

CONCENTRACIÓN DE QUITINA EN ESPECIES DEFOLIADORAS (*Zadiprion* spp.) DE *Pinus* EN LA SIERRA NORTE, OAXACA

CHITIN CONCENTRATION ON DEFOLIATOR SPECIES (*Zadiprion* spp.) OF *Pinus* IN THE SIERRA NORTE, OAXACA

^{1§}Mario Ernesto Suárez-Mota[✉], ¹Carlos Alberto Velasco-Paz[✉], ¹Lizbeth Luna-Bautista[✉], ²Irene Bautista-Juárez[✉], ³Luis Barbo Hernández-Portilla[✉], ¹Waldo Santiago Juárez[✉], ¹Wenceslao Santiago-García[✉]

¹Universidad de la Sierra Juárez (UNSIJ). Av. Universidad S/N. Barrio la Asunción, Ixtlán de Juárez, Oaxaca. C.P. 68725. ²Colegio de Postgraduados (COLPOS), Montecillos, Posgrado en Botánica. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco Montecillo, Texcoco Estado de México, México. C.P. 56264. ³Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Laboratorio Nacional en Salud: Diagnóstico Molecular y Efecto Ambiental en Enfermedades Crónico-Degenerativas. Av. de los Barrios. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Estado de México, México. C.P. 54090. §Autor de correspondencia (mesuarez@unsij.edu.mx).

RESUMEN

El género *Zadiprion* incluye insectos defoliadores de gran importancia debido a que presenta un estatus de plaga, esto aunado a las grandes infestaciones que provoca pérdida de bosques. El conocimiento escaso que se tiene del comportamiento y la forma de su distribución es una limitante para tomar medidas de prevención o control contra el ataque de estos insectos defoliadores. El objetivo planteado es caracterizar la composición química y concentración de quitina en la cubierta de la pupa de especies defoliadoras de pinos registrada en la Sierra Norte de Oaxaca. Se determinó la composición química de *Zadiprion* sp. mediante una digestión química y el uso de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Los resultados obtenidos permitieron hacer una determinación de la composición química de *Zadiprion* sp. en las diferentes etapas de su ciclo de vida (pupa, larva mosca). Adicionalmente, se registró la concentración de quitina en las estructuras corporales de la especie analizada, mediante el uso de ATR-FTIR se determinaron las bandas de absorción correspondientes al grupo funcional amida y las vibraciones de tensión que se registran, lo que afirma que uno de los componentes resultantes del producto después de la desmineralización y desproteinización es quitina.

Palabras clave: ATR-FTIR, Diprionidae, Ixtepeji, Ixtlán, mosca sierra.

ABSTRACT

The *Zadiprion* genus includes defoliating insects of great importance, due to its pest status and the large infestations that cause forest loss. The scarce knowledge of their behavior and distribution is a limitation to take preventive or control measures against the attack of these defoliating insects. The objective of the present work is to characterize the chemical composition and concentration of chitin in the pupal cover of pine defoliator species registered in the Sierra Norte of the state of Oaxaca. The chemical composition of *Zadiprion* sp. was determined by chemical digestion and the use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results obtained allowed a determination of the chemical composition of *Zadiprion* sp. in the different stages of its life cycle (fly, larva and pupa). Additionally, the concentration of chitin in the body structures of the analyzed species was recorded. Using ATR-FTIR, the absorption bands corresponding to the amide functional group and the stress vibrations recorded were determined, which affirms that one of the resulting components of the product after demineralization and deproteinization is chitin.

Index words: ATR-FTIR, Diprionidae, Ixtepeji, Ixtlán, sawfly.

INTRODUCCIÓN

Una plaga forestal puede causar daños a los árboles, bosques y a los productos forestales; pueden ser insectos y otro tipo de vida silvestre, así como plantas parásitas como el muérdago (FAO, 2018). Su presencia se debe a factores, como la dinámica poblacional de los insectos y patógenos, el estrés al que se somete la vegetación forestal, cambios climáticos, deterioro por actividades humanas (FAO, 2018). Además, pueden incidir negativamente en el crecimiento e incluso en la supervivencia de los árboles.

Zadiprion es un género de la familia Diprionidae comúnmente llamadas moscas sierra, siendo su principal fuente de alimento el follaje de árboles de *Pinus* spp. Dichos insectos son nativos de los Estados Unidos de Norteamérica, México y Guatemala, se tienen registros de seis especies hasta ahora descritas *Zadiprion falsus* Smith, *Z. towsendi*, *Z. howdeni*, *Z. ojedae*, *Z. roteus* y *Z. rhoweri*, todas ellas se encuentran presentes en México (Smith et al., 2012).

Las especies del género *Zadiprion* se caracterizan por sus hábitos gregarios en su fase larvaria para alimentarse, de una sola hoja. Las larvas causan los mayores daños ya que se alimentan del follaje, llegando a defoliar totalmente a los árboles. Otra característica importante, es que empiezan a devorar la corteza de la ramilla, lo que provoca la muerte total o parcial del árbol (Cibrián et al., 1995).

La quitina es un componente químico ampliamente distribuido en la naturaleza. Siendo uno de los primeros polisacáridos más abundantes en la tierra (Dumitriu, 2005). Barbosa-Corona y Escudero-Abarca (2002) han investigado las

propiedades de las quitinasas para atacar a insectos que constituyen plagas, debido a que la quitina es un componente de insectos, nemátodos, hongos y moluscos, es una biomolécula importante para plantear estrategias de control biológico (Barbosa-Corona y Escudero-Abarca, 2002). Las concentraciones de quitina contenida en organismos defoliadores se pueden reconocer mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) por la reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), que permite analizar una muestra hasta una profundidad de 5 μm (Ochiai, 2015). Las vibraciones moleculares en los espectros son características de los grupos funcionales, y dependen del ambiente químico en el que están presentes (Tasumi, 2015). Además, se puede estimar el contenido de minerales, lípidos y carbohidratos de la cubierta de la pupa de un defoliador y así realizar una estrategia para su control. En las especies del género *Zadiprion*, no se tiene aún conocimiento de su composición química, así como de su posible contenido de quitina en su estructura corporal. Por lo cual, se plantea el objetivo para determinar contenido de quitina en la cubierta de la pupa de especies defoladoras de pinos registrada en la Sierra Norte de Oaxaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La Sierra Norte de Oaxaca es una de las ocho regiones económicas en las que administrativamente se divide el estado. Su extensión territorial es de 9,347.96 km², cifra que representa el 9.8 % de la superficie estatal. Está integrada por comunidades zapotecas, mixes y chinantecas, abarca tres de los 30 distritos político-administrativos que integran esta entidad federativa: Ixtlán de Juárez, Villa Alta y Mixe (Fernández y Salinas, 2012) (Figura 1).

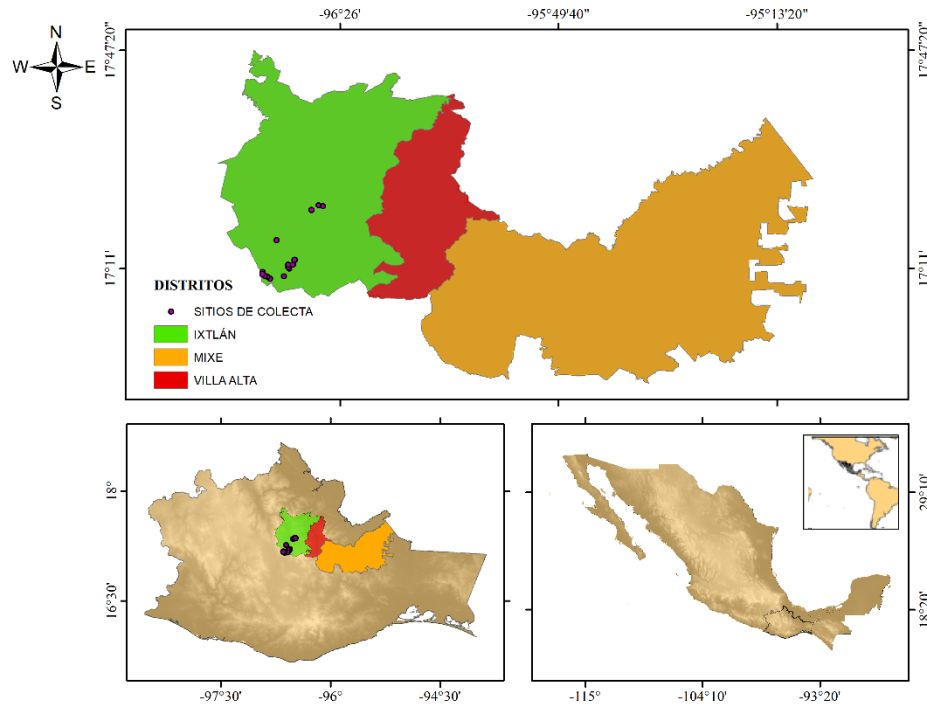


Figura I. Localización Geográfica de la Sierra Norte de Oaxaca.

Diseño de muestreo y distribución de especies

Se realizaron registros de campo en la región mediante la colecta de las especies del género *Zadiprion* sp. Las cuales fueron georreferenciadas con un geoposicionador satelital (GPS, Garmin eTrex X 20®). Los ejemplares colectados fueron depositados en frascos herméticos con alcohol al 70 %, para posteriormente ser identificados.

Obtención de harina de *Zadiprion* sp. para analizar el contenido de quitina

Las muestras colectadas de *Zadiprion* sp. en sus tres fases (pupa, larva y mosca) se limpiaron de manera manual y se lavaron con agua destilada varias veces posteriormente, se metieron a un horno de secado con circulación forzada marca Kiossa®, por dos horas a 60°C, una vez secas se molieron en un mortero. Finalmente, la harina obtenida se colocó en bolsas herméticas para protegerla de la humedad y la luz.

Transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR)

El análisis FTIR es una técnica que determina los aspectos moleculares (grupos funcionales, y tipos

de enlaces químicos) y estructurales (conformación cristalina) en compuestos como son la quitina y el quitosano (Kaya et al., 2015a). Con base en su arreglo molecular, la quitina se encuentra en la naturaleza de tres formas cristalinas diferentes; α , β y γ (Kaya et al., 2015b,c). Las muestras se analizaron con un espectrómetro marca Perkin Elmer (FT-IR/NIR Spectrometer modelo Frontier®).

El espectro se obtuvo con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), con ventana de diamante a una resolución de 4 cm^{-1} , y con un barrido de número de onda ($1/\lambda$) de 4000 a 400 cm^{-1} .

La harina resultante se colocó sobre el diamante del accesorio ATR, ejerciendo una presión de 80 unidades y se realizó el análisis en el software Spectrum (Versión 10.5.2). Se llevaron a cabo diez repeticiones de las muestras previamente obtenidas de *Zadiprion* sp. para cada caso (pupa, larva, y mosca), para comparar los espectros y tener veracidad en los gráficos obtenidos.

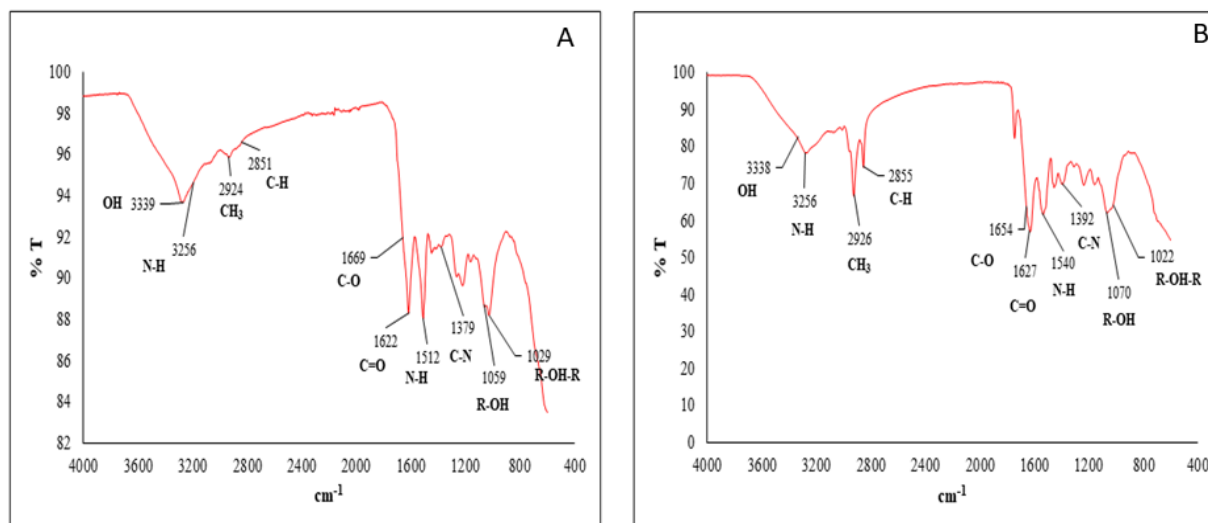


Figura 2. Espectro de infrarrojo con trasformada de Fourier, obtenido para quitina de *Zadiprion* sp. en el pre-tratamiento A) Pupa y B) Adulto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de infrarrojo de la quitina que se observaron fueron de la pupa previamente lavados y retirada la materia orgánica que pudiera traer, sin ningún proceso químico. En estos espectros se observó que existen ciertas similitudes en el caso de la pupa (Figura 2A) como en el adulto (Figura 2B) de *Zadiprion* sp. En los dos espectros se observaron las tres bandas típicas del grupo funcional amida presentes en 1622, 1512 y 1379 cm⁻¹, estas bandas son características en las quitinas ya que corresponden al doble enlace C = O (Un

átomo de carbono conectado a un átomo de oxígeno a través del enlace doble). para la transmitancia en las bandas observadas.

En los espectros de infrarrojo de la quitina en la Pupa de *Zadiprion* sp. (post-tratamiento), que se obtuvieron mediante el FTIR, (Figura 3) se observaron también las bandas 1.622, 1.555 e 1.379 cm⁻¹, que corresponden al estiramiento del grupo carbonilo presente en la amida, a la vibración del enlace N-H de la misma amida y a la vibración del enlace del C-N de la amida respectivamente. (grupo carbonilo).

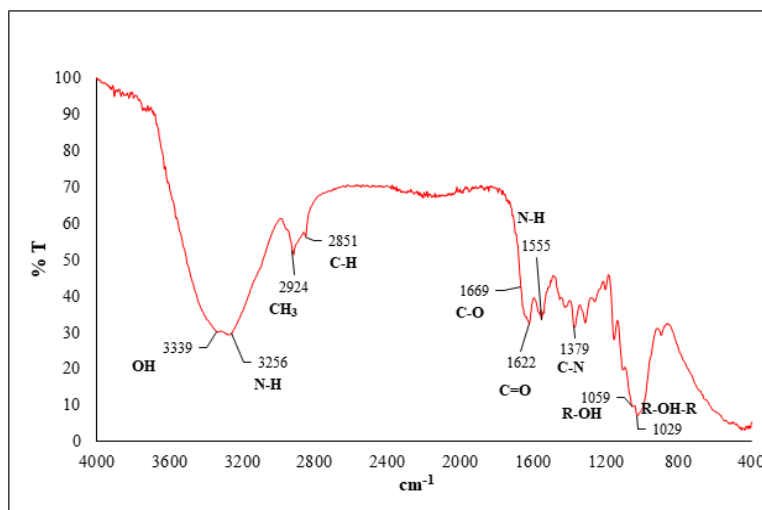


Figura 3. Espectro de infrarrojo con trasformada de Fourier, obtenido para quitina de la pupa de *Zadiprion* sp. en el pos-tratamiento.

La señal a 1622 cm^{-1} es generada por el estiramiento vibracional del enlace C-N del grupo $\text{C}=\text{O}$ superpuesto, como un grupo OH- por un enlace puente de hidrogeno. La banda presente a 1555 cm^{-1} es promovida por la flexión del enlace N-H en el grupo amida. La amida II de NH y la amida III de CN, respectivamente. Es importante señalar que las bandas del grupo carbonilo en la amida I de quitina se observan en 1.622 y 1.669 cm^{-1} , que se atribuye a los dos tipos de enlaces de H, formados por grupos amida en la alineación antiparalela presente en las regiones cristalinas de quitina.

Las bandas presentes entre 3500 y 2800 cm^{-1} en los espectros de quitina son el resultado de las tensiones vibracionales del grupo funcional OH debido a la captación de moléculas de agua y la presencia de OH de las estructuras de la quitina. La banda observada a 3339 cm^{-1} corresponde a la vibración del estiramiento de los grupos OH mientras que en la banda a 3256 cm^{-1} es correspondiente a la vibración de los NH_2 presentes. En cuanto a las bandas localizadas a 2851 y 2924 cm^{-1} , estas se pueden atribuir a la presencia de grupos metilo (CH_3) y al estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces CH. Las longitudes de onda entre 2800 y 1700 cm^{-1} indican que las interacciones de hidrogeno están menos pronunciadas y evidencio la presencia de grupos hidroxilo libres. Mientras que la deformación de los grupos CO-NH y CH_2 , se debieron a la formación de un grupo CO-NH .

Los resultados obtenidos indican la presencia de quitina en las fases del ciclo de vida de especies de *Zadiprion*, este tipo de análisis no han sido desarrollados para estas especies. Sin embargo, se ha aislado quitina en otros insectos de Orthoptera mediante técnicas químicas, teniendo resultados satisfactorios en cuanto al conocimiento de su composición molecular (Kaya, 2015b).

De acuerdo con lo reportado por Smith et al. (2012), una importante característica para la

determinación de especies de *Zadiprion* es la cantidad de sérrulas y la presencia o ausencia del primer anillo del ovopositor de las hembras. El segundo anillo del ovopositor femenino de las especies del género es el asociado a la primera sérrula, cuando se afirma que el primer anillo está ausente significa que no hay ningún anillo con dientes basales al segundo anillo. Los ejemplares colectados en la Sierra Norte de Oaxaca, presentan caracteres que de acuerdo con lo propuesto por Smith et al. (2012) las hembras de *Z. howdeni* Smith, son similares a *Z. falsus* en apariencia general, pero la lanceta u ovopositor carece del primer anillo, presentando un total de siete (**Figura 3A**). Mientras que en *Z. falsus*, las hembras tienen una lanceta en el primer anillo con tres o cuatro dientes, en total presenta 10 anillos (**Figura 4B**). *Z. roteus*, se caracteriza por su ovopositor que es similar al de *Z. howdeni* excepto por ligeras diferencias en el segundo y tercer anillo que están más juntos en *Z. roteus*, que presenta ocho anillos (Smith et al., 2012; **Figura 4C**).

Sin embargo, los ejemplares colectados que coinciden con estas especies son de muy baja frecuencia y restringidos solo a algunos sitios. No obstante, la especie con mayor abundancia y distribución no coincide con las especies antes citadas (**Figura 5**), lo cual hace suponer que se trata de una especie aún no registrada pudiendo ser alguna variedad de las ya reconocidas, esto será reforzado y determinado con validación de más ejemplares y consultando a especialistas en taxonomía. De estas especies del género, aún no bien identificadas se seleccionaron muestras para hacer los análisis de concentración de quitina en sus diferentes fases de vida. En trabajos previos se ha evaluado la distribución de *Zadiprion* en la Sierra Norte de Oaxaca, habiendo encontrado como especie abundante a *Z. howdeni* (Suárez-Mota et al., 2018). Sin embargo, se han registrado otras especies pertenecientes al género sin tener una evaluación de su distribución y relación con variables ambientales, por lo que es importante realizar trabajo de campo y taxonómico con mayor esfuerzo.



Figura 4. Ovipositores *Zadiprion*. Hembra: A) *Z. howdeni* Smith, B) *Z. falsus* Smith, C) *Z. roteus* Smith. Las fotografías se obtuvieron con una cámara Nikon® D3300 adaptada a un microscopio óptico Zeigen® usando un objetivo de 10x.

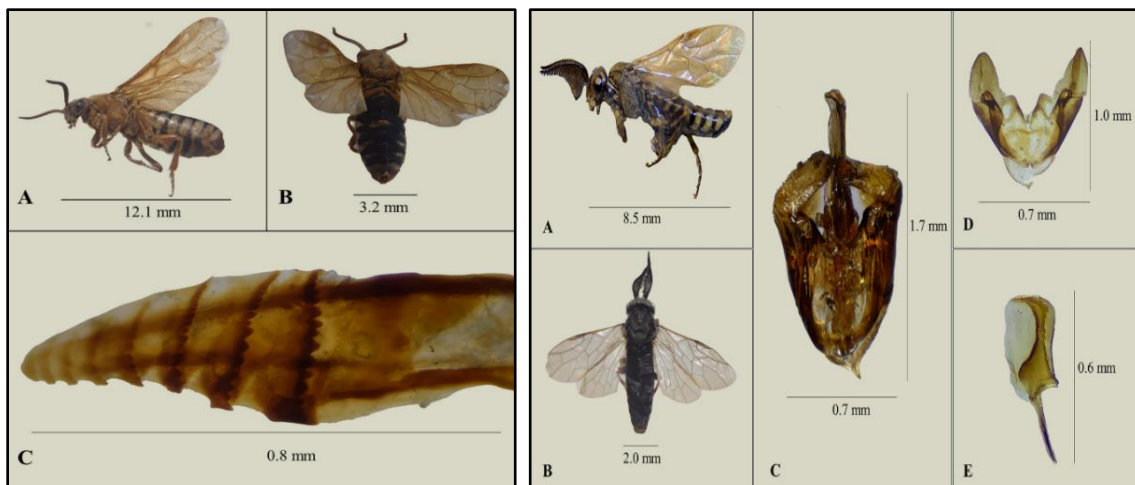


Figura 5. *Zadiprion* sp. Lado izquierdo Hembra: A) vista lateral, B) vista dorsal, C) Ovipositor. Lado derecho Macho: A) Vista lateral, B) Vista dorsal, C y D) Capsula Genital, E) Válvula peneana. Las fotografías se obtuvieron con una cámara Nikon D3300® adaptada a un microscopio óptico Zeigen® usando un objetivo de 10x.

CONCLUSIONES

Dentro del combate para la plaga se desconoce su composición química, cuando se encuentra en sus diferentes etapas de vida, derivado de ello, se determinó la presencia de quitina lo cual representa un estudio novedoso ya que podría llegar a solucionar la problemática de la plaga forestal (*Zadiprion* sp.) mediante la implementación de inhibidores de quitina en las etapas específicas de mayor presencia. La quitina aislada a partir de las

diferentes fases: mosca, larva y pupa ofrece una excelente alternativa para la obtención requerida, con el uso del *FTIR*, se observó mediante las bandas de absorción correspondientes al grupo funcional amida y las vibraciones de tensión que se registraron en las regiones, indican que el producto obtenido después de la desmineralización y desproteínización es quitina, tiene presencia en las tres fases de vida de *Zadiprion*, con mayor presencia en la fase de larva.

REFERENCIAS

- Barbosa-Corona, J. E. & Escudero-Abarca, B. I. (2002). Cómo usar una bacteria para combatir plagas y hongos. *Ciencia*, 53(3), 76-83.
- Cibrián, D., Méndez, J. T., Campos, R., Yates III, H. O. & Flores, J. (1995). *Insectos Forestales de México*. Universidad Autónoma Chapingo, México-SARH-USDA-FOREST SERVICE-COFAN. Chapingo, Estado de México, México. 453 p.
- Dumitriu, S. (2005). *Polysaccharidees. Structural, diversit and functional versatility*. Marcel Dekker, 2^a edition. New York, USA.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). *Sustainable Forest Management (SFM) Toolbox*. <http://www.fao.org/sustainable-forest-management/toolbox/modules/forestpests/basic-knowledge/es/>
- Fernández, M. & Salinas, J. (2012). *Defensa de los derechos territoriales en Latinoamérica*. RIL editores. Santiago de Chile, Chile.
- Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Menten A. & Sezen G. (2015a). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20, 168-179. DOI:10.1007/s12257-014-0391-z.
- Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A., & Baran T. (2015b). Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 797-805. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.034.
- Kaya, M., Lelesius, E., Nagrockaite, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran T., Can E. & Bitim, B. (2015c). Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female Grasshopper species. *PLOS ONE*, 10(1), e0115531. DOI: 10.1371/journal.pone.0115531.
- Ochiai, S. (2015). Attenuated Total Reflection Measurements. En: M. Tasumi (Ed.), *Introduction to experimental infrared spectroscopy: fundamentals and practical methods*. (UK. pp. 179-198). John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, W. Sussex.
- Pacheco-García, M. M., Bautista-Juárez, I., Santiago-García W., Luna Bautista L., Ruiz-Aquino F., Ramírez-García E. & Suárez-Mota, M. E. (2022). Análisis de la amplitud del nicho ecológico de *Zadiprion* spp., un defoliador de *Pinus* en el Sureste de México. *Bosque*, 43(3), 287-298.
- Smith, D. R., Sánchez, M. G. & Ojeda, A. A. (2012). A new species of *Zadiprion* (Hymenoptera: Diprionidae) on *Pinus durangensis* from Chihuahua, Mexico, and a review of other species of the genus. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 114(2), 224-237. DOI: 10.4289/0013-8797.114.2.224.
- Suárez-Mota, M. E., Pacheco-García, M. M., Cristóbal-Angulo, O. P., Antúnez, P., Santiago-García, W. & Bautista-Juárez, I. (2018). La plaga defoliadora *Zadiprion howdeni* Smith en la Sierra Norte de Oaxaca, México: estado actual y perspectivas. *Agroproductividad*, 11(7), 35-41.
- Suárez-Mota, M. E., Cristóbal-Angulo, O. P., Santiago-García, W. & Ruiz-Aquino, F. (2021). Distribution of the defoliating pest *Zadiprion falsus*: an analysis of overlapping niches of its hosts in Mexico. *Entomologica Americana*, 127(1), 5-11.
- Tasumi, M. (2015). Introduction to infrared spectroscopy. En: M. Tasumi, (Ed.). *Introduction to experimental infrared spectroscopy: fundamentals and practical methods*. (UK. pp. 3-13) John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, W. Sussex.