



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“COMPUESTOS VOLÁTILES QUE MEDIAN LA
INTERACCIÓN ENTRE *Anthonomus eugenii* Cano Y
Capsicum annum L.”**

JULIO CÉSAR VELÁZQUEZ GONZÁLEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

Montecillo, Texcoco, estado de México

2011

La presente tesis titulada: **Compuestos volátiles que median la interacción entre *Anthonomus eugenii* Cano y *Capsicum annum* L,** realizada por el alumno **Julio César Velázquez González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

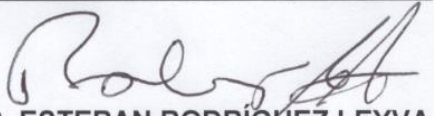
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

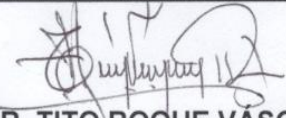
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. JUAN CIBRIÁN TÓVAR

ASESOR: 
DRA. CLAUDIA HIDALGO MORENO

ASESOR: 
DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

ASESOR: 
DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

ASESOR: 
DR. TITO ROQUE VÁSQUEZ ROJAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 18 de noviembre de 2011.

**“COMPUESTOS VOLÁTILES QUE MEDIAN LA INTERACCIÓN ENTRE
Anthonomus eugenii Cano Y *Capsicum annuum*”**

Julio César Velázquez González, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011.

Dado que el picudo del chile es el principal problema fitosanitario en el cultivo de *Capsicum* spp., y las medidas de control no han logrado mitigar de forma eficiente las poblaciones de este insecto, se estudiaron los siguientes objetivos con el fin de conocer las interacciones planta insecto. Primero se validó un método de recolecta de volátiles, el cual demostró ser eficiente bajo las diferentes variables analíticas estudiadas, con % de recobro de 90-100 y DER menores a 10%. En segundo lugar se evaluó el potencial atrayente de estructuras de la planta como flores, yemas, frutos en desarrollo y frutos comerciales, encontrando que machos prefieren en primer lugar flores y después yemas, y las hembras en su primera opción eligieron yemas y después flores. El tercer objetivo consistió en analizar los extractos volátiles obtenidos de las diferentes estructuras por cromatografía de gases/masas, encontrando cerca de 18 compuestos. Los principales compuestos encontrados e identificados fueron el salicilato de metilo, (E y Z)- β -ocimeno y (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrieno. En el cuarto objetivo se realizó un scan electrofisiológico con la mayoría de los compuestos identificados. Finalmente se realizó un análisis morfométrico y tipológico del rostrum y sensilla antenales para conocer si existía dimorfismo sexual.

Palabras clave: Validación, Feromona, *Capsicum*, sensilla, cromatografía.

"VOLATILE COMPOUNDS THAT MEDIAN INTERACTION BETWEEN

Anthonomus eugenii Cano AND *Capsicum annuum*"

Julio César Velázquez González, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011.

Since the pepper weevil is the main phytosanitary problem in growing *Capsicum* spp., and control measures have failed to efficiently mitigate the populations of this insect, we studied the following objectives to meet plant interactions insect. First we validated a method for collection of volatiles, which proved to be efficient under different analytical variables studied, with the recovery of 90-100% and RSD less than 10%. Second evaluated the potential attractant plant structures such as flowers, buds, developing fruits and marketable fruit and found that males prefer flowers first and then buds and females in their first choice buds and then chose flowers. The third goal was to analyze the volatile extracts of the different structures obtained by gas chromatography / mass, finding about 18 compounds. The main compounds found and identified methyl were salicylate, (E, Z)- β -ocimene and (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrieno. The fourth objective an electrophysiological scan performed with most of the identified compounds. Finally, morphometric analysis was performed and typological of the rostrum and antennal sensilla to know whether there was sexual dimorphism.

Key works: Validation, Pheromone, *Capsicum*, sensilla, Chromatography.

DEDICATORIA

Al único y sabio Dios, Creador de todas las cosas, visibles e invisibles; Sean tronos, sean reinos, sean potestades; todo fue creado por Él y para Él.

A mi querida y Amada Haydee, gracias por todo tu apoyo y paciencia, sin ti este reto hubiera sido difícil. Te amo.

A mis padres César Velázquez González y Uriba González Santizo por el apoyo que siempre me han dado.

A mis hermanos y sobrinos, Aremi, Tito, Ruth, César, Diana, Jimena, Gali.

A la familia Hernández de Gante; Armando, Sara, Geo, Hna. Eufrasia, David, Lety, Obed, Abigail, Laura y Mimi, por todo el apoyo que me han brindado, son toda una bendición.

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de Doctorado.
- Al Colegio de Postgraduados, por abrirme las puertas para poder alcanzar este logro académico en mi formación profesional.
- Al Dr. Juan Cibrián, por toda la orientación, apoyo y consejos recibidos durante mi larga estancia en el laboratorio de Ecología Química, gracias por que no solo me oriento en lo profesional si no también en la parte humana.
- A la Dra, Claudia Hidalgo por su asesoría y consejos durante el desarrollo de este trabajo.
- Al Dr. Néstor Bautista, por su apoyo incondicional recibido en todo momento y por las oportunidades que me ha brindado.
- Al Dr. Esteban, por aceptar ser parte de mi consejo particular, por sus asesorías, consejos y su buena disposición.
- Al Dr. Tito Roque Vásquez Rojas, gracias por la asesorías y por enseñarme un poco de los mucho que sabe.
- Al Dr. Marcos Soto por su amistad, apoyo y asesorías recibidas durante el desarrollo de ese trabajo.
- A mis compañeros con los que coincidí dentro y fuera del Laboratorio de Ecología Química: Dr. Cristóbal Aldama, Dr. Roberto Flores, Dr. Carlos Acatitla, MC. Gaby Hernández, MC. Israel Barrientos, MC. Manolo Muñoz, MC. Ausencio Azuara, Estrella Mendoza, MC Fidelito, MC. Greta, MC. Jorge, Cindy, Edith y Vero gracias por su amistad y el apoyo que siempre me han brindado.
- Al Dr. Gonzalo Silva, gracias por tu amistad desde el fin del mundo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	ix
REVISIÓN DE LITERATURA	xii
HIPÓTESIS	xvi
LITERATURA CITADA	xvi
CAPÍTULO 1	1
VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE AIREACIÓN DINÁMICA PARA LA CAPTURA DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE <i>Capsicum</i> spp.	1
RESUMEN	2
1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
1.4 CONCLUSIONES	18
1.5 LITERATURA CITADA	19
CAPÍTULO 2	21
RESPUESTA OLFATORIA DE <i>Anthonomus eugenii</i> (COLEOPTERA : CURCULIONIDAE) A VOLÁTILES DE <i>Capsicum annum</i>	21
ABSTRACT	21
RESUMEN	22
2.1 INTRODUCCIÓN	23
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
2.4 CONCLUSIONES	41
2.5 LITERATURA CITADA	42
CAPÍTULO 3	47
Morfometría del rostrum y tipología de las sensilla antenales de <i>Anthonomus eugenii</i> Cano (Coleoptera: Curculionidae)	47
Resumen.	47
Abstract	47
3.1 INTRODUCCIÓN	49
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.4 CONCLUSIONES	57
3.5 LITERATURA CITADA	58
CONCLUSIONES GENERALES	59

Lista de Figuras

Fig. 1.1. Cromatograma obtenido del análisis de la mezcla de estándares con sus respectivos tiempos de retención por CC/MSD.....	28
Fig. 2.1. Respuesta electrofisiológica promedio (\pm ee) de adultos machos y hembras de <i>Anthonomus eugenii</i> a 5 μ g de compuestos volátiles de <i>Capsicum annuum</i>	54
Fig. 2.2. Respuesta promedio de EAG (\pm EE) de adultos de <i>Anthonomus eugenii</i> a diferentes dosis de compuestos sintéticos.....	57
Fig. 2.3. Respuesta acumulada entre Adultos de <i>A. eugenii</i> a estándares evaluados.....	59
Fig.3.1. Antena de hembra de <i>A. eugenii</i> en MEB. S=escapo; P=pedicelo; F1-F9 = flagelómeros.....	77
Fig. 3.2. Tipología de sensilla antenal de <i>A. eugenii</i> (a) club antenal presentando la distribución de sensillas (X=350); (b, c y d).	78
Fig. 3.3. Sensilla tipo 1.....	79
Fig. 3.4. Sensilla basicónica con estría.....	80

Lista de Cuadros

Cuadro1.1. Selección de iones para la cuantificación de cada estándar	29
Cuadro 1.2. Estudio de linealidad del método de AD por cromatografía de gases masas ...	30
Cuadro 1.3. Respuesta cromatográfica vs concentración de estándar.....	32
Cuadro 1.4. Exactitud del método para los estándares evaluados por AD.....	36
Cuadro 2.1. Preferencia y actividad de <i>Anthonomus eugenii</i> a diferentes estructuras de <i>Capsicum</i> y feromona de agregación.....	51
Cuadro 2.2. Compuestos identificados por cromatografía de gases acoplado a detector selectivo de masas en extractos volátiles de <i>Capsicum annuum</i>	54
Cuadro 2.3. Resultado de la prueba Anova de dos vías evaluando el efecto del sexo y dosis y la interacción dosis x sexo de la respuesta electrofisiológica de <i>A. eugenii</i> a volátiles de su planta hospedera.....	58
Cuadro 3.2. Longitud del rostrum e inserción de antenas.....	76
Cuadro 3.2. Medición de los segmentos antenales.....	77
Cuadro 3.3. Morfometría de sensilla en antenas de machos y hembras.....	81

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México junto con el maíz y frijol, el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L) es uno de los productos de mayor consumo, y forma parte importante de la alimentación. México es considerado uno de los centros de origen de este cultivo, y destaca a nivel mundial por tener la mayor variabilidad genética con alrededor de 40 cultivares, en esta gran lista destacan el serrano, jalapeño, ancho, pasilla, guajillo y de árbol (ASERCA, 1998). El consumo *per capita* en México se estima en 7.1 kgr. de chile por año en donde el mayor porcentaje corresponde a chiles picantes (FAO, 2005). Respecto al consumo de chile en otras latitudes, este no forma parte esencial de las costumbres de alimentación. Sin embargo gran parte de su consumo se da principalmente en países localizados en Asia, África y Latinoamérica.

En el ámbito internacional el cultivo de chile o pimiento presenta incrementos importantes en producción, derivados en aumentos en superficie sembrada y mayores rendimientos por hectárea (SIAP, 2010). En 1980 se cosecharon 909 mil hectáreas, con una producción de 7,6 millones de toneladas y rendimiento promedio de 8,4 toneladas por hectárea. En el 2003, la superficie ascendió a 1,5 millones de hectáreas con producción total de 22,7 millones de toneladas y rendimiento promedio de 14,4 ton/ha. Esto representó un crecimiento del 48% de superficie cultivada. Entre los principales países productores en 2006 China fue

país que tuvo mayor participación en la producción. Su superficie sembrada actual es de 612,800 ha, con lo que representan un 36% de la superficie mundial, con una producción de 12'531,000 toneladas, esto es más de la mitad de la producción mundial de chiles al año (SIAP, 2010). México ocupa el segundo lugar en volumen de producción y el tercero en superficie cosechada, con 140,693 ha y 1'853,610 toneladas, participando con el 8% del área y el 7% de la producción mundial.

A pesar de que México es el segundo en volumen de producción del cultivo de chile, es por países como Turquía, España y EE.UU., cuando se compara los rendimientos por hectárea. En México en promedio se obtiene 14,74 ton/ha, y en los países mencionados la producción es de 19.8, 42.3 y 28.4 ton/ha, respectivamente.

De manera particular, los principales factores limitantes en la producción de chile en México son los daños ocasionados por insectos, hongos, bacterias y virus. Aunque de manera conjunta se considera a los insectos, patógenos o malezas ser los responsables del 37 al 50% de las pérdidas reportadas en la agricultura mundial (Pimentel et al. 1991; Sweetmore et al. 2001; Oerke, 2005). El cultivo de chile tiene varias especies de insectos que son plaga. No obstante, *Anthonomus eugenii*, conocido en México como picudo del chile o barrenillo, es considerado uno de los insectos plaga de mayor importancia en cualquier variedad de chile cultivado (*Capsicum* spp.) en Estados Unidos de Norteamérica, Hawaii,

México, América Central, y algunas islas del Caribe (Elmore et al. 1934, Burke & Woodruff 1980, Riley & King 1994, Arcos et al. 1998). Los adultos del picudo se alimentan en yemas, flores, frutos y ocasionalmente sobre las hojas del cultivo; sin embargo, el mayor daño es ocasionado por las larvas que se desarrollan en el interior de los frutos en desarrollo alimentándose de la placenta y semillas, lo que causa abscisión (Cano y Alcacio 1894; Elmore et al. 1934). El daño económico puede ser muy elevado (30-90%) si no se realizan medidas de control, básicamente prácticas culturales y aplicación de insecticidas (Elmore et al. 1934; Riley & Sparks, 1995; Arcos et al. 1998).

El picudo del chile fue reportado como plaga de este cultivo en México y EE. UU., hace más de 100 años (Cano y Alcacio, 1894; Elmore et al. 1934) y las estrategias de manejo contra este insecto no han variado de forma significativa. El control biológico es una herramienta más que debería implementarse dentro del manejo integrado. Sin embargo, no se ha considerado una opción viable debido probablemente a que los enemigos naturales del picudo del chile no se conocen ni se han estudiado en su totalidad (Rodríguez-Leyva et al. 2007). El uso de semioquímicos representa una estrategia más dentro de un MIP, ya que los picudos del chile como muchos otros insectos dependen del olfato para desempeñar sus actividades de comportamiento (Birch, 1948; Haynes, 1982).

El desarrollo de métodos de monitoreo, a través del entendimiento del papel de las feromonas de agregación de la especie hermana del picudo del chile el picudo del algodón, *Anthonomus grandis*, y del mejoramiento en su producción y eficiencia (Dickerson et al. 1987; Dickens, 1989), son excelentes ejemplos para continuar estudiando el efecto de ciertas sustancias derivadas de la planta hospedera que pudieran usarse en combinación con la feromona para mejorar la atracción del picudo del chile en campo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Ecología química. Las plantas liberan cientos de compuestos volátiles al ambiente y su presencia y concentración, en algunos grupos, puede ser una característica diferencial (Smith, 1976). Estos compuestos volátiles comúnmente incluyen alcoholes de cadena corta, aldehídos, ésteres, compuestos aromáticos, mono y sesquiterpenos (Bernays y Chapman, 1994). Los compuestos químicos que las plantas liberan se usan como señales químicas por los insectos y juegan un papel importante en el proceso de selección insecto-planta en muchas especies de insectos fitopatógenos (Bernays & Chapman, 1994; Angioy et al. 2003). Estas señales químicas son recibidas por los insectos a través de receptores químicos presentes, principalmente, en las antenas, donde 90% de las neuronas presentes en los flagelómeros tienen actividad olfatoria (McIver, 1978,1980). Consecuentemente, la identificación y la cantidad de volátiles de

plantas hospederas, y que son usadas por los insectos, es crucial para un buen entendimiento de los patrones de interacción entre insecto-planta, y al mismo tiempo es necesario el desarrollo de métodos de monitoreo más eficientes y/o tácticas de control (Cook et al. 2007). En Lepidóptera, los compuestos derivados de mezclas de plantas hospederas son necesarios para elicitación o desencadenar una respuesta de atracción en adultos. Algunos ejemplos son *Cydia (Grapholita) molesta* (Busck) (Tortricidae) (Natale et al. 2003), *Lobesia botrana* D. & S. (Tortricidae) (Tasin et al. 2006), *Autographa gamma* L. (Noctuidae) (Plepyš et al. 2002), and *Argyresthia conjugella* Zeller (Argyresthiidae) (Bengtsson et al. 2006). No obstante, en algunas especies, por ejemplo, en la palomilla de la manzana, *Cydia pomonella* L. (Tortricidae), los compuestos solos como (*E,E*)- α -farneseno (Hern & Dorn, 1999), butil hexanoato (Hern & Dorn, 2004), y etil (2*E*, 4*Z*)-2,4-decadienoato (Light et al. 2001; Light & Knight, 2005) han mostrado ser atrayentes de otras palomillas. Por lo tanto, los compuestos volátiles liberados por las plantas funcionan como señales químicas y juegan un papel muy importante para los insectos en la localización de fuentes de alimento, sitios de oviposición y refugio o provocando efectos de atracción o repulsión (Bentley y Day, 1989). En otros casos pueden actuar como atrayentes de sus enemigos naturales (Thaler et al. 2002).

En muchos estudios se ha documentado la presencia de feromonas en la subfamilia Rhychophorinae (Bartelt, 1999), así como también sea documentado el sinergismo entre compuestos liberados por las plantas y ciertas combinaciones de

feromonas (Rochat et al. 1991). Dentro de estas feromonas destacan las feromonas de agregación, las cuales son sustancias con actividad intra-específicas modificadoras del comportamiento, son atrayentes de ambos sexos y pueden actuar en un amplio rango y atraer a cientos de individuos del mismo sexo (Wyatt, 2003; Rechcigl et al. 1998). Estas feromonas de agregación generalmente son más complejas en su estructura química (e. g., compuestos cíclicos o compuestos quirales) y son capaces de elicitar un comportamiento complejo; el cual es menos abierto a manipulación. (Incoe et al. 1990; Howse et al. 1998). Recientemente algunos semioquímicos de picudos se han usado como una herramienta en las estrategias de manejo del picudo del algodón (Dickerson et al. 1987). Otro ejemplo es para el picudo del tomate de cáscara, *Trichobaris championi*, en donde se observó que los volátiles liberados por esta planta atraen a este insecto (Calyecac-Cortero et al. 2006).

En algunos casos el uso de feromonas en conjunto con volátiles del hospedero se han empleado como métodos de trapeo en varias especies de picudos (Ramírez-Lucas et al. 1996; Piñero et al. 2001; Alpizar et al. 2002). En varios trabajos se ha documentado este sinergismo en el cual se observó un mayor efecto de feromonas de agregación cuando estas se mezclaron con los volátiles de la planta hospedera (Dickens, 1986). Sin embargo, los volátiles de las plantas son los responsables del inicio de la agregación en el caso de *Anthonomus grandis* en algodón (Dickens, 1989). Para el caso de *Anthonomus eugenii* la

feromona de agregación ha mostrado no ser el único semioquímico responsable de la agregación de este picudo en cultivos de chile, ya que, en pruebas realizadas por Osorio (2006), se indicó que tanto machos y hembras de *A. eugenii* responden en mayor proporción a volátiles de la planta hospedera que a la feromona de agregación. Estos resultados fueron similares para *Metamasius spinolae* en donde los machos y hembras respondieron en mayor proporción a los volátiles del hospedero mezclados con la feromona de agregación (Tafoya et al. 2003; Cibrián-Tovar et al. 2006).

Los compuestos volátiles liberados por plantas de chile han sido reportados por (Osorio, 2006), en donde un total de 56 compuestos fueron encontrados en plantas de chile completas, yemas, flores y frutos en desarrollo. Sin embargo no se han realizado trabajos que traten de identificar cuales son los compuestos más importantes para desencadenar alguna respuesta de atracción de los picudos del chile. La función de los volátiles del hospedero juega un rol importante por lo que resulta útil la evaluación de los compuestos químicos semivolátiles en la localización del mismo. Por lo que los objetivos planteados fueron: Validar el método de recolecta de volátiles, evaluar la actividad y elección de adultos en pruebas de comportamiento, identificar volátiles más abundantes en estructuras de chile, evaluar el efecto electrofisiológico de compuestos puros a diferentes dosis y finalmente se realizaron mediciones para conocer la morfometría del rostrum, antenas y la tipología de las sensilla.

HIPÓTESIS

Los machos y hembras de *Anthonomus eugenii* identifican un sitio o una fuente para alimentación y oviposición con base en una serie de estímulos que recibe de su hospedante. Esta serie de estímulos dependen del estado fisiológico del hospedante. Esta interacción entre *Capsicum annum* y *Anthonomus eugenii* es mediada por compuestos volátiles que la planta libera al ambiente, los cuales evocan una respuesta de atracción en *A. eugenii*.

LITERATURA CITADA

- Alpizar, D., M. Fallas, A. C. Oehlschlager, L. M. González, C. M. Chinchilla, and J. Bulgarelli. 2002.** Pheromone mass trapping of the West Indian sugarcane weevil and the American palm weevil (Coleoptera: Curculionidae) in palmito palm Fla Entomol. 85: 426-430.
- Aserca (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria). 1998.** El chile verde y su trascendencia cultural. <http://www.aserca.gob.mx/sicsa/claridades/revistas/056/ca056.pdf>. Consultado el 2008-06-18.
- Angioy AM, Desogus A, Barbarossa IT, Anderson P & B. S. Hansson. 2003.** Extreme sensitivity in an olfactory system. Chem Senses 28: 279–284.
- Arcos, G., J. Hernández, D. E. Uriza, O. Pozo, y A. Olivera. 1998.** Tecnología para producir chile jalapeño en la planicie costera del Golfo de México. INIFAP-PRODUCE.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).** México. Folleto Técnico No. 24. 206 p.
- Bartelt, R. J. 1999.** Weevils, pp. 91-112. In J. Hardie and A. K. Minks (eds.), Pheromones of non-lepidopteran insects associated with agricultural plants. CAB International, London.

- Bengtsson, M., G. Jaastad., G. Knudsen., S. Kobro., A.C. Bäckman. 2006.** Plant volatiles mediate attraction to host and non-host plant in apple fruit moth, *Argyresthia conjugella*. Entomol Exp Appl. 118: 77–85.
- Bentley, M.D., J. F. Day. 1989.** Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. Annu Rev Entomol. 34:401-421.
- Bernays, E. A., and R. F. Chapman. 1994.** Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York. 312 p.
- Birch, L. C. 1948.** The intrinsic rate of natural increase of an insect population. J Anim Ecol. 17:15-26.
- Burke, H. R., and R. E. Woodruff. 1980.** The pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) in Florida (Coleoptera: Curculionidae). Fla Dept Agr Consumer Serv Entomol Cir. 219. 4p.
- Calyecac-Cortero, H.G., Cibrián-Tovar, J., Soto-Hernández, M., R. García-Velazco. 2007.** Aislamiento e identificación de volátiles de *Physalis philadelphica* LAM. Agrociencia 41: 337-346.
- Cibrián-Tovar J., J.L. Carrillo-Sánchez., M. Márquez-Santos. 2006.** Evidencia de feromonas producidas por hembras del Nopal, *Metamasius spinolae* (GYLLENHAL) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). Agrociencia. 40: 765-772.
- Cook, S. M., Z. R. Khan., & J. A. Pickett. 2007.** The use of push-pull strategies in Integrated Pest Management. Annu Rev Entomol. 52: 375–400.
- Dickens, J. C. 1986.** Orientation of boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) to pheromone and volatile host compound in the laboratory. J Chem Ecol. 12: 91-98.
- Dickens, J. C. 1989.** Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. Entomol Exp Appl. 52: 191–203.
- Dickerson, W. A., R. L. Ridgeway, and F. R. Planner. 1987.** Southeastern boll weevil eradication program, improved pheromone trap, and program status, pp. 335-337. In Proceedings, Beltwide Cotton Research and Production Conference, 24-27 June 1987, Dallas, TX. National Cotton Council, Memphis, TN.
- Cano y D. Alcacio. 1894.** El barrenillo. La Naturaleza. 2: 377-379.

- Elmore, J. C., A. C. Davis, and R. F. Campbell. 1934.** The pepper weevil. U.S. Dept. Agr Tech Bull. 447. 27 p.
- Hern, A., & S. Dorn. 1999.** Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to α -farnesene. Entomol Exp Appl. 92: 63-72.
- Hern, A., & S. Dorn. 2004.** A female-specific attractant for the codling moth, *Cydia pomonella*, from apple fruit volatiles. Naturwissenschaften 91: 77–80.
- Howse, P. E., I. D. R. Stevens., & O. T. Jones. 1998.** Insect pheromones and their use in pest management. London: Chapman and Hall.
- Light, D.M., & A. Knight. 2005.** Specificity of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) for the host plant kairomone, ethyl (2*E*,4*Z*) *E* and *Z* decadienoate: field bioassays with pome fruit volatiles, analogue, and isomeric compounds. J Agri Food Chem. 53: 4046–4053.
- Light, D. M., A. L. Knight., C. A. Henrick., D. Rajapaska., B. Lingren. 2001.** A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). Naturwissenschaften 88: 333–338.
- Mclver, S. B. 1978.** Structure of sensilla trichodea of female *Aedes aegypti* with comments on innervation of antennal sensilla. J Insect Physiol. 24:383-390.
- Mclver, S. B. 1980.** Sensory aspect of mate-finding behavior in male mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 17:4-57.
- Natale, D., L. Mattiacci., A. Hern., E. Pasqualini., & S. Dorn. 2003.** Response of female *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to plant derived volatiles. Bull Entomol Research 93: 335–342.
- Oerke, E.-C. 2005.** Crop losses to pests. J Agri Sci. 1- 13.
- Osorio, C. J. 2006.** Comportamiento y respuesta hacia atrayentes de adultos del picudo de Chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México p. 57.
- Pimentel, D., L. McLaughlin., A. Zepp., B. Lakitan., T. Kraus., P. Kleinman., F. Vancini., W. J. Roach., E. Graap., W. S. Keeton., G. Selig. 1991.** Environmental and economic effects of reducing pesticide use. BioScience, 41: 402-409.

- Piñero, J. C., S. E. Wright, and R. J. Prokopy. 2001.** Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odorbaited traps near woods. *J Econ Entomol.* 94: 1386-1397.
- Plepys, D., F. Ibarra., & C. Löfstedt. 2002.** Volatiles from flowers of *Platanthera bifolia* (Orchidaceae) attractive to the silver Y moth, *Autographa gamma* (Lepidoptera: Noctuidae). *Oikos* 99: 69–74.
- Ramirez-Lucas, P., D. Rochat, and P. Zagatti. 1996.** Field trapping of *Metamasius hemipterus* with synthetic aggregation pheromone. *Entomol Exp Appl.* 80: 453-460.
- Riley, D. G., and E. G. King. 1994.** Biology and management of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): a review. *Trends Agri Sci.* 2: 109-121.
- Riley, D. G., and A. N. Sparks, Jr. 1995.** The pepper weevil and its management. Texas Agri Ext Serv. Texas A&M Univ. L-5069.
- Rochat, D., A. V. González, D. Mariau, A. G. Villanueva, and P. Zagatti. 1991.** Evidence for male-produced aggregation pheromone in American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J Chem Ecol.* 17: 1221-1230.
- Rodríguez-Leyva, E., P. A. Stansly., D. J. Shuster., and E. Bravo-Mosqueda. 2007.** Diversity and distribution of parasitoids of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) from Mexico and prospects for biological control. *Fla Entomol.* 90: 693-702.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2010.** Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo. Disponible en línea en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. Consultado el 12 de octubre del 2011.
- Smith, P. M. 1976.** The Chemotaxonomy of Plants. Elsevier, New York. 313 p.
- Sweetmore, A., G. Rothschild., S. Eden-Green (eds.). 2001.** Perspectives on pests: Achievements of research under the UK Department for International Development's Crop Protection Programme, 1996-2000. National Resource International Limited, UK, 125 p.
- Tafoya, F., J. López-Collado, D. Stanley, J. C. Rojas, and J. Cibrián-Tovar. 2003.** Evidence of an aggregation pheromone in males of the Cactus Weevil *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol.* 32: 484-487.

Tasin, M. A. C. Bäckman., M. Bengtsson., C. Ioriatti., & P. Witzgall. 2006. Essential host plant cues in the grapevine moth. *Naturwissenschaften* 93: 141–144.

Thaler, J. S., M. A. Farag, P. W. Paré and M. Dicke. 2002. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defense against herbivores. *Ecol Letters*. 5: 764-774.

Wyatt, T. D. 2003. Pheromones and animal Behavior. Cambridge University Press. 408 p.

CAPÍTULO 1
VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE AIREACIÓN DINÁMICA PARA LA CAPTURA
DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE *Capsicum* spp.

ABSTRACT

The dynamic method was validated to collect *Capsicum* spp. volatiles, and their analysis by gas chromatography with mass selective detector. The validation tests were conducted with seven previously described compounds in *Capsicum* volatiles. These compounds exhibited good selectivity and linearity remained range 2-120 mg mL⁻¹ with correlation coefficients greater than 0.99 for each evaluated compound. The relative standard deviation of factor responses was less than 2%. The validation results showed that the method is efficient of extracting volatile compounds with recoveries between 87-98% without these different 100% supplemented with R.S.D. less than 10% which is indicative of good accuracy. The uncertainty associated with each measurement ranged from 1.17-1.36 µg, being the lowest for the 3-hexanone and the highest for the 1-bromohexane.

Key words: Pepper volatiles, validation, dynamic aeration, *Anthonomus eugenii*.

RESUMEN

Se validó el método de aireación dinámica para la captura de volátiles de *Capsicum* spp, y su análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas. Las pruebas de validación se realizaron con siete compuestos previamente descritos como volátiles de *Capsicum*. Estos exhibieron buena selectividad y la linealidad se mantuvo en el rango de 2-120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, con coeficientes de correlación mayores de 0.99 para cada compuesto evaluado. La desviación estándar relativa de los factores de respuesta fue menor de 2%. Los resultados de la validación muestran que el método es capaz de extraer compuestos volátiles con recuperación de 87-98% sin ser estos diferentes del total adicionado y con desviación estándar relativa (DER) menores de 10%, lo cual indica una buena exactitud. La incertidumbre asociada a cada medición estuvo en un rango de 1.17-1.36 μg : la más baja fue la de la 3-hexanona y la más alta la del 1-bromohexano.

Palabras clave: Volátiles de chile, validación, aireación dinámica, *Anthonomus eugenii*.

1.1 INTRODUCCIÓN

La validación de métodos es una de las medidas universalmente reconocidas como necesarias dentro de un sistema de aseguramiento de la calidad (Thompson et al. 2002). Por esta razón, los métodos analíticos deben validarse para demostrar que son adecuados para determinar analitos, en forma cuantitativa o cualitativa, en matrices de interés (Soboleva, 2004).

Los analitos de interés se pueden encontrar en cantidades pequeñas y en mezcla con una gran cantidad de materia orgánica que puede causar interferencias, motivo por el cual el proceso de análisis del compuesto de interés requiere de un estricto control de calidad (Segura, 1999). Para el aseguramiento del control de calidad se incluyen algunos índices como precisión, exactitud, linealidad, selectividad, repetibilidad y reproducibilidad (US EPA, 1996; Coy, 1999; Lehotay y Mastovska, 2005). El método de aireación dinámica (AD) o “dynamic headspace” se emplea, generalmente, en la extracción o captura de compuestos volátiles o semi-volátiles que las plantas liberan. Este sistema permite recolectar los compuestos liberados por la planta entera o por algunas estructuras, como yemas, flores o frutos (Smith, 1976; Nojima et al. 2003; Calyecac-Cortero et al. 2007). El uso de este método también ha permitido la captura de feromonas sexuales, de agregación u oviposición en insectos (Heath et al. 2006). En muchos trabajos se demostró que los compuestos liberados por plantas intervienen en la

interacción insecto-planta, funcionando como señales químicas que guían a los insectos fitófagos hacia éstas (Bernays y Chapman, 1994; Angioy et al. 2006).

Capsicum annuum L. (Solanaceae) libera cientos de compuestos en los diferentes estados fisiológicos pero, en especial, el aroma de sus frutos se considera un importante índice de calidad (Cremer y Eichner, 2000). En 2006, Osorio determinó la presencia de 56 compuestos volátiles en estructuras reproductivas, como yemas, flores y frutos en desarrollo, de plantas de Chile (*C. annuum*) por AD y estableció la hipótesis de que algunos de estos volátiles median la interacción entre la planta y su principal insecto plaga, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Sin embargo, se carece de métodos validados para determinar la concentración de estos compuestos volátiles, así como evaluar la eficiencia del método en la captura de estos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue validar el método de aireación dinámica, con algunos de los estándares identificados por Osorio (2006), para la determinación cuantitativa de los volátiles emitidos por estructuras de plantas de *Capsicum* spp.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Estándares.

Se usaron los siguientes estándares, 3-hexanona, 1-bromo hexano, 2-etil hexanol (Fluka), 6-metil-2-hepten-4-ol, p-xileno y R-D-Limoneno (Sigma-Aldrich®, Toluca, estado de México). Los estándares se diluyeron en hexano, grado HPLC (Fermont®), para preparar las disoluciones, para lo cual se consideró la pureza y la densidad de cada estándar. La pureza de cada estándar se determinó por cromatografía de gases y en todos fue mayor de 95%. En la preparación de disoluciones se usó material calibrado y certificado, incluyendo frascos volumétricos de 1 mL clase A (Kimble Glass INC) y jeringas microlíticas (Hamilton®, Reno, Nevada, USA). Por último, las disoluciones de cada estándar se aforaron a 1 mL, con hexano HPLC.

1.2.2. Aireación dinámica (AD).

El método consistió en cuatro reactores de vidrio con cuello esmerilado 29/42 de 21 cm de alto, 6 cm de diámetro interno y 500 mL de capacidad. Cada frasco contó con un tapón esmerilado (29/42), provisto de dos tubos de cristal a los cuales se les adaptó una manguera de Nalgene Premium (3/16" ID), libre de volátiles. La primera manguera se conectó a un tanque de aire comprimido extra seco, donde se colocó una pipeta Pasteur empacada con 0.2 mg de adsorbente (Tenax®, Bellefonte, PA, USA), de malla 60/80, que actuó como trampa para

limpiar el aire que entró al sistema. La segunda manguera funcionó como salida de aire en donde se insertó otra pipeta Pasteur con Tenax® TA 60/80, que permitió la captura de los volátiles. El Tenax, junto con el carbón activado y la Silica gel, son los adsorbentes más utilizados en este tipo de metodologías, ya que atrapan una gran cantidad de compuestos volátiles (Lodge, 1996; Keith, 1996).

1.2.3. Captura de volátiles.

La captura de volátiles se realizó durante 6 h y consistió en colocar 500 µL con una concentración de 50 µg mL⁻¹ de la mezcla de todos los estándares mencionados anteriormente, sobre un papel filtro circular No.1, de 70 mm de diámetro (Advantec, Japan). Inmediatamente, se introdujo el papel filtro dentro de cada frasco y éste se cerró. Se hizo pasar un flujo de aire de 200 mL min⁻¹, con la ayuda de un flujómetro (Gilmont®, Barrington, IL, USA), modelo GF-8341-1201. Los volátiles capturados en cada cartucho de Tenax se eluyeron con 3 mL de hexano, grado HPLC, en dirección al flujo de aire. Luego se redujo el volumen con un flujo suave de nitrógeno, a un volumen final de 1 mL, el cual se colocó en viales color ámbar de 2 mL y se sellaron debidamente. Las muestras se almacenaron a 5 °C, hasta su análisis, que no fue mayor a 15 días. Se realizó un total de 12 repeticiones en tres fechas diferentes.

1.2.4. Análisis cromatográfico.

Las muestras obtenidas por AD se analizaron con un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un detector selectivo de masas (CG/MSD 6890/5973; Agilent, Palo Alto, CA, USA). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: la inyección manual, de 1 μL de muestra en modo Splittles; la temperatura del puerto de inyección se mantuvo en 250 $^{\circ}\text{C}$, y la temperatura del horno inició en 40 $^{\circ}\text{C}$ y se incrementó 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, hasta llegar a 250 $^{\circ}\text{C}$. Se usó una columna capilar HP-5ms (Agilent; Santa Clara, CA, USA), recubierta con una fase de fenil metil siloxano, de 0.250 μm de espesor, 0.25 mm de diámetro interno y 30 m de longitud. Se utilizó helio como gas acarreador, con un flujo en la columna de 1 mL min^{-1} . El tiempo de análisis fue de 20 min. El MSD se operó en modo scan, en un rango de 30-550 uma . La interfase se mantuvo a 280 $^{\circ}\text{C}$, el detector y cuadrupolo a 150 y 230 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. La adquisición de datos fue en modo impacto electrónico, a 70 eV. Los iones de cuantificación y confirmación generados para cada compuesto se compararon con los de la biblioteca NIST 2002, para corroborar la identidad de cada uno.

1.2.5. Calibración.

La calibración consistió en verificar que el CG/MDS cumpliera con los criterios internos de calibración especificados por el fabricante (Agilent Technology), al realizar la afinación con el estándar interno PFTBA (perfluorotributil amina). La calibración externa consistió en elaborar una curva de calibración con los

estándares de referencia, en un rango de 100, 80, 50, 20, 10, 5 y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En la preparación de la curva se consideró la pureza y la densidad de cada estándar.

1.2.6. Linealidad.

El estudio de linealidad consistió en la inyección de las concentraciones utilizadas para la curva de calibración por triplicado. La regresión lineal se obtuvo de la respuesta de cada compuesto *versus* la concentración. En la prueba de linealidad se usó un nivel de significancia de 5% de acuerdo con los criterios de aceptación usados por Méndez-Antolín *et al.* (2008) y US EPA (1996); los cuales son: coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.99 y desviación estándar relativa de los factores de respuesta (DER_{fr}) $\leq 5\%$. Los factores de respuesta se definieron como (y/x), en donde (x) es la concentración y (y) la respuesta a dicha concentración; la desviación estándar relativa de la pendiente (DER_b) $\leq 2\%$, con $\text{DER}_b (\%) = (\text{S.D.}_b/b) \times 100$, donde b es el promedio de las tres pendientes y SD_b es la desviación estándar.

1.2.7. Repetibilidad.

Se determinó la repetibilidad del método, con una serie de mediciones realizadas en un mismo día y mismas condiciones, utilizando como criterios de aceptación la desviación estándar relativa $\text{DER} \leq 15\%$ según los métodos de la Agencia de Protección al Ambiente (US EPA, 1996).

1.2.8. Reproducibilidad.

La reproducibilidad se evaluó usando el mismo criterio anterior, variando únicamente el día de análisis de 12 muestras diferentes.

1.2.9. Exactitud.

Ésta se evaluó a partir de muestras adicionadas a 50 µg/mL, con la mezcla de todos los estándares. Los resultados se registraron considerando los recobros a 100% y la desviación estándar. Se usó una prueba de t para muestras pareadas de dos colas, a 95%, para determinar si el recobro medio era diferente del 100% fortificado. La prueba de t se calculó usando la siguiente ecuación.

$$t_{exp} = |100 - \text{Rec}| \sqrt{n} / \text{DER} \quad (1)$$

El valor obtenido de t_{exp} se comparó contra el valor de t_{tab} , con 95 % de confianza y $n-1$ grados de libertad (Méndez-Antolín et al. 2008).

La incertidumbre se calculó como la desviación estándar de la media

$$\mu(\text{Rec}) = \text{SD} n^{1/2}. \quad (2)$$

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Selectividad.

Un método es selectivo si presenta la capacidad de determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencia de otros componentes de comportamiento similar (IUPAC, 2001; Lanças, 2004). Esta condición indica que el método utilizado en el presente trabajo es selectivo para los compuestos de interés, ya que no se observó la presencia de picos en la región de tiempos de retención de los compuestos analizados. En la Figura 2.1 se observa un cromatograma de la muestra analizada, en la cual se nota que no hubo interferencia en la determinación.

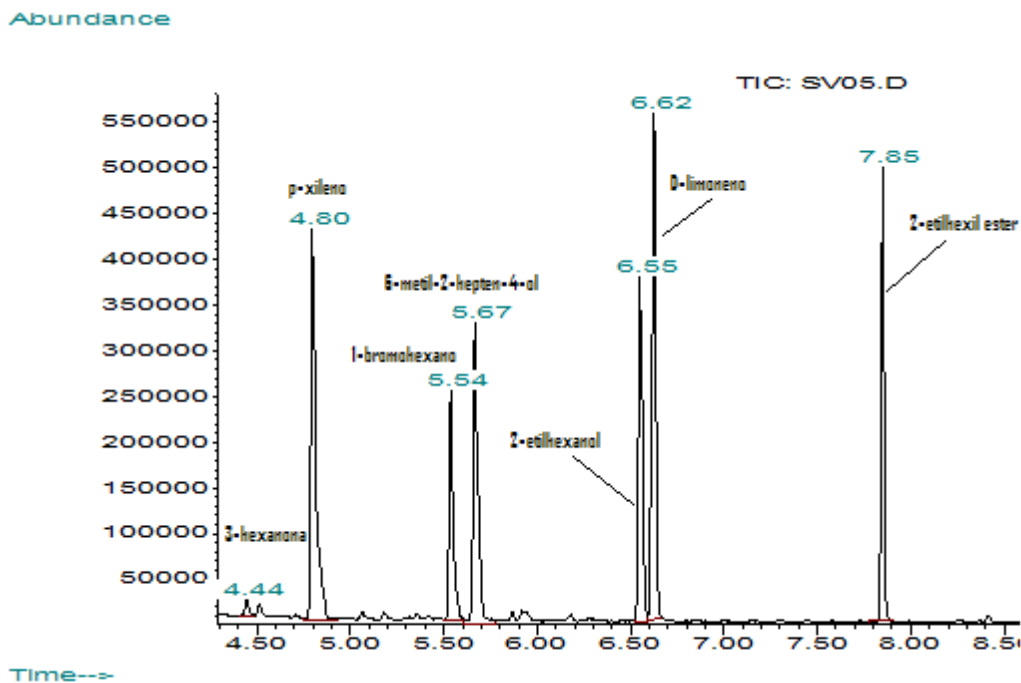


Fig. 2.1. Cromatograma obtenido del análisis de la mezcla de estándares con sus respectivos tiempos de retención por CG/MSD.

La cuantificación de un compuesto por CG/MSD se basa en la medición de iones derivados de una molécula en particular, separando los núcleos atómicos en función de su masa/carga (m/z) (Hoffman y Strooban, 1999), por lo que la abundancia relativa de los iones generados es crucial para una buena identificación y cuantificación. Los iones de cada estándar, incluyendo iones de cuantificación y de confirmación se presentan en el Cuadro1.1. Las abundancias relativas de cada ion se determinaron de acuerdo con los patrones generados por la biblioteca Nist v2002.

Cuadro1.1. Selección de iones para la cuantificación de cada estándar.

Estándar	Ion de cuantificación (m/z)‡	Iones de confirmación (m/z)‡
3-Hexanona	57	71, 100
p-xileno	91	106, 77, 65
1-bromohexano	135	55, 86
6-metil-2-hepten-4-ol	71	57, 95
2-etil hexanol	57	70, 85
D-limoneno	68	93, 67, 136
2-etil hexil ester	43	70, 57, 112

‡ = masa/carga generada para cada ion.

1.3.2. Estudio de linealidad.

Los resultados obtenidos de la calibración se presentan en el Cuadro 1.2; en éste se observa que los siete compuestos usados mantuvieron una respuesta lineal en rangos de 2-120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los coeficientes de correlación (r^2) fueron mayores de 0.99, cifra mínima significativa utilizada para fines de cuantificación (US EPA, 1996; Méndez-Antolín, 2008; Valente et al. 2008). La desviación estándar relativa de la pendiente obtenida para cada compuesto fue mayor de 2%; el valor más alto fue para la 3-hexanona (6.58), con lo cual no se cumple con los criterios usados por Méndez-Antolín et al (2008). Estos valores altos pueden ser causados por el modo de inyección de la muestra, ya que en este trabajo la inyección fue manual y en el caso de Méndez-Antolín se hizo con un sistema automatizado. Los métodos EPA son menos rigurosos en estos criterios, llegando a aceptar desviaciones de 15% con inyecciones en modo automático (US EPA, 1996). Otro factor que puede contribuir a tener una alta desviación es la presión de vapor (PV) de este compuesto, al respecto Olsen y Nielsen (2001) mencionan que compuestos orgánicos con $PV > 10 \text{ Pa}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, se clasifican como volátiles y PV menores de 10 Pa como semi-volátiles. Los factores de respuesta obtenidos para cada compuesto se encuentran dentro de los criterios de aceptación de 5% y muestran una alta correlación entre la concentración del estándar y la respuesta obtenida para cada uno. De acuerdo con estos resultados, el método fue capaz de obtener respuestas proporcionales lineales a concentraciones bajas de cada estándar evaluado.

Cuadro 1.2. Estudio de linealidad del método de AD por cromatografía de gases masas.

Compuesto	r^2	DER _b	DER _{fr}	PM (g g mol ⁻¹)	tr (min)	PV (mmHg)
3-Hexanona	0.99	6.58	2.61	100	6.69	13.9
p-Xileno	0.99	5.85	2.20	106	10.57	6.48
1-Bromohexano	0.99	3.97	2.79	164	13.54	> 10
6-metil-2-hepten-4-ol	0.99	5.16	2.27	132	6.71	0.19
2-Etil-1-hexanol	0.99	1.70	1.95	130	16.05	0.2
D-Limoneno	1.0	5.75	1.96	136	15.99	1.52
2-Etilhexyl,ester	0.99	0.25	2.01	172	18.5	0.4

r^2 = coeficiente de correlación.

DER_b = desviación estándar relativa de la pendiente.

DER_{fr} = desviación estándar relativa de los factores de respuesta.

PM = peso molecular.

Tr = tiempo de retención de cada estándar.

Tanto la sensibilidad, evaluada como el cambio en la respuesta analítica dividida por el correspondiente cambio en la concentración de la curva estándar (FAO, 1998) fueron diferentes para cada compuesto. El que presentó menor sensibilidad fue 1-bromo hexano, en contraste con el p-xileno que fue el que tuvo la mayor respuesta cromatográfica.

En el Cuadro 1.3. se observan las concentraciones de cada estándar en cada punto de la curva de calibración, así como sus respectivos promedios de respuesta cromatográfica. Se observó una relación lineal directa entre la respuesta analítica y el nivel de concentración, lo cual coincide con los criterios descritos por

la FAO (1998), en su manual para validación de métodos analíticos para control de alimentos. Los valores de la desviación estándar relativa (DER) de cada punto de la curva fueron menores de 15% para cada estándar evaluado. El cambio de respuesta observado entre los diferentes compuestos depende de las propiedades químicas de cada uno de estos y de su comportamiento dentro del MSD (Hoffman y Strooban, 1999).

Cuadro 1.3. Respuesta cromatográfica vs concentración de estándar.

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3-Hexanona		p-Xileno		1-Bromohexano		D-Limoneno	
	Promedio (m/z) ‡	DER† (%)	Promedio (m/z) ‡	DER† (%)	Promedio (m/z) ‡	DER† (%)	Promedio (m/z) ‡	DER† (%)
2	450 885.73	7.98	1 193 591	4.16	176 759	3.6	593 213	2.7
5	1 301 775.33	2.28	3 385 579	1.68	472 002	2.0	1 593 448	2.8
10	2 802 578.63	1.11	6 478 622	1.91	987 301	0.6	3 324 004	3.8
20	6 018 364.6	4.04	13 285 157	2.75	2 122 834	2.3	6 853 777	2.7
50	17 613 686.9	2.86	43 956 800	1.95	6 489 632	3.4	18 869 162	0.5
80	23 955 473.6	5.11	60 767 208	4.27	9 117 149	4.9	24 681 696	3.4
100	32 255 673.6	4.81	79 646 726	6.32	12 917 674	7.6	30 083 575	3.8

† = desviación estándar relativa, ‡ = maza/carga para cada compuesto generado por el impacto electrónico a 70 eV.

Cuadro 1.3. Respuesta cromatográfica vs concentración de estándar (continuación).

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6-Metil-2-hepten-4-ol		2-Etil-1-hexanol		2-Etilhexil acetato	
	Promedio	DER†	Promedio	DER†	Promedio	DER†
	(m/z)‡	(%)	(m/z)‡	(%)	(m/z)‡	(%)
2	1 051 658	3.3	764 429	1.9	682 898	2.1
5	2 846 393	6.0	2 227 932	4.5	1 911 608	3.5
10	6 225 641	1.2	4 224 329	3.3	3 535 831	1.6
20	13 139 599	2.9	8 526 848	2.4	6 826 660	2.7
50	39 754 594	2.6	26 144 578	0.6	13 786 550	3.9
80	51 581 329	5.4	34 889 768	3.5	23 953 055	3.3
100	71 598 900	7.5	41 350 674	4.6	27 918 103	5.4

†: Desviación estándar relativa, ‡: maza/carga para cada compuesto generado por el impacto electrónico a 70 eV.

En el Cuadro 1.4 se presenta la exactitud del método evaluado a un nivel de adición de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los estándares, el que se comparó con el 100% de recobro y con los valores de t de student. Los recobros fluctuaron entre 86.21 a 99.99%, el valor más bajo fue 2-etil-1-hexanol y el más alto la 3-hexanona. De acuerdo con Hill (2000), los promedios de recuperación deben estar en el rango de 70 a 110% y la DER debe ser $\leq 20\%$. El porcentaje de recuperación puede variar, dependiendo del número de pasos usados en la extracción y el análisis. En métodos que incluyen pasos como extracción, aislamiento, purificación y concentración, los recobros suelen ser bajos (FAO, 1998). El porcentaje de recobro en este trabajo para los siete estándares no fue diferente de 100% fortificado, cuando se compararon los valores de t_{exp} obtenidos contra los valores de t_{tab} ($gI = 2.2$, $n = 12$, $\alpha = 0.05$). La incertidumbre asociada a cada medición se mantuvo en un rango de 1.17 a $1.35 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Cuadro 1.4. Exactitud del método para los estándares evaluados por AD.

Compuesto	Adición $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recobro (%)	Promedio $\mu\text{g mL}^{-1}$	DER† (%)	$t_{\text{exp}}\ddagger$	Incertidumbre (μg)
3-Hexanona	48.0	99.9	44.15	9.21	0.25	1.17
p-Xileno	50.0	88.48	44.24	9.91	0.34	1.27
1-Bromohexano	46.0	91.50	42.09	11.35	0.22	1.36
6-metil-2-hepten-4-ol	47.3	92.51	43.76	0.10	0.21	1.28
2-Etil-1-hexanol	50.0	86.27	43.13	10.75	0.37	1.34
D-Limoneno	48.5	92.81	45.01	10.37	0.20	1.35
2-Etilhexyl,ester	49.0	91.32	44.75	10.47	0.24	1.35

†: Desviación estándar relativa, ‡= t experimental obtenida, T tablas =2.2 con $n=12$, $\alpha=0.05$.

1.4 CONCLUSIONES

Es posible coleccionar volátiles de *Capsicum* spp., por el método de aireación dinámica. Este método demostró ser confiable en cada criterio analítico evaluado y con compuestos con PV mayores a 10 mmHg.

El procedimiento y sistemas usados en este estudio permitieron capturar los volátiles en un tiempo estimado de seis horas.

Los promedios de recuperación obtenidos para cada estándar no son diferentes de los que se colocan inicialmente, lo cual da la confianza de que el método tiene buena precisión y exactitud y puede recomendarse para la colecta de volátiles en otras matrices de interés.

1.5 LITERATURA CITADA

- Angioy, A. M., A. Desogus., I. T. Barbarossa., P. Anderson., B. S. Hansson. 2003.** Extreme sensitivity in an olfactory system. *Chem Senses*. 28: 279-284.
- Bernays, E. A., R. F. Chapman. 1994.** Host-Plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, NY, USA pp 312.
- Calyecac-Cortero, H.G., J. Cibrián-Tovar., M. Soto-Hernández., R. García-Velazco. 2007.** Aislamiento e identificación de volátiles de *Physalis philadelphica* LAM. *Agrociencia*. 41: 337-346.
- Coy, G. A. 1999.** Estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Bogotá. Col.
- Cremer, D.R., K. Eichner. 2000.** Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *J Agr Food Chem*. 48: 2454–2460.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1998.** Validation of analytical methods for Food Control. A report of a joint FAO/IAEA Expert Consultation 2-4 December 1997. Vienne, Austria.
- Heath, R. R., P. E. A.Teal., N.D. Epsky., B. D. Dueben., S. D. High., S. Bloem., J. E. Carpenter., T.J. Weissling., P. E Kendra., J. Cibrián-Tovar., K. A. Bloem. 2006.** Pheromone-based attractant for male of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environ Entomol*. 35 (6) : 1469-1476.
- Hill, A. 2000.** Quality control procedures for pesticide residues analysis-guidelines for residues monitoring in the European Union. 2nd Edition. European Commission, Athens, Greece pp. 30.
- Hoffman, E., V. Strooban. 1999.** Mass spectroscopy: principles and applications. 2nd Edition. John Wiley & Sons, LTD., ENG pp.1-8.
- IUPAC. 2001.** Selectivity in Analytical Chemistry. *Pure Appl Chem*. 73 : 1381-1386.
- Keith, L. H. 1996.** Principles of environmental sampling: ACS Professional reference book. 2nd Edition. American Chemical Society, Washington, DC, USA pp. 412-418.
- Lanças, F. M. 2004.** Validação de métodos cromatográficos de análise – Métodos cromatográficos de análise. 6nd Edition. Rima Press, São Paulo p. 62.

- Lehotay, S. J., K. Mastovska. 2005.** Determination of pesticide residues. In Methods of analysis of food components and additives. Ötles, S. (Edition), Taylor & Francis. Boca Raton, FL, USA pp. 329-359.
- Lodge, J. 1996.** Methods of air sampling and analysis. 3rd Edition. Lewis Publishers, Inc. USA pp. 40-42.
- Méndez-Antolín E., Y. Balcinde-Quiñonez., V. Gonzalez-Canavaciolo., E. Rodríguez-Cruz. 2008.** Validation of analytical method for quality control of residual solvents (n-hexane and acetone) in D-002: New active ingredient from beeswax. J Pharmaceut Biomed. 47 : 646-650.
- Nojima, S., Jr. C. Linn., W. Roelofs. 2003.** Identification of host fruit volatiles from flowering dogwood (*Cornus florida*) attractive to dogwood-origin *Rhagoletis pomonella* flies. J Chem Ecol. 29(10) : 2347-2357.
- Olsen, E., F. Nielsen. 2001.** Predicting vapor pressure of organic compounds from their chemical structure for classification according to the VOC-Directive and risk assessment in general. Molecules. 6 : 370-378.
- Osorio, C. J. 2006.** Comportamiento y respuesta hacia atrayentes de adultos del picudo de chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México p. 57.
- Segura, M. A. 1999.** Técnicas para determinar residuos de plaguicidas. In Anaya, R. S., Romero, J. N. (eds). Hortalizas: Plagas y enfermedades. Trillas. México, D.F pp. 376-392.
- Smith, P. 1976.** The Chemotaxonomy of plants. Elsevier, NY, USA p. 313.
- Soboleva, E., K. Ahad., A. Ambrus. 2004.** Applicability of some mass spectrometric criteria for confirmation of pesticide residues. The analyst. 129: 1123-9.
- Thompson, M., S. L. Ellison., R. Wood. 2002.** Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem. 74: 835-855.
- US EPA. 1996.** Method 8000B, Determinative chromatographic separations. Resource recovery and conservation act (RCRA), US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA p. 46.
- Valente, L. A., R. R. Almeida., J. M. Rodrigues., V. S. Cunha., M. H. Campino., J. D. Figueroa. 2008.** Development and validation of analytical methodology for the determination of volatile organic compounds for production and certification of reference material. Centro Nacional de Metrología, Querétaro pp. 1058-1-5.

CAPÍTULO 2
**RESPUESTA OLFATORIA DE *Anthonomus eugenii* (COLEOPTERA :
CURCULIONIDAE) A VOLÁTILES DE *Capsicum annuum***

ABSTRACT

The pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano, is the most devastating pest of *Capsicum* spp. in Mexico and tropical and subtropical America. It detects and shows a response to flowers, floral buds and immature fruits volatiles released from Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.). Therefore, using olfactometers, flower and floral buds, we investigated the behavioral and electrophysiological responses of the pepper weevil to those volatiles of Jalapeño pepper. Volatile compounds of pepper plants as well as the immature fruits were obtained through Headspace and analyzed by gas chromatography-mass detection spectrometry (GC/MSD). Males demonstrated a higher response rate (71.4%) than females (50.7%). The most representative compounds in the pepper reproductive structures were Cis- β -ocimene, methyl salicylate, ethyl salicylate, (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene, α -pinene, linalool and guayacol. The electrophysiological responses of males and females to those volatiles from flowers were 0.67 mV and 0.51mV, respectively. Male insects revealed a higher stimuli to linalool, (E)- β -ocimene, geránico acid and tetramethyl pyrazine.

Key works: Pepper Weevil, Electrophysiology, *Capsicum*, Volatiles.

RESUMEN

El picudo del chile, *Anthonomus eugenii*, es la plaga más devastadora en cultivos de chile *Capsicum* spp. En México y otras partes del continente americano. Recientemente se ha demostrado que este insecto puede orientarse hacia los volátiles liberados por las yemas, flores y frutos de chile. Es por eso que en este trabajo se evaluó la respuesta conductual y electrofisiológica de hembras y machos del picudo del chile, a volátiles de chile jalapeño. Las pruebas realizadas en un olfatómetro de dos vías muestran una respuesta clara de la preferencia de *A. eugenii* sobre yemas florales, flores y frutos en desarrollo comparados con la feromona de agregación y ácido geránico. Los machos presentaron un 71.4% de respuesta comparado con un 50.7% de las hembras. Los compuestos volátiles obtenidos por aireación dinámica de la planta entera, yemas florales, frutos inmaduros, se analizaron por cromatografía de gases con detector selectivo de masas. Los compuestos más abundantes fueron β -Ocimene, salicilato de Metilo, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene, 2-ethyl hexanol, 2-hexanol, ácido acético y 2,3,4,5-tetrametil pirazina. La respuesta electrofisiológica de machos y hembras a los volátiles de flores fue de 0.67 y 0.51 mV, respectivamente. Los machos mostraron la respuesta más alta a linalool, (E)- b-ocimeno, ácido geránico y tetrametil pirazina.

Palabras clave: Picudo del chile, Electrofisiología, *Capsicum*, Volátiles.

2.1 INTRODUCCIÓN

El picudo de Chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), es considerado la plaga más importante en el cultivo de *Capsicum* spp., en los estados del suroeste de EE.UU., México, América central y algunas Islas del Caribe. (Elmore et al. 1934; Burke & Woodruff, 1980; Riley & King 1994; Arcos et al. 1998; Diaz et al. 2004). Este insecto utiliza plantas del género *Capsicum* y *Solanum*, ambas de la familia solanácea, pero sólo representa un problema como plaga en *Capsicum*. En México se cultivan cerca de 150 000 ha de este cultivo por año, que se distribuyen en todo el territorio nacional produciendo cerca de 2 millones de toneladas (SIAP, 2010), y *A. eugenii* es el principal problema fitosanitario en este cultivo (Arcos et al. 1998). Los adultos de *A. eugenii* se alimentan sobre yemas, frutos y algunas veces sobre hojas y tallos de la planta de Chile. Sin embargo el daño más evidente es causado por la larva la cual se alimenta directamente de la placenta de frutos en desarrollo causando su abscisión, y reducción en campo que puede ir de 30 a 90% si no se toman medidas de control (Elmore et al. 1934; Goof & Wilson, 1937; Velasco, 1969; Riley & Sparks, 1995).

Para el monitoreo y detección de adultos de *A. eugenii* se necesitaba realizar muestreos visuales sobre yemas terminales (Riley, 1992), con umbrales de acción de 5% de yemas dañadas o 0.01 picudos por planta. (Cartwright et al. 1990). Con la identificación y desarrollo de la feromona de agregación se han logrado tener detecciones tempranas de *A. eugenii* antes de que éstas sean reportadas en inspecciones visuales (Eller et al. 1994). Con las trampas de feromona de esta especie se ha facilitado realizar las labores de monitoreo (Conaproch, 2004). Sin embargo, se pueden presentar varias dificultades con la operación de las trampas, incluyendo bajas

tasas de captura durante el desarrollo del cultivo; las trampas sólo son eficientes antes de la fructificación y hacia el final de la cosecha. La habilidad del picudo del chile para sobrevivir en hospederas silvestres como tomatillo en Sinaloa (Corrales, 2002), *Solanum americanum* y *S. melongena* en el sureste de Estados Unidos (Patrock and Schuster 1987; Diaz et al. 2004), hacen difícil su manejo, ya que logran sobrevivir para reinfestar el cultivo en el siguiente ciclo.

Recientemente se ha generado información de los volátiles de *Capsicum annuum*, y de su papel en ciertas respuestas del picudo del chile. Adesso (2010), demostró que adultos del picudo del chile responden a volátiles liberados por plantas hospederas. Al parecer la respuesta del picudo del chile hacia volátiles de su planta hospedera es similar a la observada con otros curculiónidos como *A. grandis* y *A. pomorum*, en donde extractos acuosos de bellotas junto a la feromona de agregación han mostrado mayores capturas en trampas que la feromona sola en *A. grandis* (Hardee et al. 1971). El objetivo de este trabajo fue, primero, determinar si los picudos del chile eran atraídos a frutos, yemas, flores y feromona de agregación. Después, de haber respuesta positiva caracterizar e identificar, por cromatografía de gases los compuestos volátiles emitidos por estas estructuras y, finalmente, evaluar la respuesta electrofisiológica de picudos adultos hacia algunos de esos compuestos.

Nuestra hipótesis es que las estructuras del chile como yemas, flores y frutos en desarrollo contienen compuestos volátiles que evocan respuesta de comportamiento y electrofisiológica, los cuales pueden ser usados como atrayentes del picudo del chile antes de la floración o al final del ciclo del cultivo.

En este estudio, determinamos primero si los adultos del picudo del chile *A. eugenii* son atraídos a frutos, yemas, flores y feromona de agregación. Segundo usamos cromatografía de gases con detector selectivo de masas (CG/MSD) para caracterizar e identificar los compuestos volátiles emitidos por estas estructuras. Finalmente evaluamos la respuesta electrofisiológica de adultos hacia compuestos identificados en este trabajo y algunos reportados en trabajos previos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Insectos.

Se estableció una colonia de *A. eugenii* con recolectas de chiles que presentaron signos de daño por este insecto. Los muestreos se realizaron en las localidades de Vista Hermosa, Michoacán; Cotaxtla, Veracruz; Axochiapan, Morelos; Huasave y Culiacán, Sinaloa, México. Estas recolectas se realizaron en diferentes cultivares como chile habanero, morrón, serrano, jalapeño y güero, del 28 de septiembre del 2008 al 14 de noviembre del 2009. La colonia de *A. eugenii* se estableció de acuerdo a los criterios descritos por Rodríguez-Leyva (2006). Los frutos se mantuvieron en un recipiente de plástico de 4 L provistos de orificios de 3 cm de diámetro para mantener la ventilación, los orificios se cubrieron con malla tipo organza. La cría se mantuvo continuamente con la adición de frutos de chile jalapeño y disolución de miel al 10%. El cuarto de cría se mantuvo a 25-28°C, con 60-70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 (L: O). Después de la emergencia, los adultos fueron separados por sexo de acuerdo a las claves de Eller, (1995), usando el mucron metatibial como caracter morfológico entre machos y hembras.

2.2.2. Recolección de volátiles.

Los volátiles liberados por yemas, flores, frutos en desarrollo y frutos comerciales de chile jalapeño cv Tampiqueño-74, fueron recolectados siguiendo el método descrito por Velázquez-González et al. (2011). Aproximadamente 50 gr de cada estructura se colocaron dentro del contenedor por cada replica. Los volátiles se purgaron con aire a un flujo de 200 mL/min por seis horas. Los compuestos adsorbidos en el Tenax se eluyeron con tres mL de Hexano (grado HPLC, J.T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ). El volumen de muestra obtenidos se redujo a 0.5 mL con un flujo suave de nitrógeno, las muestras se colocaron en viales ámbar de 2 mL y se almacenaron a - 5°C hasta el momento de realizar los bioensayos en el EAG y el análisis químico.

2.2.3. Respuesta de adultos de *A. eugenii* a yemas, flores y frutos.

En el primer experimento evaluamos la respuesta de ambos sexos de *A. eugenii* a frutos inmaduros, frutos maduros, yemas, flores y feromona comercial (PEW I y PEW II, Trece^R). Los bioensayos se realizaron en un olfatómetro de dos vías siguiendo el método descrito por Tafoya et al. (2003). El olfatómetro se conectó a una bomba de vacío la cual mantuvo un flujo de aire 1.7 L/min. La limpieza del aire se aseguró colocando cartuchos de carbón activado antes de que el flujo de aire llegara al olfatómetro. La limpieza del olfatómetro se realizó con lavados en secuencia de agua, alcohol, acetona y hexano. Después de la evaluación de cada prueba los tratamientos y el testigo fueron rotados para evitar la predisposición de los insectos de responder hacia un mismo lado. La iluminación se mantuvo con dos lámparas fluorescentes de 32 w. La temperatura del cuarto se mantuvo a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa en 32 %.

Los experimentos se realizaron de las 13:00-17:00 hr, de acuerdo al periodo de mayor actividad de hembras y machos reportado por Riley y Schuster (1994). En todas las pruebas se usaron adultos con más de 10 días de edad, según lo reportado por Adesso et al. (2010). Para cada combinación evaluada se liberaron 20 insectos por cada sexo con cuatro repeticiones cada una. En cada experimento se midió "la actividad" y "preferencia" (elección) de los picudos. La actividad se tomó como el número de picudos que mostraron movimientos en el olfatómetro (hacia el brazo derecho o izquierdo) comparado con picudos que no respondieron (no mostraron movimiento hacia ninguno de los dos brazos). La preferencia se estimó como el número de picudos activos eligiendo uno u otro brazo del olfatómetro. Los resultados son expresados como porcentaje de actividad y porcentaje de preferencia. Esto se determinó con la siguiente fórmula, con modificaciones menores de Hori (2007).

$$\% \text{ actividad} = \frac{(\text{no. de picudos liberados} - \text{no. picudos no responden})}{(\text{no. total de picudos liberados})} * 100$$
$$\% \text{ preferencia} = \frac{(\text{no. de picudos atraídos hacia la cámara} - \text{no. de picudos atraídos hacia el control/referencia})}{(\text{total no. de picudos liberados} - \text{no. de picudos que no responden})} * 100$$

2.2.4. Análisis químico.

Las muestras obtenidas por AD se analizaron con un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un detector selectivo de masas (CG/MSD 6890/5973; Agilent, Palo Alto, CA, USA). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: la inyección manual, de 1 µL

de muestra en modo Splittles; la temperatura del puerto de inyección se mantuvo en 250 °C, y la temperatura del horno inició en 40 °C y se incrementó 15 °C min⁻¹, hasta llegar a 250 °C. Se usó una columna capilar HP-5ms (Agilent; Santa Clara, CA, USA), recubierta con una fase de fenil metil siloxano, de 0.250 µm de espesor, 0.25 mm de diámetro interno y 30 m de longitud. Se utilizó helio como gas acarreador, con un flujo en la columna de 0.8 mL min⁻¹. El tiempo de análisis fue de 20 min. El MSD se operó en modo scan, en un rango de 30-550 uma. La interfase se mantuvo a 280 °C, el detector y cuadrupolo a 150 y 230 °C, respectivamente. La adquisición de datos fue en modo impacto electrónico, a 70 eV. Los tiempos de retención de cada pico, así como los iones de cuantificación y confirmación generados para cada compuesto, se compararon con estándares auténticos. Cuando no hubo estándares disponibles para hacer la comparación, el espectro de masas del compuesto fue comparado solamente con la base de datos de la biblioteca NIST (Versión 1.7 a 2000).

2.2.5. Químicos.

Los compuestos volátiles identificado por CG/MSD con mayor respuesta cromatográfica, se adquirieron de Sigma-Aldrich y Fluka (Toluca, México) todos con una pureza mayor a 95% según especificaciones de la compañía comercial, así mismo se adquirieron otros compuestos reportados previamente en volátiles de *Capsicum* como potenciales componentes de su aroma.

2.2.6. Electroantenografía (EAG).

Las preparaciones en el EAG se realizaron usando las antenas de adultos machos y hembras, en todos los experimento se uso una sola antena, la cual fue removida

cuidadosamente de la cabeza. Se uso un electrodo en forma de "Y" sobre el cual se colocó la antena. En un brazo se fijó la parte basal con gel conductor (Spectra 360® electrode gel, Parker, Orange, NJ), la parte distal de la antena fue cuidadosamente limada con una hoja de porcelana (Hewlett Packard 5181-7487) y colocada sobre el otro brazo del electrodo con gel. La señal generada por la antena se registró en una PC equipada con un software para analizar la señal (EAG 2000, Syntech 1200 BM Hilversum, The Netherlands). Una corriente continua de aire puro humificado (0.5 L/min) se mantuvo constantemente sobre la antena a través de un tubo de vidrio de 10 mm de diámetro, usando un controlador de flujo (CS-55, Syntech). El estímulo fue aplicado a intervalos de 1 minuto con un flujo de pulso de 75 mL/min. En una pipeta Pasteur conteniendo una pieza (1 x 0.5 cm) de papel filtro (Whatman No.1, Advantec, Japan), con el producto a ser evaluado se introdujo dentro del orificio del tubo de vidrio. Los compuestos fueron diluidos en cloruro de metileno grado HPLC (J.T. Baker) antes de la prueba. El disolvente se uso como control. Los compuestos se evaluaron a dosis de 0.5, 1, 5 y 10 µg. Cada antena de un insecto (macho o hembra) se consideró una replica de cada uno de los compuestos evaluados. En cada evaluación se rotó la secuencia de los estándares para compensar el aumento de la resistencia de la antena. La evaluación se realizó iniciando con las dosis bajas a las más altas para cada compuesto sintético. En total se desarrollaron 12 replicas se desarrollaron para cada sexo. De los valores obtenidos del EAG para cada compuesto, se sustrajo la respuesta al disolvente, para tener las respuestas absolutas.

2.2.7. Análisis estadístico.

La mayoría de los datos se analizaron con SAS v 9.1 (SAS Institute 1995). Los datos se analizaron para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, cuando fue necesario, se transformaron a $\sqrt{y+0.05}$. Para la respuesta conductual de adultos machos y hembras en el olfatómetro, se uso una prueba de krustal y Wallis (aproximación X^2). (Sokal & Rohlf 1995). Los datos obtenidos del EAG se analizaron por un método de análisis de varianza (ANOVA) con dos factores, (dosis de compuesto y sexo). De haber diferencias significativas se realizó una comparación múltiple de medias de Tukey.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Respuesta de adultos de *A. eugenii* a yemas, flores, frutos y feromona.

La respuesta conductual de adultos hembras y machos de *A. eugenii* en el olfatómetro se presentan en el Cuadro 2.1. Se observa que las fuentes de atracción ofrecidas a adultos machos y hembras de *A. eugenii* presentaron diferencias estadísticas en el comportamiento ($P=0.0097$, $\chi^2=21.75$, $gl=4$). Los machos mostraron un 74.73% de preferencia hacia flores y 74.82% de las hembras a yemas florales, seguida de flores. Las estructuras de la planta como yemas, flores y frutos en desarrollo presentaron mayor efecto en la atracción de adultos de *A. eugenii* que su feromona de agregación en combinación con ácido geránico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez-Leyva (2006), en donde las hembras de *A. eugenii* claramente eligieron yemas de chile jalapeño para alimentación y en segunda opción frutos para oviposición. Otro factor importante en la elección de yemas florales para la alimentación es el contenido de nitrógeno, el cual es mayor en yemas que en la placenta y semillas de frutos en desarrollo y frutos comerciales (Rodríguez-Leyva, 2006). Este comportamiento de alimentación ha sido claramente estudiado en condiciones de campo y demuestra que la calidad del fruto es un factor importante en la selección de sitios de oviposición y alimentación (Patrock & Schuster 1992). La preferencia de macho hacia flores es clara, aunque en condiciones de campo se ha documentado que los machos y hembras se pueden alimentar sobre yemas, flores y frutos, y en algunos casos de hojas de su planta hospedera o de hospederas alterna como *Solanum americanum* y *Solanum melongena* (Walker, 1905; Elmore et al. 1934;

Addesso et al. 2009). La preferencia por frutos comerciales fue menor a la observada por yemas, flores y frutos comerciales, esto debido a que fisiológicamente son de menor calidad (Walker 1905; Wilson 1986; Rodríguez-Leyva 2006). En pruebas de laboratorio se confirmó que cuando se le ofrecieron frutos maduros de color rojo como única opción para alimentarse y ovipositar, se obtuvieron insectos de menor talla y peso comparados con los obtenidos de frutos inmaduros (datos sin publicar). En pruebas de elección, los insectos que no responden al control o a la fuente en la mayoría de los casos se dejan fuera del análisis, nosotros consideramos que esta no respuesta era importante evaluarla. La actividad indica la homogeneidad fisiológica de la población como la edad y cópula. En *A. eugenii* se ha demostrado que adultos con más de 10 días de edad son más selectivos al momento de elegir sus fuentes de alimento y sitios de oviposición (Addesso et al. 2009). Para nuestro estudio el porcentaje de actividad de adultos dentro del olfatómetro no fue diferente cuando se evaluó la misma fuente, pero si difirió entre fuentes, ($P=0.001$, $F=7.13$, $gl=9$). Con la prueba de Tukey se observa que los machos son más activos cuando se les ofreció frutos inmaduros sin ser diferentes a la actividad mostrada con flores. Las hembras presentan mayor actividad a frutos inmaduros seguida por flores. La menor actividad se observó cuando se les ofreció feromona comercial más ácido geránico, siendo las hembras menos activas con 24%.

Cuadro 2.1. Preferencia y actividad de *Anthonomus eugenii* a diferentes estructuras de *Capsicum annuum* y feromona de agregación

Tratamiento	% de preferencia		% de actividad	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Control vs Fuente				
Aire vs feromona	-6.25c	-15.79c	40bc	24c
Feromona vs yemas Florales	63.64ab	74.82a	69ab	61ab
Feromona vs Frutos Comerciales	38.18ab	47.17ab	69ab	66ab
Feromona vs Frutos Inmaduros	42.86ab	50.72ab	86a	86a
Feromona vs Flores	74.73a	66.73a	79a	74ab

Promedios con letra iguales son estadísticamente diferentes cuando ambas columnas de cada prueba fueron comparadas. P=0.0001, α =0.05.

2.3.2. Análisis químico.

En frutos de *Capsicum*, se ha reportado los volátiles presentes en diferentes estados de maduración y con daño mecánico con fines de calidad, sin embargo en estructuras como flores y yemas aun no se ha reportado nada (In-Kyung et al. 2007; Pino et al. 2006). Existen a la fecha más de 300 compuestos volátiles reportados para frutos de *Capsicum*, de los cuales en su mayoría son esteroides, seguidos de cetonas y alcoholes (In-Kyung et al. 2007). El análisis por CG/MSD de los extractos volátiles de flores, frutos y yemas de *Capsicum* reveló la presencia de 18 compuestos. Dentro de estos destacan los homoterpenos como α -ionona, geranil acetato, 4-methyl-3-penten-2-one. Monoterpenos como linalool, limoneno, α -pineno, (E)- β -ocimene. Sesquiterpenos como (E)- β -Cariofileno, β -Cubeneno y α -bisabolol (Knudsen et al.1993). En las tres estructuras analizadas se encontró al salicilato de metilo (11), y el β -E-ocimene (8) como los compuestos más abundantes. En el cuadro 2.2, se presenta los compuestos identificados en flores, frutos, y yemas. La mayoría de los compuestos fueron confirmados con estándares auténticos y solo en algunos no fue posible, por lo que la identificación se realizó por comparación de los espectros de iones y su índice de

retención. Compuestos como el (IK=1116) (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene, (KI=801) 4-methyl-3-penten-2-one se identificaron tentativamente, el primero en cantidades abundantes en yemas florales. Todos los compuestos encontrados ya han sido previamente descrito en otros trabajos; para el caso del (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene en *Capsicum* solamente ha sido descrito por Adesso et al (2011), en colección de volátiles de toda la planta, para nuestro caso solo se detectó en yemas y no en flores ni frutos. En la literatura existen muchas razones por las cuales estos compuestos se producen en mayor cantidad, algunas de estas son la respuesta al daño mecánico, daño por organismos o factores climáticos. (Hare, 2011). En otros trabajos se ha documentado que compuestos como el salicilato de metilo, (E)- β -ocimeno, (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene y (E)-2-hexenal, actúan como señales de defensa cuando existe daño mecánico o por fitófagos (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Hare, 2011). En frutos se encontró la mayor cantidad de volátiles, seguida de flores y yemas.

Cuadro 2.2. Compuestos identificados por cromatografía de gases, acoplado a detector selectivo de masas, en extractos volátiles de *Capsicum annuum*.

Pico (no.)	Compuesto y tipo de identificación	IR	Fruto	Flores	Yemas
1	(E)-2-hexenal ^{a,b}	800	X		
2	4-methyl-3-penten-2-one ^{a,b}	801	X		
3	(Z)-3-hexenola	857	X		
4	α -pineno ^{a,b,c}	939	X	X	
5	3-hepten-2-ona ^{a,b}	943	X	x	x
6	D-limoneno ^{a,b,c}	1031	X	x	
7	(Z)- β -ocimene ^{a,b,c}	1037	X	x	
8	(E)- β -ocimene ^{a,b,c}	1050	X	x	x
9	Linalol ^{a,b,c}	1098	X	x	X
10	(3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene ^{a,b}	1116			X
11	Salicilato de metilo ^{a,b,c}	1190	X	x	X
12	Nonatriene ^{a,b}		X		
13	Geranil acetato ^{a,b,c}	1381	X	x	X
14	β -Cubeneno ^{a,b}	1390	X	X	
15	(E)- β -Cariofileno ^{a,b,c}	1420	X	x	X
16	(E)- α -ionona ^{a,b,c}	1426	X		
17	α -bisabolol ^{a,b}	1683	X		

^aIdentificación comparando espectro de masas y abundancia de masas isotópicas. ^bIdentificación basada en los índices de retención de Adams (1995). ^cIdentificación basada en la comparación de espectros con estándares auténticos.

2.3.3. Electroantenografía.

En el primer ensayo en el EAG se evaluó la respuesta de adultos machos y hembras a 17 compuestos de forma individual a una dosis de 5 ug. Los compuestos evaluados fueron los identificados en este trabajo y otros citados previamente por Osorio (2006); Pino et al. (2006); Fernández-Trujillo (2007). La respuesta antenal de A.

eugenii fue afectada por el producto sintético ($F=125.1$; $gI=16$ $P=001$). Los compuestos que no evocaron respuesta estadísticamente diferente al control (disolvente), no se siguieron evaluando para las siguientes dosis (Tukey HDS, $\alpha=0.05$). Los resultados de este primer scan se presentan en la figura 2.1. Los compuestos descartados fueron el (1) 1-bromohexano; (6) cariofileno; (8) α -pineno; (9) 2-etil-1-hexanol; y el (10) p-xileno. Los compuestos evaluados a dosis de 0.5, 1, 2 y 5 μg fueron (2) D-limoneno; (11) α -ionona; (12) 3-methoxi pirazina; (13) tetrametil pirazina; (14) salicilato de metilo; (15) linalool; (16) ácido geránico; y el (17) (E)- β -ocimeno. La respuesta más alta se observó para los volátiles de flores (7).

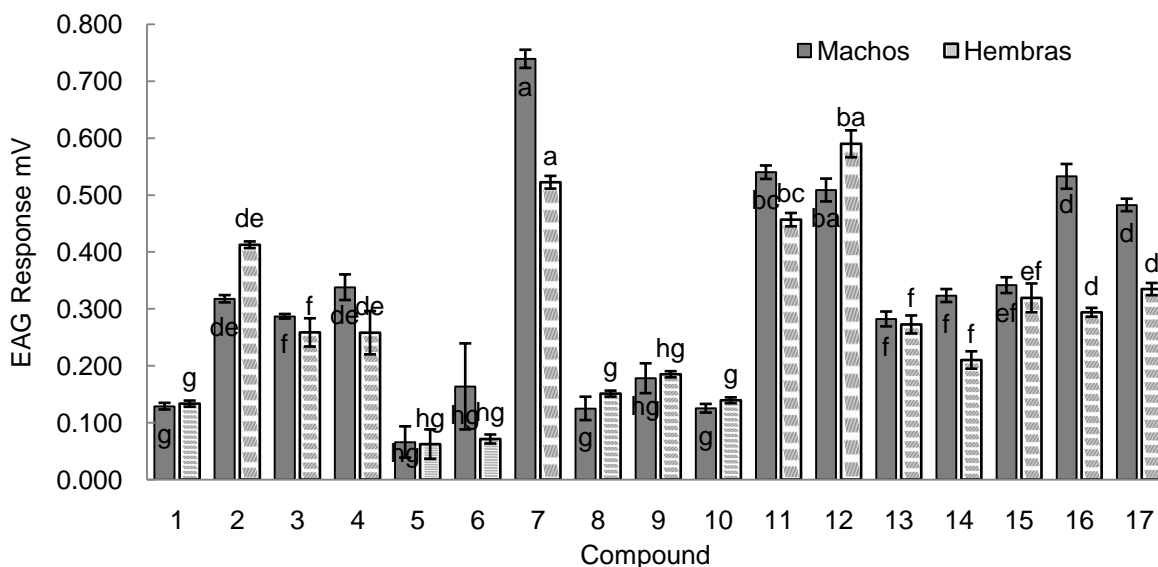


Fig. 2.1. Respuesta electrofisiológica promedio (\pm ee) de adultos machos y hembras de *Anthonomus eugenii* a 5 μg de compuestos volátiles de *Capsicum annuum*. Barras seguidas de letras diferentes, son estadísticamente diferentes, (Tukey $\alpha=0.05$; $gI=340$).

2.3.4. Dosis respuesta a compuestos sintéticos.

La respuesta antenal de *A. eugenii* se vio afectada por la dosis de cada producto sintético evaluado. En la Figura 2.2, se presenta la dosis-respuesta de machos y hembras a ocho compuestos volátiles a los cuales se obtuvieron respuesta significativa a 5 µg. En algunos casos como, el (E)-β-Ocimeno y Linalool la respuesta no fue muy clara a dosis de 1, 1.5 y 5 µg; no obstante la respuesta fue mayor a dosis baja para el primer compuesto. La respuesta del insecto a un compuesto volátil en particular puede ser influida. Un mismo compuesto se puede comportar como atrayente o repelente dependiendo de la dosis evaluada, casos similares han sido estudiados y reportados para otras especies de curculiónidos. (Dickens, 1986; Leskey et al. 2001). La respuesta electrofisiológica del picudo del chile, no fue mayor a 0.6 mV para los estándares solos. Para mezcla de volátiles de flores fue mayor a 0.7 mV. Este tipo de respuesta varía mucho dependiendo de la especie de insecto y del tipo de sensilla presentes en las antenas. Para el caso de *Phratora vulgatissima*, se obtuvieron respuestas medias de 0.2-0.4 mV para el (E/Z)-β-ocimeno, y mayores a 0.4 mV para el (Z)-3-hexenol (Fernandez et al. 2007). El (E/Z)- β-ocimeno es conocido por estar presente en plantas dañadas por insectos como en no dañadas (Paré & Tumlinson, 1999; Cardoza et al. 2002; Hern & Dorn, 2002). Algunos insectos han mostrado respuesta electrofisiológica al (E)- β-ocimene y también ha funcionado como atrayentes de enemigos naturales (Bichao et al. 2005).

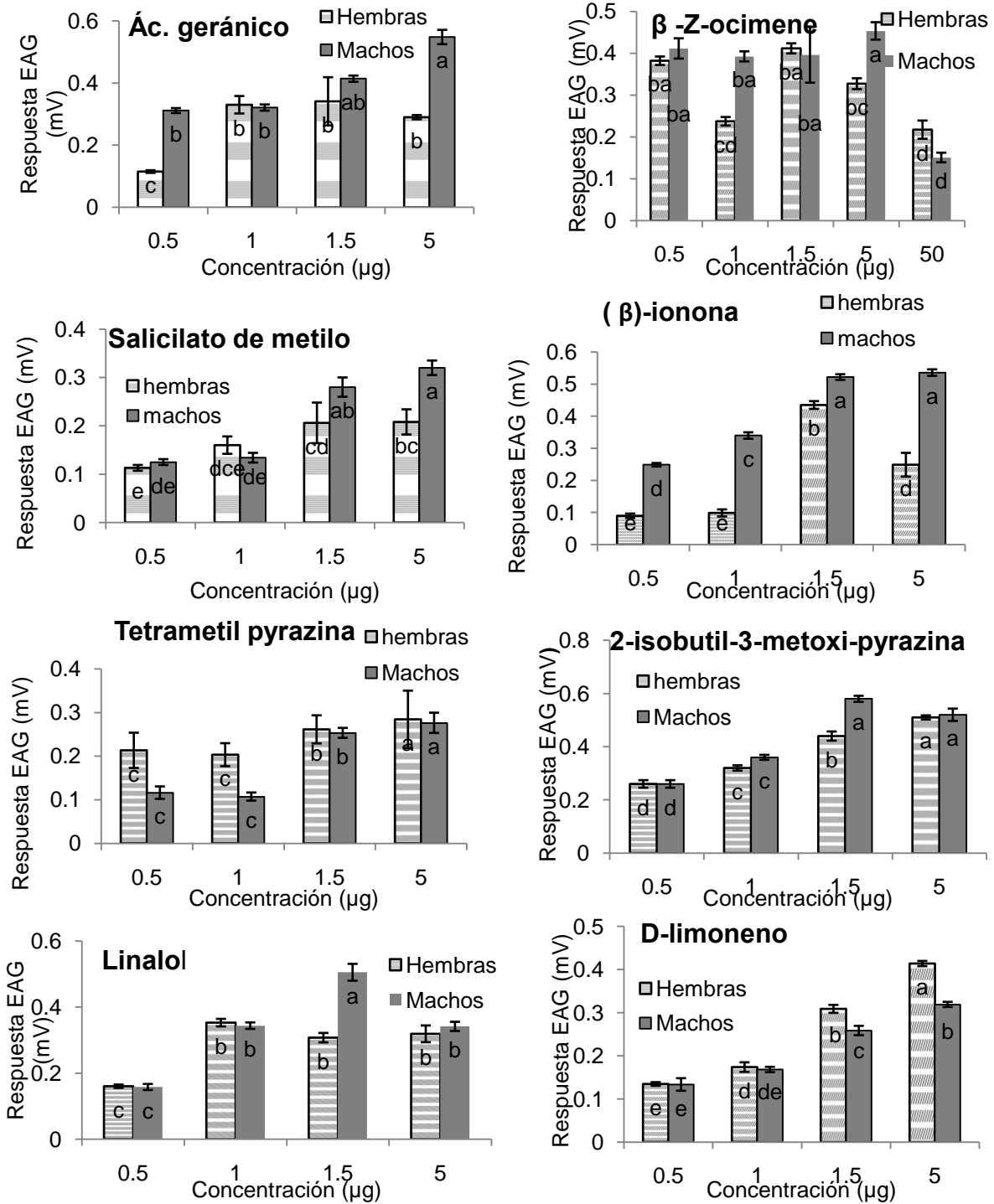


Fig. 2.2. Respuesta promedio de EAG (\pm EE) de adultos de *Anthonomus eugenii* a diferentes dosis de compuestos sintéticos. Barras con letras diferentes son estadísticamente significativas, (Tukey HSD, $P=0.05$)

En el Cuadro 2.3 se puede observar que la interacción sexo x dosis fue diferente en siete de los compuestos evaluados, es decir la respuesta de machos y hembras no siguió la misma tendencia en cada dosis evaluada. Para el caso de la tetrametil pirazina, la respuesta de machos y hembras siguió la misma tendencia en cada dosis.

Cuadro 2.3. Resultado de la prueba Anova de dos vías evaluando el efecto del sexo y dosis y la interacción dosis x sexo de la respuesta electrofisiológica de *Anthonomus eugenii* a volátiles de su planta hospedera.

Compuesto	Fuente de variación	gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P
ác. Geránico	Sexo	1	0.12046223	34.50	0.0001
	Dosis	3	0.05373527	15.39	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.02546811	7.29	0.0004
(E)- β -ocimeno	Sexo	1	0.01706001	7.14	0.0097
	Dosis	4	0.07230746	30.27	0.0001
	Dosis x sexo	4	0.01842544	7.71	0.0001
salicilato de metilo	Sexo	1	0.02367715	16.28	0.0002
	Dosis	3	0.05408710	37.20	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.01102253	7.58	0.0002
β -ionona	Sexo	1	0.38569229	1224.24	0.0001
	Dosis	3	0.22193484	704.45	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.01407614	4.68	0.0001
linalool	Sexo	1	0.03072348	19.89	0.0001
	Dosis	3	0.15056386	97.45	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.02645734	17.12	0.0001
2-isobutil-3-metoxi-pirazina	Sexo	1	0.01389548	17.11	0.0001
	Dosis	3	0.12899373	158.83	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.00666024	8.20	0.0001
tetrametil-pirazina	Sexo	1	0.00076252	1.44	0.2371
	Dosis	3	0.01636543	30.91	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.00729451	13.78	0.0001
D-limoneno	Sexo	1	0.01812375	28.46	0.0001
	Dosis	3	0.15944462	250.38	0.0001
	Dosis x sexo	3	0.00564578	8.87	0.0001

La respuesta electrofisiológica entre adultos machos y hembras de *A. eugenii* fue diferente, siendo los machos los que presentaron mayor respuesta (Figura 2.3. $F=17.02$, $gl=16$, $P=0.001$). Resultados similares fueron obtenidos por Dickens (1984) en *A. grandis* en donde los machos fueron mas sensibles a volátiles de plantas y las hembras más sensibles a la feromona de agregación. La mayor respuesta electrofisiológica de machos coincide también con la mayor respuesta obtenida en las pruebas de actividad y preferencia. La mayor actividad y capacidad de respuesta de los machos puede estar aunados a la capacidad de llegar primero a las fuentes de alimento, tal como sucede en *A. grandis*.

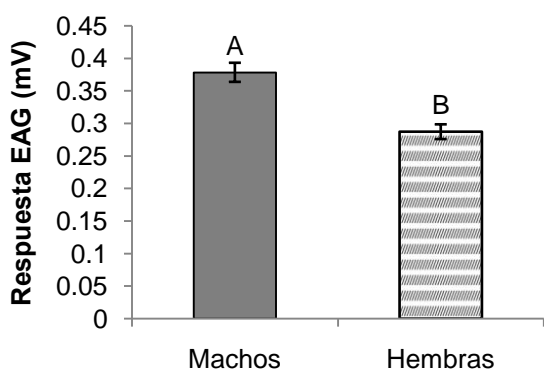


Fig. 2.3. Respuesta acumulada entre Adultos de *Anthonomus eugenii* a estándares evaluados. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas, DMS=0.0103, $\alpha=0.05$; $gl=340$.

La feromona sintética de *A. eugenii* se usa para el monitoreo del picudo del chile a las orillas del cultivo, con una distancia de 30 m entre trampa y dentro del cultivo colocando dos trampas por ha (Webb et al. 2001). Sin embargo, la eficiencia de estas se ha visto disminuida a medida que aparecen las primeras yemas, flores, frutos y otros factores que diluye el efecto de la feromona (Eller et al.1994). Hasta la fecha no se ha evaluado la eficiencia de la feromona en combinación con los volátiles de la

planta hospedera, lo que permitiría detectar poblaciones de picudos antes de la floración y fructificación. El sinergismo que existe entre los volátiles de la planta hospedera y la feromona de agregación ya ha sido estudiada en otros curculiónidos como *A. rubi*, *A. grandis*, *Rhynchophorus palmarum* (Rochat et al. 2000; Bichão et al. 2005). Basados en que la biología y comportamiento de *A. eugenii* es similar al de otros picudos, y en particular a picudo del algodón, donde la combinación de los volátiles liberados por la planta hospedera con la feromona de agregación producen sinergismo en la atracción (Burke, 1976; Dickens, 1989). Los resultados de este trabajo proveen bases para seguir trabajando con los volátiles identificados y con las dosis evaluadas buscando incrementar el potencial de feromona-volátiles asociados a hospederos.

2.4 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que los adultos de *A. eugenii* tiene la capacidad de discriminar entre las diferentes estructuras de chile, como son yemas, flores y frutos.

Se logró demostrar que hembras y machos prefieren diferentes estructuras de la planta. En todas las pruebas realizadas, los machos son los que presentan mayor actividad.

El análisis químico de los extractos volátiles reveló la presencia consistente de 17 compuestos, de los cuales el (E)- β -ocimeno y salicilato de metilo fueron los más abundantes. En un primer scan se eligieron siete compuestos que presentaron efecto electrofisiológico significativo.

En futuros estudios se podría evaluar el efecto de otros compuestos identificados en este trabajo y determinar si los compuestos evaluados en este trabajo podrían sumarse a la mezcla final.

2.5 LITERATURA CITADA

- Adams, R.P. 2001** Identification of essential oil components by Gas Chromatography/quadrupole mass spectrometry, Allured Publishing Corp.: Carol Stream, Illinois, USA.
- Addesso, K. M., H. J. McAuslane, & H. T. Alborn. 2010.** Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol Exp Appl.* 138: 1–11.
- Addesso, K. M., and H. J. McAuslane 2009.** Pepper Weevil Attraction to Volatiles from Host and Nonhost Plants. *Environ Entomol.* 38(1): 216-224.
- Arcos, G., J. Hernández, D. E. Uriza, O. Pozo, Y A. Olivera. 1998.** Tecnología para producir chile jalapeño en la planicie costera del Golfo de México. INIFAP–PRODUCE. Secretaría de Agricultura, México. Folleto técnico No. 24. 206 p.
- Bichao, H., A. K., Borg-Karlson., J. Araujo., & H. Mustaparta. 2005.** Five types of olfactory receptor neurons in the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi*: selective responses to inducible host-plant volatiles. *Chem Senses.* 30: 153–170.
- Burke, H.R. 1976.** Bionomics of the anthonomine weevils. *Annu Rev Entomol.* 21:283-303.
- Burke, H. R., and R. E. Woodruff. 1980.** The pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) in Florida (Coleoptera: Curculionidae). Fla. Dept. Agr. Consumer Serv. *Entomol. Cir.* 219. 4p.
- Cardoza, Y.J., H. T. Alborn., & J. H. Tumlinson. 2002.** *In vivo* volatile emissions from peanut plants induced by simultaneous fungal infection and insect damage. *J Chem Ecol.* 28: 161–174.
- Cartwright, B., T.G. Teague., L. D. Chandler., J.V. Edelson., and G. Bentsen. 1990.** An action threshold for management of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae) on bell peppers. *J Econ Entomol.* 83:2003-2007.
- Corrales, M. J. L. 2002.** Estrategias biorracionales para el manejo de las principales plagas del cultivo de chile en la Cruz de Elota, Sinaloa. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Centro de Entomología. Montecillo, México. 113 p.

- Diaz, F. G., P. J. McLeod, and D. T. Johnson. 2004.** Seasonal occurrence of eggplant flea beetle, *Epitrix fuscula* Crochet (Coleoptera: Chrysomelidae) on eggplant in arkansas. *J Kans Entomol. Soc.* 77: 80-88.
- Dickens, J. C. 1984.** Olfaction in the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae): Electroantennograms Studies. 10: 1759-1785.
- Dickens, J. C. 1986.** Orientation of boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) to pheromone and volatile host compound in the laboratory. *J Chem Ecol.* 12: 91-98.
- Dickens, J. C. 1989.** Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Entomol Exp Appl.* 52: 191–203.
- Eller, F. J. 1995.** A previously unknown sexual character for the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla Entomol.* 78: 180-183.
- Eller, F. J., R. J. Bartelt., B. S. Shasha., D. J. Schuster., D. G. Riley., P. A. Stansly., T. F. Mueller., K. D. Shuler., B. Johnson., J. H. Davis., and C. A. Sutherland. 1994.** Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J Chem Ecol.* 2: 1537–1555.
- Elmore, J. C., A. C. Davis, and R. F. Campbell. 1934.** The pepper weevil. U.S. Dept. Agr Tech Bull. 447. 27p.
- Fernandez, P. C., Meiners, T., Björkman, C., & M. Hilker. 2007.** Electrophysiological responses of the blue willow leaf beetle, *Phratora vulgatissima*, to volatiles of different *Salix viminalis* genotypes. *Entomol Exp Appl.* 125: 157–164.
- Fernández-Trujillo, J. P. 2007.** Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones. *Grasas y Aceites.* 58: 252-263.
- Goof, C. C., and J. W. Wilson. 1937.** The pepper weevil. *Univ Fla Agri Exp Sta Bull.* 310: 3-11.
- Hardee, D.D., Wilson, N.M., Mitchell, E.B., and P. M. Huodleson. 1971.** Factors affecting activity of grandlure, the pheromone of the boll weevil, in laboratory bioassays. *J Econ Entomol.* 64:1454-1456.
- Hare. J. D. 2011.** Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annu Rev Entomol.* 56: 161-180.

- Hern, A, & S, Dorn. 2002.** Induction of volatile emissions from ripening apple fruits infested with *Cydia pomonella* and the attraction of adult females. *Entomol Exp Appl.* 102: 145–151.
- Hori, M., 2007.** Onion aphid (*Neotoxoptera formosana*) attractants in the headspace of *Allium fistulosum* and *A. tuberosum* leaves. *J Appl Entomol.* 2007, 131: 8–12.
- In-Kyung, K., A.M. Abd El-Aty., S. Ho-Chul ., H Burm- Lee a., K. In-Seon, and S. Jae-Han. 2007.** Analysis of volatile compounds in fresh healthy and diseased peppers (*Capsicum annum* L.) using solvent free solid injection coupled with gas chromatography-flame ionization detector and confirmation with mass spectrometry.
- Knudsen, J. T., L. Tollsten., L. G. Bergstrom. 1993.** Floral scents – a checklist of volatiles compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33:253-280.
- Leskey, T.C., R. J. Prokopy., S. E. Wright., P. L. Phelan., and L. W. Haynes. 2001.** Evaluation of individual components of plum odor as potential attractants for adult plum curculios. *J Chem Ecol.* 27: 1-17.
- Marín-Loaiza, J. C, and Céspedes, C. L. 2007.** Compuestos volátiles de plantas. Origen, Emision, Efectos, Análisis y aplicaciones al Agro. *Rev Fit Méx.* 30 (4): 327-351.
- Osorio, C. J. 2006.** Comportamiento y respuesta hacia atrayentes de adultos del picudo de chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México p. 57.
- Paré, P.W. & J. H. Tumlinson. 1999.** Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* 121: 325–332.
- Patrock, R. J., and D. J. Shuster. 1992.** Feeding, oviposition, and development of the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) on selected species of Solanaceae. *Trop. Pest Manag.* 38: 65–69.
- Patrock, R. J., and D. J. Schuster. 1987.** Field survey for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii*, on nightshade. *Proc Fla Hortic Soc.* 100: 217-220.
- Pino, J., E. Sauri-Duch., R. Marbot. 2006.** Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chem.* 94 394–398.

- Riley, D. G., And E. G. King. 1994.** Biology and management of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): a review. Trends Agri. Sci. 2: 109-121.
- Riley, D. G., and A. N. Sparks, JR. 1995.** The pepper weevil and its management. Texas Agri Ext Serv Texas A&M Univ. L-5069.
- Riley, D. G., and D. J. Schuster 1994.** Pepper weevil adult response to colored sticky traps in pepper field. Southwes Entomol. 19: 93-107.
- Riley, D. G., D. J. Schuster., and C. S. Barfield. 1992b.** Refined action threshold for pepper weevil adults (Coleoptera: Curculionidae) in bell peppers. J Econ Entomol. 85: 1919-1925.
- Rochat, D., Nagan-Le Meillour, P., Esteban-Duran, J.R., Malosse, C., Perthuis, B., Morin, J.-P. and C. Descoins. 2000.** Identification of pheromone synergists in the american palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. J Chem Ecol. 26: 155–187.
- Rodríguez-Leyva, E. 2006.** Life history of *Triaspis eugenii* Wharton and López-Martínez (Hymenoptera: Braconidae) and evaluation of its potential for biological control of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Ph. D. Dissertation, Univ. of Fla. Gainesville. 110 p.
- Sas Institute. 1995.** SAS/STAT. Guide for Personal Computers. Versión 6.12. SAS Institute, Cary, N. C. USA. 1028 p.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2010.** Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo. Disponible en línea en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350. Consultado el 12 de octubre del 2011.
- Sokal, R., and F. G. Rohlf. 1995.** Biometry. Freeman. New York. 887 p.
- Tafoya, F., J Lopez-Collado., D. Stanley., J. C. Rojas., and J. Cibrián-Tovar. 2003.** Evidence of an aggregation pheromone in males of the cactus weevil *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae). Environ Entomol. 32: 484–487.
- Velasco, P. H. 1969.** Evaluación de pérdidas, preferencia de oviposición del picudo barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Efectividad de varios insecticidas y reacción de diferentes variedades a su ataque. Agr Tec Méx. 499-507.
- Velázquez-González, J. C., Cibrián-Tovar, J., Hidalgo-Moreno. C., T. R., Vásquez-Rojas. 2011.** Validación del método de aireación dinámica para la captura de compuestos volátiles de *Capsicum* spp. Rev Latinoamer Quím. 39:6-14.

- Walker, C. M. 1905.** The pepper weevil (*Anthonomus aeneotinctus* Champ.). USDA. Bur Entomol Bull. 54: 43-48.
- Webb, S. E., P. A. Stansly., D. J. Schuter., and J. E. Funderburk. 2001.** Insect management for tomatoes, peppers and eggplant. Serie of the Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service Department. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 69 p.
- Wilson, R. J. 1986.** Observations on the behaviour and host relations of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) in Florida. M.S. Thesis, Univ. of Fla. Gainesville. 94 p.

CAPÍTULO 3
Morfometría del rostrum y tipología de las sensilla antenales de *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae)

Abstract

The morphology of the rostrum and of sensilla on antennae of adult *Anthonomus eugenii* (Cano) were studied using scanning electron microscopy. Both sexes have the same shape and number of antennal segments. The main differences were found in the length of the rostrum, and the insertion of the antennae. Females have longer rostrum compared than males, and males have the antennae inserted close to the mouthparts. The typology of sensilla varies considerably in size, shape and distribution. We, distinguished, because of his length about 7 types of sensilla between 2 and 80 microns, with areas of 1.8-135.4 μm^2 in both sexes. The males present unique shaped sensilla, such as, flame without streaks and baby sucker, distributed on the last segment of the antenna. Both sexes exhibited a bell-shaped sensilla, in females it have three papillae at the distal end of the sensulo, and in males it have four.

Keys works: Sensilla, rostrum, antennal segments.

Resumen.

La morfología del rostrum y tipología de las sensilla en antenas de adultos de *Anthonomus eugeni* (Cano) se estudiaron por medio de microscopía electrónica de barrido. Ambos sexos presentan la misma forma y número de segmentos antenales. Las principales diferencias se encontraron en la longitud del rostrum, y la inserción de las antenas, las hembras tienen más largo el rostrum comparado con machos y los machos presentan la inserción de las antenas más cerca de las partes bucales. Las sensilla antenales varían mucho en tamaño, forma y distribución. En ambos sexos se observaron alrededor de 7 tipos de sensilla por longitud, entre los 2 y 80 μm , con áreas de 1.8-135.4 μm^2 . Los machos presentan sensilla únicas en forma de llama sin estrías y en forma de "chupon", distribuidas en el último segmento de la antena. Ambos sexos presentan sensilla en forma de campana, en hembras con tres papilas en la parte distal del sensulo y en machos con cuatro.

Palabras clave: Sensúlo, rostrum, segmentos antenales.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los insectos, a lo largo del tiempo, han desarrollado mecanismos para interactuar con el ambiente detectando cambios fisicoquímicos en este, que le permiten realizar actividades metabólicas, comportamiento y fisiológicas (Jacquin-Joly and Merlin, 2004). La importancia de los volátiles de plantas y feromonas en Curculionidae se ha documentado en varias especies de esta familia (Dickens, 1989; Calyecac-Cortero et al. 2006; Adesso et al. 2010). Por ejemplo, en el caso de *Anthonomus eugenii* (Cano), el macho libera una feromona de agregación que atrae a machos y hembras en la misma proporción (Patrock et al.1992). Sistemas similares se usan por otros insectos en donde el principal órgano olfatorio son las antenas. Sin embargo, existe información insuficiente de la morfología de las antenas de *Anthonomus eugenii*. Los olores son mensajes químicos que usan los insectos y que son traducidos a señales eléctricas dentro de las neuronas a través de órganos especializados, principalmente la antena (Jacquin-Joly and Merlin, 2004). Un entendimiento de la morfología antenal es crucial para desarrollar estudios sobre el sistema olfatorio de este insecto. El conocimiento de la morfología antenal con frecuencia se integra con investigaciones moleculares, genéticas y de comportamiento para construir modelos integrales del sistema olfatorio para especies de interés (Bruyne et al. 2001; Galizia & Rössler, 2010).

Anthonomus eugenii, es el principal problema de insectos plaga en todas los cultivares de *Capsicum* spp. en México, centroamérica, algunas islas del Caribe y EE. UU. El daño es causado por adultos al alimentarse de yemas y flores, y por la alimentación y desarrollo de larvas dentro de los frutos inmaduros causando abscisión. Estudios previos han demostrado que los adultos de *A. eugenii* responden a volátiles

liberados por estructuras de la planta con flores yemas y frutos, así como a volátiles liberados por sus conespecíficos (Addesso et al. 2010; Patrock & Shuster, 1992). Por lo tanto, el conocimiento básico del tipo sensilla antenal de *A. eugenii* podría contribuir a conocer el mecanismo olfatorio en este insecto. En objetivo de este trabajo fue describir la morfología de las antenas, segmentos antenales, los tipos de sensilla presentes en ambos sexos y la morfometría del rostrum.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Insectos.

Frutos de chile, *Capsicum annuum* infestados con larvas de *A. eugenii* se recolectaron en municipios de Yurecuaro, Vista Hermosa (Michoacán), Culiacan, Los Mochis (Sinaloa), Cotaxtla (Veracruz), Axochiapan Morelos, México del 28 de septiembre del 2008 al 14 de noviembre del 2009. La colonia se estableció de acuerdo a los criterios descritos por Rodríguez-Leyva (2006). Los frutos se mantuvieron en un recipiente de plástico de 4 L provistos de orificios de 3 cm de diámetro para mantener la ventilación, los orificios se cubrieron con malla tipo organza. La cría se mantuvo continuamente con la adición de frutos de chile jalapeño y disolución de miel al 10%. El cuarto de cría se mantuvo a 25-28°C, con 60-70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 (L: O). Después de la emergencia, los adultos fueron separados por sexo usando los mucrones metatibiales como lo señaló Eller (1995).

3.2.2. Microscopia Electrónica de Barrio (MEB).

Los adultos de *A. eugenii* fueron decapitados, y las antenas de 12 machos y 12 hembras se colocaron separadas en una disolución de etanol al 80, 90 y 100% durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se tomó otra muestra similar y se trató de la misma forma, añadiendo un baño ultrasónico del material por 10 seg. Ambas muestras fueron secadas con CO₂ en su punto crítico y después bañado con oro paladio en un equipo Denton II (20 nm). Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido TOPCON SM-510, a 5-kV (Valdez, 1991; Wall, 1978). Se tomaron cuatro microfotografías (dorsal, ventral, y laterales) para las antenas de ambos sexos.

3.2.3. Morfometría.

La longitud y el área de cada tipo de sensillum se determinó basado en la medición de 10 tipos de sensilla. Se midió un total de 50 sensilla de cada tipo en un total de 10 antenas por sexo. Todas las mediciones se realizaron con la ayuda del Software Image Tool (V 3.00) para Windows.

3.2.4. Análisis estadístico.

Para comparar las longitudes del rostrum entre ambos sexos, así como también para comparar la distancia de las partes bucales a la inserción de las antenas, se usó una prueba de t con Proc ttest, para muestras no pareada con ($\alpha=0.05$).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Morfometría del rostrum e inserción de las antenas

Se encontraron diferencias significativas en la longitud del rostrum entre machos y hembras con un valor de *A. eugenii* ($t=4.32$, $P=0.0012$, $gl=11$); así como diferencias entre la inserción de las antenas ($t=8.1$, $P=0.0001$, $gl=14$). Las hembras presentan un rostrum más largo y delgado comparado con machos (Cuadro 3.1). Las antenas están insertadas más cerca de las partes bucales en machos siendo esta diferencia significativa. (Cuadro 3.1.). Este resultado coincide con el reportado por Sappington y Spurgeon (2000), para *A. grandis*, con colectas de picudos de diferentes sitios y con las observaciones realizadas por Dietz (1891) en *A. eugenii*. Este dimorfismo sexual aunque aparentemente subjetivo, se puede apreciar con práctica y puede ayudarnos a separa sexos en esta especie y junto con el uso del mucron metatibial descrito por Eller (1995) sirve para corroborar el sexo del insecto.

Cuadro 3.1. Longitud en μm \pm de del rostrum e inserción de las antenas con respecto a las partes bucales en adultos de *Anthonomus eugenii*.

	Inserción de la antena (μm)	Longitud del rostrum (μm)
Hembra	537.95 \pm 43.06	1403.08 \pm 8.84
Macho	414.54 \pm 14.28	1254.45 \pm 66.94

n=12 de cada sexo.

3.3.2. Morfología general de la antena.

La antena del picudo del chile, *A. eugenii*, consiste de un largo escapo, un pedicelo y un flagelo con nueve segmentos, los últimos tres segmentos fusionados formando una clava (algunas veces llamado segmento 7) (Figura 3. 1.). La antena de ambos sexos es morfológicamente similar (Cuadro 3.2).

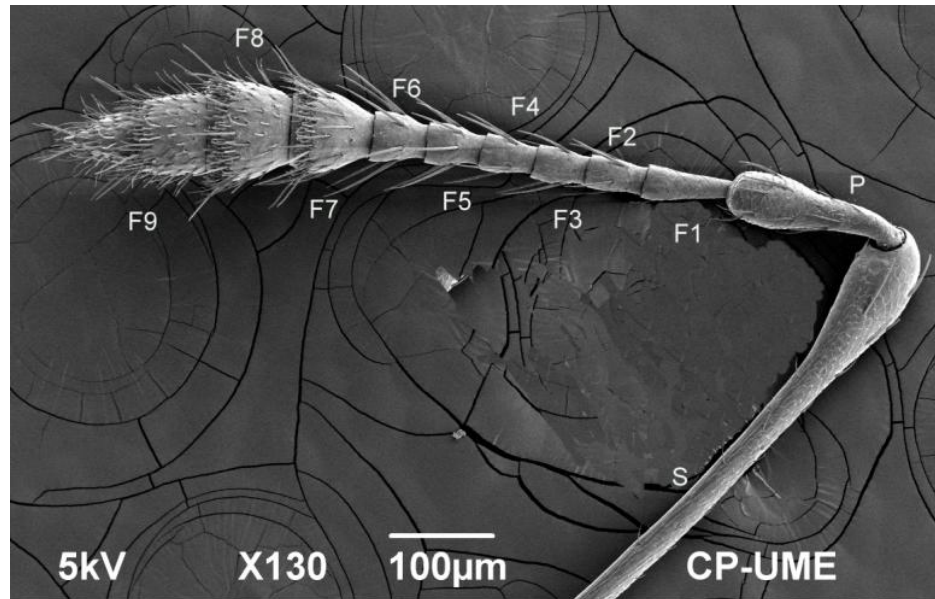


Fig.3.1. Antena de hembra de *Anthonomus eugenii* en MEB. S=escapo; P=pedicelo; F1-F9= flagelómeros.

Cuadro 3.2. Mediciones en $\mu\text{m} \pm$ de de los segmentos antenales de adultos de *Anthonomus eugenii*.

	Escapo	Pedicelo	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9
Macho	787 \pm 23	152 \pm 5	91 \pm 3	48 \pm 4	47 \pm 5	45 \pm 3	48 \pm 4	49 \pm 4	83 \pm 2	86 \pm 3	130 \pm 8
Hembra	764 \pm 36	148 \pm 9	93 \pm 1	55 \pm 1	49 \pm 2	47 \pm 2	51 \pm 2	51 \pm 4	92 \pm 4	85 \pm 1	116 \pm 6

F=Flagelo; las mediciones están dadas en $\mu\text{m} \pm$ desviación estándar.

3.3.3. Tipología de las sensilla antenales del picudo del chile.

El escapo y pedicelo en la parte distal presentan pelos curvados conocidos como microtrichia. El flagelo es la parte más prominente de la antena. La mayoría de las sensilla se presentan en esta sección de segmentos, especialmente en la clava antenal. Las sensilla están distribuidas en dos bandas claras en la parte distal del segmento 7 y 8 (Figura 3.2. a). El segmento nueve está totalmente cubierto por sensilla, por lo que no es fácil observar un patrón de distribución. En la figura 3.2. (a) se observa los últimos tres segmentos y la distribución de sensilla, en (b y c) se observa la

presencia de un gran número de sensilla basicónicas en la parte distal de los flagelómeros 7 y 8. En la figura 3.2 (c), se observa el último segmento totalmente cubierto por microtrichias, y sénsulos basicónico. En la d se observa la parte distal del último segmento el cual termina en un sensulo de tipo campaniforme con la presencia de papilas.

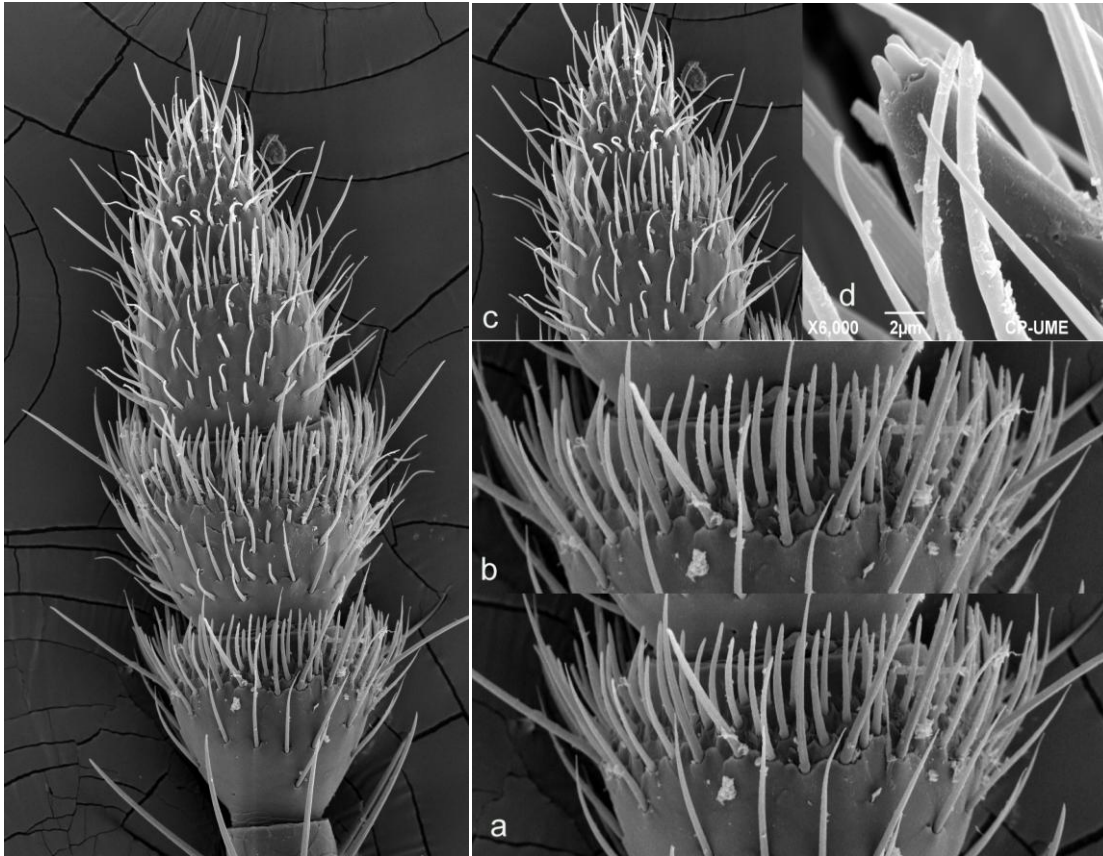


Fig. 3.2. Tipología de sensilla antenal de *Anthonomus eugenii* (a) clava antenal presentando la distribución de sensillas (X=350); (b, c y d), muestran la parte distal del flagelo 7, 8 y 9; (d), muestra la parte distal del último segmento formado por un sénsulo de tipo campaniforme con papilas.

En antenas de machos se observa la presencia de un sensulo de tipo campaniforme con cuatro papilas en la parte distal, (Figura 3.3 a). En el caso de hembras se observa este mismo sensulo pero con tres papilas (Figura 3.3 b). Se puede observar que no solo cambia el número de papilas, si no también la distribución de éstas y la forma del sensulo, este sensulo se localiza en el último segmento antenal. En la figura 3.3. c, y d, se observa a los demás tipos de sensilla presentes en este segmento que son todas de tipo basicónico (2, 3, 4), con excepción del tipo 3, que presenta una forma de flama.

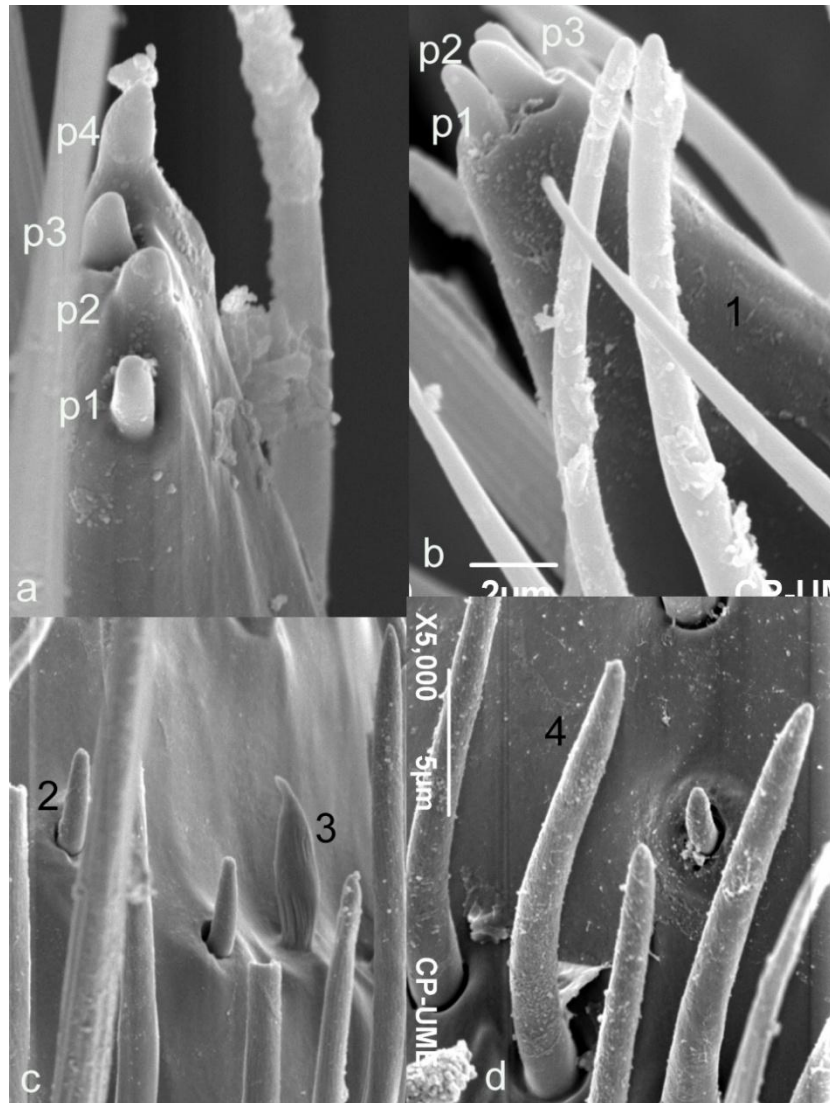


Fig. 3.3. Tipología de las sensilla en el último segmento antenal de *Anthonomus eugenii*. (a y b=6 000x; d=5 000x;

En la figura 3.4. (a, b y c), se observa la presencia de sensilla tipo 5, 6 y 7. La 5 presenta una forma de tipo chupón presente sólo en el último segmento de la antena de machos. La tipo 6, es lo más parecido a la de tipo flama sólo que esta no presenta estrías cerca de la base ni al final como la observada en hembras. La de tipo 7, fue común en machos y hembras, presenta forma basicónica, con un estriado longitudinal en el último tercio, se observó con distribución regular, casi alineadas, con cuatro sensilla al inicio del último segmento.

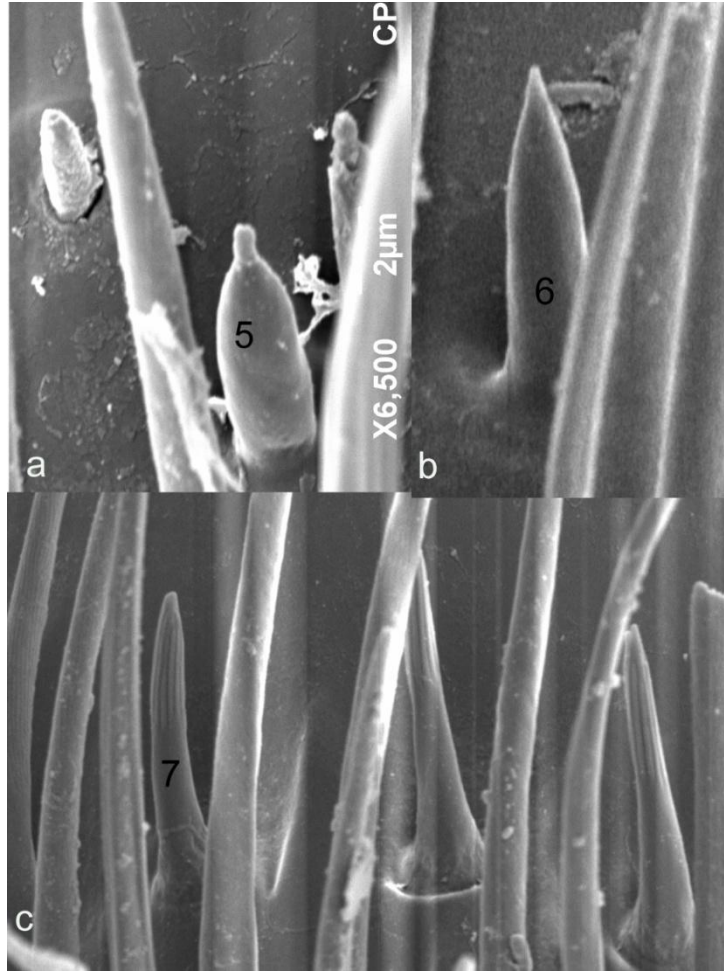


Fig. 3.4. Sensilla basicónica tipo 5, 6 y 7. 5 y 6 observadas sólo en antenas de machos. (a=2 500x, y b=1,500x; c=6 000x).

3.3.4. Morfometría de los diferentes tipos de sensilla.

Con base en la longitud y área de sensilla antenal de *A. eugenii* se logró agrupar 11 tipos (Cuadro 3.3), los que más predominaron fueron los de tipo tricoideo. Estos están distribuidos ampliamente desde el escapo, pedicelo, y en las partes distales de cada flagelo.

Cuadro 3.3. Morfometría de sensilla en antenas de machos y hembras de *Anthonomus eugenii*.

Sensilla tipo	Forma	Longitud	Área
1	Campaniforme	12.81±0.02	73.04 ±2.85
2	Basicónico con socket	2.52±0.22	2.32±0.33
3	Flama	6.36±0.38	7.29±0.14
4	Basicónico	15.7±0.44	21.7±0.64
5	Forma de chupón	6.04±0.66	8.97±0.93
6	Flama sin estrías	1.33±0.04	0.370±0.01
7	Basicónico con estrías en último tercio	9.13±0.81	11.06±1.04
8	Tricoideo	22.95±0.5	32.14±2.52
9	Tricoideo	18.21±0.54	21.54±2.09
10	Tricoideo	36.93±2.85	63.64±6.78
11	Tricoideo	47.06±3.36	83.03±6.78

Longitud promedio ± de en (µm) y área en (µm²).

3.4 CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas en la longitud del rostrum, así como en la distancia de las partes bucales a la inserción de las antenas, las hembras de *A. eugenii* presentan un rostrum más largo y delgado que los machos. Los machos presentan la inserción de las antenas más cerca de las partes bucales que las hembras.

Se encontraron diferencias morfológicas en las sensilla de machos y hembras de *A. eugenii*, así como en la distribución. Machos y hembras comparten un tipo de sensilla en forma de flama, en hembras de mayor tamaño que en machos y en machos esta sensilla no presentaron estrías. Se encontró un sensulo con una papila en la parte distal, esto le da forma de chupón, y sólo se observó en la antena de machos.

3.5 LITERATURA CITADA

- Addesso, K. M., H. J. McAuslane, & H. T. Alborn. 2010.** Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol Exp Appl.* 138: 1–11.
- Bruyne, M., K. Foster., and J. R. Carlson. 2001.** Odor coding in the *Drosophila melanogaster* antennae. *Neuron* 30: 537-552.
- Calyecac-Cortero, H.G., Cibrián-Tovar, J., Soto-Hernández, M., R. García-Velazco. 2007.** Aislamiento e identificación de volátiles de *Physalis philadelphica* LAM. *Agrociencia* 41: 337-346.
- Dickens, J. C. 1989.** Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Entomol Exp Appl.* 52: 191–203.
- Dietz, W. G. 1891.** Revision of the genera and species of Anthonomini inhabiting North America. *Trans. America Entomol Soc.* 18:177-276.
- Eller, F. J. 1995.** A previously unknown sexual character for the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla Entomol.* 78: 180-185.
- Galizia, C. G., Sachse, S., Rappert, A., and R. Menzel. 1999.** The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat. Neurosci.* 2: 473–478.
- Jacquín-Joly E. and C. Merlin. 2004.** Olfactory receptors: contribution of molecular biology to chemical ecology. *J Chem Ecol.* 30, 2359-2397.
- Patrock, R. J., and D. J. Shuster. 1992.** Feeding, oviposition, and development of the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) on selected species of Solanaceae. *Trop Pest Manag.* 38: 65–69.
- Rodríguez-Leyva, E. 2006.** Life history of *Triaspis eugenii* Wharton and López-Martínez (Hymenoptera: Braconidae) and evaluation of its potential for biological control of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Ph. D. Dissertation, Univ. of Fla. Gainesville. 110 p.
- Sappington, T. W., and D. W. Spurgeon. 2000.** Preferred Technique for adult sex determination of the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Ann Entomol Soc Am.* 93: 610-615.
- Valdez, J. 1991.** Preparación de insectos y ácaros para microscopía electrónica de barrido. *Bol Soc Mex Entomol.* 8: 9-18.
- Wall, C. 1978.** Morphology and histology of the antenna of *Cydia nigricana* (F.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Int J Insect Morphol Embryol.* 7: 237-250.

CONCLUSIONES GENERALES

El método de aireación dinámica cumplió con las variables analíticas establecidas para su validación. Con este método se demostró que es posible de recolectar volátiles en un tiempo promedio de 6 h. El método es eficiente en recolectar volátiles provenientes de plantas de chile, yemas florales, flores y frutos inmaduros con características físicas y químicas similares a los evaluados en la validación. Para otros compuestos con características diferentes como PV>10 habrá que realizar un validación intermedia.

Los adultos del picudo del chile, *Anthonomus eugenii*, son capaces de discriminar entre diferentes fuentes de volátiles provenientes de estructuras reproductivas de la planta de chile. Los machos son que presentan mayor porcentaje de actividad y preferencia en comparación con las hembras.

Cinco de 17 compuestos evaluados, produjeron actividad electrofisiológica en machos y hembras en un rango de 0.5-5 μ g. Estos compuestos podrían sumarse a la mezcla final para conocer la respuesta del insecto y probablemente potenciar la actividad de la feromona de agregación.

Se encontraron diferencias morfométricas entre machos y hembras de *A. eugenii*, estas diferencias se observan en la longitud del rostrum, inserción de las antenas y en la tipología de las sensilla antenales del último segmento.