Protection* 29:884-890.
- Salvador, M.C., A.L. Boica Jr., M.C.N. Oliveira, J. P da Graca, J.P., D. M da Silva, y C.B. Hoffmann-Campo. 2010. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)? *Neotropical Entomology* 39:774-783.
- Stamp, N.E., y Y. Yang. 1996. Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. *Ecology* 77:1088-1102.