



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

## **FACTORES**

**INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DEL PICUDO DEL AGAVE  
HACIA EL COMPUESTO FEROMONAL 2-METIL-4-OCTANONA Y  
SU MANEJO CON AGAVE FERMENTADO E INSECTICIDAS  
SINTÉTICOS.**

**AUSENCIO AZUARA DOMÍNGUEZ**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

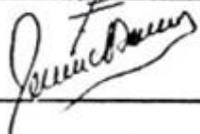
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2013**

La presente tesis titulada. **Factores involucrados en la respuesta del picudo del agave hacia el compuesto feromonal 2-metil-4-octanona y su manejo con agave fermentado e insecticidas sintéticos**, realizada por el alumno: **Ausencio Azuara Domínguez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	<u>Dr. Juan Cibrián Tovar</u>	
ASESOR	<u>Dra. Obdulia L. Segura León</u>	
ASESOR	<u>Dra. Angélica Cibrián Jaramillo</u>	
ASESOR	<u>Dr. Antonio P. Terán Vargas</u>	
ASESOR	<u>Dr. Carlos A. Blanco Montero</u>	

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2013

## RESUMEN

El picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* produce una feromona de agregación que atrae ambos sexos. Sin embargo, la respuesta es baja debido a diferentes factores que interfieren, por lo que es necesario un mejor conocimiento de los factores participantes, así mismo, buscar nuevas alternativas de control. En la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos: 1) Determinar la participación del sexo, edad y de la estructura genética en la respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus* al compuesto principal de su feromona de agregación. 2) Evaluar la eficiencia de la planta de agave tequilero en estado fermentado en el trapeo del picudo e identificar los compuestos volátiles atractivos para este insecto. 3) Determinar la efectividad de insecticidas con diferente modo de acción en el control de *S. acupunctatus*. Se determinó que la respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda del picudo del agave al 2-metil-4-octanona no es igual entre las poblaciones de insectos procedentes de diferentes cultivos y regiones geográficas. En ambas respuestas de *S. acupunctatus* interviene la edad de los adultos y los cambios genéticos presentes en el ADN mitocondrial. Así también, se observó que las trampas cebadas con la feromona junto con el material vegetal en estado fermentado son más eficientes en el trapeo del picudo del agave que aquellas que no contenían material fermentado. En el material fermentado se identificaron volátiles atractivos que producen sinergia en la respuesta del picudo del agave hacia su feromona de agregación. Por último, se determinó que los insecticidas malatión, endosulfán, metomilo y fipronil son eficaces en el control de picudo del agave.

**Palabras clave:** *Scyphophorus acupunctatus*, electroantenografía, olfatómetro, ADN mitocondrial, trapeo de adultos, insecticidas sintéticos.

## ABSTRACT

The agave weevil *Scyphophorus acupunctatus* produces an aggregation pheromone that attracts both sexes. However, the response is low due to various interfering factors, so we need a better understanding of the factors involved, also, finding new ways of control. The present study had the following objectives: 1) to investigate the effect of sex, age and genetic structure in the electrophysiological response and search behavior of *S. acupunctatus* to 2-methyl-4-octanone. 2) To evaluate the efficiency of trapping *S. acupunctatus* by using the fermented head of *A. tequilana* and to identify the volatile compounds involved in attraction of the agave weevil. 3) To evaluate the effectiveness of synthetic insecticides of different toxicological groups to control *S. acupunctatus*. We show that the electrophysiological and behavioral response of the agave weevil to 2-methyl-4-octanone differs among the populations of insects from different crops and geographic regions. This suggests that in both responses of *S. acupunctatus* age of insects and the genetic changes in mitochondrial DNA are involved. Also, we observed that the traps baited with the pheromone and fermented head caught more weevils than the other treatments. The fermented agave head increased the attraction of *S. acupunctatus*, while non fermented head did not contribute significantly. The following volatiles were identified in the fermented head: ethyl acetate, ethanol, 2-butanol, and acetic acid. Whereas in the non fermented head, 24 volatile compounds were collected, they were different than those identified in the fermented head. Finally, we determined that the malathion, endosulfan, methomyl, and fipronil showed high biological efficacy.

**Key words:** *Scyphophorus acupunctatus*, electroantennography, olfactometer, mitochondrial DNA, trapping, synthetic insecticides.

## DEDICATORIA

- A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy.
- A mi esposa Lidia Rivera Hernández por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.
- A mi hija Silvia Nallely Azuara Rivera por entender mi ausencia en casa.
- Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

*Por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de Maestría y Doctorado.*

### **Al Colegio de Postgraduados.**

*Por darme la oportunidad de alcanzar este logro académico.*

### **A mis maestros.**

*Por trasmitirme sus conocimientos y por su asesoría en el presente trabajo de tesis.*

### **A mis amigos.**

*Que me apoyaron en mi formación profesional.*

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>DEDICATORIA</b> .....	IV
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	VI
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	X
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	XI
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	1
1.1 EL PICUDO DEL AGAVE .....	1
1.1.1 Origen y distribución geográfica .....	1
1.1.2 Hospedantes .....	1
1.1.3 Clasificación taxonómica .....	1
1.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA .....	2
1.2.1 Huevo .....	2
1.2.2 Larva .....	2
1.2.3 Pupa .....	2
1.2.4 Adulto .....	2
1.2.5 Dimorfismo sexual .....	3
1.3 BIOLOGÍA .....	3
1.4 HÁBITOS .....	4
1.5 DAÑOS .....	4
1.6 MÉTODOS DE CONTROL .....	4
1.6.1 Biológico .....	4
1.6.2 Cultural .....	5
1.6.3 Químico .....	5
1.6.4 Etológico .....	6
1.7 ESTUDIOS DE ATRAYENTES Y TRAMPEO DEL PICUDO DEL AGAVE .....	6
1.8. ECOLOGÍA QUÍMICA DEL PICUDO DEL AGAVE. ....	7
LITERATURA CITADA .....	9
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	14
<b>FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DEL PICUDO DEL AGAVE SCYPHOPHORUS ACUPUNCTATUS AL COMPUESTO PRINCIPAL DE SU FEROMONA DE AGREGACIÓN</b> .....	14
RESUMEN .....	14
ABSTRACT .....	15
2.1 INTRODUCCIÓN .....	16
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
2.2.1 Insectos .....	17
2.2.2 Compuesto 2-metil-4-octanona. ....	18
2.2.3 Electroantenograma (EAG). ....	18

2.2.4 Bioensayo de olfatómetro.....	19
2.2.5 Análisis de los datos de conducta. ....	20
2.2.6 Comparación genética del picudo del agave <i>S. acupunctatus</i> . ....	21
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
2.4 LITERATURA CITADA.....	33
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>37</b>
<b>TRAMPEO CON AGAVE FERMENTADO E IDENTIFICACIÓN DE LOS VOLÁTILES INVOLUCRADOS EN LA ATRACCIÓN DEL PICUDO DEL AGAVE <i>SCYPHOPHORUS ACUPUNCTATUS</i>. ....</b>	<b>37</b>
RESUMEN .....	37
ABSTRACT .....	38
3.1 INTRODUCCIÓN .....	39
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
3.2.1 Trampa.....	41
3.2.2 Feromona y atrayente alimenticio. ....	41
3.2.3 Experimentos en campo.....	41
3.2.4 Análisis estadístico.....	42
3.2.5 Muestreo de volátiles. ....	42
3.2.6 Análisis químicos.....	43
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
3.4 LITERATURA CITADA.....	48
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>53</b>
<b>EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS PARA EL CONTROL DEL PICUDO DEL AGAVE <i>SCYPHOPHORUS ACUPUNCTATUS</i> GYLLENHAL (<i>COLEOPTERA: CURCULIONIDAE</i>).....</b>	<b>53</b>
RESUMEN .....	53
ABSTRACT .....	54
4.1 INTRODUCCIÓN .....	55
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	56
4.2.1 Material biológico. ....	56
4.2.2 Insecticidas.....	56
4.2.3 Bioensayos.....	57
4.2.4 Análisis estadístico.....	57
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.4 LITERATURA CITADA.....	61
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>64</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Resultado de actividad (a) y preferencia (b) de elección de *Scyphophorus acupunctatus* en el olfatómetro. Debido a que no se observaron diferencias entre sexos, los datos de ambos sexos se combinaron en estas figuras. Las barras verticales sobre las columnas representan el error estándar de la media. La diferencia estadística es indicada por diferente letra (Kruskal Wallis, Bonferroni,  $P < 0.05$ )..... 29
- Figura 2.** Resultado del bioensayo de comportamiento de *Scyphophorus acupunctatus* obtenido en el olfatómetro. La respuesta de machos y hembras no fue diferente. Los datos se combinaron para el análisis; el porcentaje de la respuesta de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona vs testigo se comparó usando la prueba de Mann-Whitney U (\*  $P < 0.05$ )..... 30
- Figura 3.** Comparación del porcentaje de respuesta al 2-metil-4-octanona entre poblaciones de insectos recolectados en diferentes regiones geográficas. La respuesta de los machos y las hembras no fue diferente, debido a esto los datos se combinaron para el análisis, las barras verticales sobre las columnas representan el error estándar de la media, la diferencia significativa es indicada por diferentes letras (Kruskal Wallis, Bonferroni,  $P < 0.05$ )..... 31
- Figura 4.** Árbol basado en Neighbor-Joining de COI en *S. Acupunctatus*. El valor sobre los brazos represente a la distancia genética, mientras que el valor sobre los entrenodos de los brazos soporta el clade calculado con 500 repeticiones bootstrap ..... 32
- Figura 5.** Promedio de picudos (media  $\pm$  SE) capturados por trampa por día en trampas cebadas con: T1) feromona, T2) feromona + cabeza en estado fermentado, T3) feromona + cabeza sin fermentar, T4) cabeza en estado fermentado, T5) cabeza sin fermentar y T6) testigo (Tukey,  $P < 0.05$ ). ..... 46
- Figura 6.** Cromatograma de los volátiles recolectados con la técnica de Microextracción en Fase Solida (SPME) en la cabeza en estado fermentado (a) y sin fermentar (b). El número sobre la base del pico corresponde al compuesto volátil muestreado ..... 47

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Análisis de varianza del efecto del sexo, edad y la interacción entre sexo y edad en la respuesta electrofisiológica de <i>S. acupunctatus</i> al 2-metil-4-octanona. ....	27
<b>Cuadro 2.</b> Resumen estadístico de las secuencias COI de <i>S. acupunctatus</i> . ....	28
<b>Cuadro 3.</b> Mortalidad observada en el picudo del agave <i>Scyphophorus acupunctatus</i> , en Tamaulipas. ....	60

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de agave tequilero, *Agave tequilana* F.A.C. Weber variedad azul, es la materia prima para obtener la bebida alcohólica conocida como tequila (CRT 2009). En México, este cultivo se encuentra en 181 municipios de cinco estados protegidos por la Denominación de Origen de Tequila (DOT) (CRT 2009, SAGARPA 2010). El estado de Jalisco es el principal productor del agave tequilero con 122,555.0 hectáreas. Con esta superficie se obtiene el 99% del total de la producción del tequila (CRT 2009).

En los últimos años diversos factores han impactado de manera negativa en la producción del tequila (SAGARPA 2010). Por ejemplo, la comercialización de bebidas apócrifas en el sector informal, la caída del precio del tequila y el aumento de problemas fitosanitarios en el cultivo de agave (CRT 2009).

En materia de fitosanidad, el 40% de la superficie total cultivada con agave tequilero presenta síntomas de enfermedades fungosas y bacterianas (Fucikovsky 2002, Virgen 2004, Cuevas y Vicencio 2007, Rubio 2007, Arellano 2008). Además de las enfermedades, el cultivo de agave es dañado por insectos plaga (Hernández et al. 1999). Los insectos no solo causan daños directos a las plantas sino que además favorecen la entrada de organismos fitopatógenos que acentúan las pérdidas económicas (Hernández et al. 1999).

Las principales plagas del cultivo del agave son la gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae), el escarabajo rinoceronte (*Strategus alous*), el cerambícido del agave (*Acanthoderes funeraria*), el barrenador de las pencas (*Agathymus rethon*), el gusano blanco del agave (*Aegiale hesperiaris*) y el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*). Esta última plaga es la más importante, debido a que causa 30% de pérdidas en los cultivos de agave tequilero *A. tequilana* y agave pulquero (*A.*

*salmiana* Otto), 46% en *A. angustifolia* Haw, 50% en henequén (*A. fourcroydes* Lem) y 69% en plantaciones de nardo *Polianthes tuberosa* L., en los estados de Jalisco, Morelos, Oaxaca y Yucatán, respectivamente (Ramírez-Choza 1993, Solís-Aguilar et al. 2001, Camino et al. 2002, Valdés et al. 2005).

Se sabe que el picudo del agave produce una feromona de agregación para comunicarse entre individuos de la misma especie. La feromona está conformada por el 2-metil-4-heptanol, 2-metil-octanol, 2-metil-4-heptanona y 2-metil-octanona (Ruiz-Montiel et al. 2008). En campo ambos sexos responden a todos los compuestos de su feromona (Ruiz-Montiel et al. 2008), sin embargo, la respuesta es baja debido a diferentes factores que interfieren como la edad y hospedero (Ruiz-Montiel et al. 2009). Lo anterior dificulta el uso de la feromona en el monitoreo y control de este insecto en el cultivo del agave. Por lo tanto, es necesario conocer mejor los factores participantes, así como también buscar alternativas de control. En la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos: 1) Determinar la participación del sexo, la edad y de la estructura genética en la respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus* al compuesto principal de su feromona de agregación. 2) Evaluar la eficiencia en el trapeo de *S. acupunctatus* de la planta de agave tequilero en estado fermentado e identificar los compuestos volátiles participantes en la atracción. 3) Determinar la efectividad de insecticidas con diferente modo de acción en el control de *S. acupunctatus*.

## CAPÍTULO 1

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1 El picudo del agave

##### 1.1.1 Origen y distribución geográfica

El picudo del agave es originario de América y actualmente es de amplia distribución mundial, ya que se encuentra en Australia, Tanzania, Estados Unidos de América (Arizona, Arkansas, California, Colorado, Florida, Georgia, Hawaii, Kansas, Nuevo México y Texas), Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Cuba, Jamaica, República Dominicana, Colombia, Venezuela y Brasil. En México está presente en los estados donde se tienen plantas cultivadas o silvestres del género *Agave* (Halfter 1957, Lock 1962, Pérez 1980, Booth et al. 1990, González et al. 2007).

##### 1.1.2 Hospedantes

El picudo del agave tiene preferencia por el agave tequilero (*A. tequilana* var. Azul), henequén (*A. fourcroydes* Lem.), maguey pulquero (*A. atrovirens* Karw), maguey mezcalero espadín (*A. angustifolia*), maguey mezcalero papalote (*A. cupreata*), sisal (*A. sisalana*), *A. americana* L., *A. lechuguilla* Torr., así como también se le ha encontrado alimentándose de plantas del género *Dasyliiron* y de otros cultivos como el nardo (*P. tuberosa* L.) y la yuca (*Yucca valida* Brandegees) (Halfter 1957, Solís-Aguilar et al. 2001, Espinosa et al. 2005, Camino et al. 2002, Barrios et al. 2006, Servín et al. 2006, González et al. 2007).

##### 1.1.3 Clasificación taxonómica

El picudo del agave (en inglés agave weevil), pertenece al phylum: Arthropoda, clase: Insecta, subclase: Pterygota, división: endopterygota, orden: Coleoptera, suborden: Polyphaga, familia: *Curculionidae*, subfamilia:

*Rhynchophorinae*, tribu: Sphenophorini, genero: *Scyphophorus* y especie: *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (= *S. interstitialis*) (Booth et al. 1990).

## **1.2 Descripción morfológica**

### **1.2.1 Huevo**

El huevo es de forma ovoide, alargado, con longitud de 1.5 mm y un diámetro de 0.5 mm. El huevo de cero días es de color blanco cremoso, con el corión suave, delgado y membranoso. A medida que el huevo se aproxima a la eclosión se torna ligeramente de color amarillo (Lock 1962, Ramírez-Choza 1993).

### **1.2.2 Larva**

La larva recién emergida es de color blanco lechoso. Posteriormente, la cápsula cefálica en pocas horas adquiere una coloración café y el resto del cuerpo un color blanco cremoso. Las larvas en completo desarrollo miden 18 mm y el cuerpo es de textura suave, rugoso y sin patas. El último segmento abdominal es curvado hacia arriba y posee dos proyecciones carnosas conocidas como “urogonfis” (Lock 1962, Ramírez-Choza 1993).

### **1.2.3 Pupa**

En las primeras horas la pupa es de color amarillo-café, después adquiere una coloración café oscuro. Los paquetes alares, patas y pico “rostrum” se pueden ver a los lados y bajo la superficie del cuerpo (Lock 1962, Ramírez-Choza 1993).

### **1.2.4 Adulto**

El adulto mide 15 mm, es de color negro o en algunas ocasiones rojizo, aplanado dorsalmente, las antenas están insertadas en la base del rostrum; el funículo antenal es de seis segmentos, el segundo segmento no es de la misma longitud que el tercero, mientras que el segmento terminal es dos veces más ancho o tan amplio como su longitud; el mazo antenal es compacto con la parte apical

esponjosa y retraída, cóncava, no visible lateralmente. Los élitros están fuertemente esclerizados, estriados y glabros. Las patas protorácicas son ligeramente más largas que las meso y metatorácicas. Los machos tienen una hilera doble de setas tibiales, más largas y más densas que las de la hembra; la protibia con pelos muy largos y abundantes; tarso con el tercer segmento dilatado, bilobulado, liso ventralmente, excepto por una hilera densa, uniforme, de setas erectas de color amarillo a lo largo del borde apical. El abdomen está compuesto de 10 segmentos, aunque ventralmente solo se observan cinco segmentos (esternitos) y dorsalmente solo 8 (terguitos). El resto de los segmentos se encuentran plegados dentro del cuerpo y modificados en los órganos de reproducción (genitalia) (Siller 1985, Booth et al. 1990).

### **1.2.5 Dimorfismo sexual**

Para diferenciar el sexo del picudo del agave, la mejor / única/ confiable, característica se encuentra en la morfología del último segmento abdominal viéndolo ventralmente, ya que en las hembras es puntiagudo y más angosto, y en los machos es romo y más amplio. En el macho la abertura de la genitalia es en forma de media luna para la salida del edeago y en la hembra la abertura es una ranura para la recepción del edeago (Siller 1985, Ramírez-Choza 1993).

### **1.3 Biología**

El periodo de incubación del huevo varía de 3 a 8 días. Al igual, la duración del estado larval, por ejemplo, en el maguey pulquero *A. atrovirens* el picudo requiere de 58 días para completar su desarrollo, mientras que en el sisal *A. sisalana* requieren de 21 a 58 días y en el cultivo de henequén *A. fourcroydes* de 108 días. El estado de prepupa y pupa se completa entre los 3 a 10 días y 12 a 16 días,

respectivamente (Lock 1962, Siller 1985, Ramírez-Choza 1993). Bravo et al. (2009) reportan que el adulto tiene una longevidad de aproximadamente ocho meses.

#### **1.4 Hábitos**

Los adultos se encuentran presentes todos los meses del año en la base de las hojas, raíz principal y dentro de las piñas de las plantas de 5 a 7 años (Halfter 1957, Lock 1962, Ramírez-Choza 1993, Borbolla 1999, González et al. 2007). En plantas con esta edad, la hembra deposita sus huevos en la base de las hojas del cogollo o dentro de las piñas barrenadas. Al presentarse las larvas, éstas barrenan la piña y dejan sus excrementos en los túneles construidos. La larva antes de pupar construye un cocón con tejido fibroso de la piña (Lock 1962, Ramírez-Choza 1993, González et al. 2007). El adulto recién emergido permanece dentro del cocón varios días, posteriormente sale o suele quedarse dentro de la piña (pueden copular en el interior de ésta) por un tiempo, dependiendo de la disponibilidad de tejido apropiado para ovoposición y alimentación (Hill 1983, Solís-Aguilar et al. 2001, González et al. 2007).

#### **1.5 Daños**

El daño directo en el agave es ocasionado por las larvas al barrenar las piñas de más de 5 años (González et al. 2007). Se conoce que este daño favorece la entrada de fitopatógenos como la bacteria *Petobacterium carotovorum* Jones, posible agente causal de la pudrición del cogollo la planta de agave (González et al. 2007).

#### **1.6 Métodos de control**

##### **1.6.1 Biológico**

El cultivo de agave tequilero tiene un ciclo de 6 a 8 años, por lo tanto, es importante conservar los enemigos naturales del picudo del agave. Entre estos

organismos se encuentran los depredadores de larvas como *Hololepta* spp., *Placodes ebeninus* Lewis., *Lioderma yucateca* Marseul y *L. cacti* Marseul. Mientras que en el caso de parasitoides se menciona a *Alienoclypeus insolitus* Shenefelt (Hymenoptera: Braconidae). Para el control de adultos se recomiendan los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium* spp., y los nematodos: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema* spp. (Álvarez 2000, Pacheco 2002, Espinosa et al. 2005, Aquino et al. 2006, Hueso et al. 2006, González et al. 2007).

### **1.6.2 Cultural**

Lock (1962), Solís-Aguilar et al. (2001) y Paniagua (2002) citan que una forma de controlar las poblaciones del picudo es a través de medidas sanitarias como la destrucción de plantas senescentes y tallos con pudrición. Mientras que Arredondo y Espinosa (2005) recomiendan mantener el cultivo libre de malezas, destruir y quemar plantas dañadas, supervisar constantemente el cultivo para detectar la llegada de adultos del picudo y realizar medidas de control a tiempo, además sugieren jimar oportunamente las plantas que alcanzan la madurez fisiológica.

### **1.6.3 Químico**

El control del picudo del agave con insecticidas sintéticos es difícil, ya que las larvas, pupas y los adultos se encuentran en las raíces o dentro de la piña, lo cual dificulta la llegada del producto aplicado hasta los insectos (Pérez 1980). Sin embargo, Pineda (1983) menciona que los insecticidas malatión, endosulfán y carbaryl controlaron a *S. acupunctatus* en maguey pulquero *A. atrovirens* en el Estado de Hidalgo. Mientras que, Solís-Aguilar et al. (2001) recomiendan para el control de larvas tres aplicaciones al suelo de Thimet 15G (forato) a dosis de 10 kg ha<sup>-1</sup>. Este mismo autor recomienda para el control de adultos los productos Gusation

M-20 (azinfos metílico) 2 L ha<sup>-1</sup> y Folidol M-50 (paration metilico) 1 L ha<sup>-1</sup>. Hernández (1999) también recomienda los productos anteriores y además izasofos 5% G y carbofurán 5% G. González (2001) recomienda azinfos metílico, metomilo, carbofurán, endosulfán y lambda cyhalotrina para el control de larvas, pupas y adultos.

#### **1.6.4 Etológico**

El control etológico se basa en el manejo de plagas a partir del conocimiento del comportamiento del insecto. Esto incluye el uso de semioquímicos, trampas con feromona, kairomona, repelentes, alomonas, disuasivos de la alimentación y otras sustancias que modifican el comportamiento del insecto. En el caso del picudo del agave, se ha trapeado con trampas cebadas con feromona de agregación sintética y tejido de agave que actúa como kairomona, todo esto con el objetivo del monitoreo de la población plaga (Blanco 1996, Rojas et al. 2006, Ruiz-Montiel et al. 2008, Bravo 2009).

#### **1.7 Estudios de atrayentes y trapeo del picudo del agave.**

Ruiz-Montiel et al. (2003) reportaron que los compuestos de feromonas 2-metil-4-heptanol y 2-metil-4-octanol producidos por el macho son atractivos a ambos sexos. Valdés-Rodríguez et al. (2004) realizaron experimentos para conocer la respuesta del picudo a extractos obtenidos del henequén y mencionan que los extractos que presentaron mayor capacidad atrayente se caracterizaron por tener los siguientes cinco compuestos en común: 4 etil cumeno, p-metoxi-etil-benceno, 1-metil-4-(1-metiletil) ciclohexanol, p-menta 1,5-dien-8-ol y butirofenona. Valdés et al. (2005) efectuaron estudios de trapeo de *S. acupunctatus* en el cultivo de nardo donde evaluaron dos trampas, una comercial “trampa Víctor” y una artesanal denominada “Trampa Funnel”, y como atrayentes incluyeron el maguey fermentado

y piña madura. Los resultados indican que la trampa más efectiva fue la “trampa Víctor” y el maguey fermentado atrajo un mayor número de picudos que la piña. Espinosa et al. (2005) al estudiar varias especies de agaves como atrayentes para el picudo, concluyeron que el agave espadín *Agave angustifolia* Haw., arroqueño *A. americana* L. y tepeztate *A. marmorata* Roezl fueron los que atrajeron mayor número de picudos.

### **1.8. Ecología química del picudo del agave.**

El macho libera una feromona que está conformada por el 2-metil-4-heptanol, 2-metil-octanol, 2-metil-4-heptanona y 2-metil-octanona (Ruiz-Montiel et al. 2008). En campo ambos sexos responden a todos los compuestos. Sin embargo, la mezcla binaria conformada con el 2-metil-4-heptanona y 2-metil-octanona es la más atractiva para el picudo del agave (Ruiz-Montiel et al. 2008). En el proceso de producción de la feromona del picudo del agave se han observado factores que interfieren de manera negativa. Ruíz-Montiel et al. (2009) determinaron que el tipo de alimentación y la edad de los adultos juegan un papel importante en la producción de la feromona.

El picudo del agave también responde al material vegetal dañado o sano de la planta de agave tequilero y henequén (Ramírez-Choza et al. 1993, Espinosa et al. 2005, Altazur et al. 2007, Rangel-Rayes 2007). También al agave mezcalero en estado fermentado y a la piña madura (Valdés et al. 2005).

En el material vegetal atractivo para el picudo del agave se han identificado volátiles; algunos de éstos se han evaluado en el laboratorio. Valdés-Rodríguez et al. (2004) identificaron cinco compuestos del henequén: 4-etil cumeno, p-metoxi-etil-benceno, 1-metil-4-(1-metil etil)-ciclohexanol, p-menta-1-5-dien-8-ol y butirofenona. Rangel-Reyes (2007) determinó que los adultos del picudo del agave

fueron más atraídos por la base de la hoja del cultivo de agave tequilero, identificando en esta parte de la planta 11 compuestos volátiles, de los cuales el limoneno, el linalol y el 3-careno fueron atractivos al picudo del agave en el laboratorio. Rangel-Reyes (2007) y Altazur et al. (2007) comprobaron que ambos sexos del picudo del agave son atraídos por el o-xylene,  $\alpha$ -pinene, 3-carene,  $\gamma$ -terpinene y linalool a dosis de 1 a 10  $\mu\text{g}$ . Mientras que ambos sexos a dosis de 100  $\mu\text{g}$  del linalool fueron repelidos.

## LITERATURA CITADA

- Altuzar, A., E. A. Malo, H. González-Hernández, and J. C. Rojas. 2007. Electrophysiological and behavioural responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col., Curculionidae) to *Agave tequilana* volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 121-127.
- Álvarez M. J. C. 2000. Patogenicidad comparada de los hongos *Verticillium* spp y *Beauveria* spp., en el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Aquino B. T., J. Ruiz V. y M. Iparraguirre C. 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal) con nematodos y entomopatógenos en Agave en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola.* 6:92-101
- Arellano C. P. 2008. Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a la pudrición del cogollo en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de Maestría. Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 95 pp.
- Barrios A. A., R. Ariza F., J. M. Molina M., H. Espinosa P. y E. Bravo M. 2006. Manejo de la fertilización en magueyes cultivados (*Agave* spp.) de Guerrero. Iguala, Guerrero. México. INIFAP. Campo Experimental Iguala. Folleto Técnico No.13. México. 44 pp.
- Blanco M. H. 1996. Los semioquímicos y su papel en el manejo integrado de plagas. En: *Memorias X Congreso Nacional Agronómico.* Universidad de Costa Rica. pp: 93-95.
- Boot R. G., M.L. Cox and R. B. Madge. 1990. *Coleoptera.* International Institute of Entomology (an Institute of CAB International). Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Borbolla P. A. 1999. Comportamiento de adultos del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal en la búsqueda del hospedero. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 56 pp.
- Bravo P. D. 2009. Evaluación de tipos de trampas con feromona de agregación sintética Tequilur® en el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus*

- Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) en Amatitán, Jalisco. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 59 pp.
- Camino, L. M., V. C. Figueroa, L. Aldana, and M. E. Valdés. 2002. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, México. Fla. Entomol. 85: 392-393.
- CRT (Consejo Regulador del Tequila). 2009. Innovación y desarrollo tecnológico para el crecimiento sustentable de la cadena productiva Agave-Tequila seminario internacional sobre indicaciones geográficas. Noviembre 5-6, 2009 Zapopan, Jalisco, Méx. Disponible en: <http://www.crt.org.mx>. Consulta 20 de Abril del 2010.
- Espinosa P. H., E. Bravo M., P. López L. y C. Arredondo V. 2005. El Agave mezcalero de Oaxaca: Avances de investigación. INIFAP. Libro técnico No.3. México. 180 pp.
- Fucikovsky Z. L. 2002. Agave (*Agave atrovirens* Karw., *A. tequilana* Weber var. azul, *A. angustifolia* Haw. and other species). p: 103-107. En: Diseases of some tropical and subtropical plants caused by bacteria, phytoplasmas and spiroplasmas. University of Guadalajara and Colegio de Postgraduados.
- González D. J. C. 2001. Evaluación de insecticidas para el control del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyll. en Tala Jalisco, México. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 58 pp.
- González P. O. 2007. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleóptera: Curculionidae) y su asociación con la pudrición de cogollo del agave tequilero. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 43 pp.
- Halffter G. 1957. Plagas que afectan a las distintas especies de agave cultivadas en México. Dirección General de la Defensa Agrícola. SAG. 135 pp.
- Hernández G. E. 1999. Control químico del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyll.) en Amatitán, Jalisco. Tesis profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 47pp.
- Hill, D. S. 1983. Agricultural insect pests of the tropics and their Control. Cambridge University Press, New York.

- Hueso G. E. J., J. Fallad C., M.P. Rosales A., J. Molina O. y M. López L. 2006. Evaluación de nematodos entomopatógenos para el control de larvas de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). pp:464-468. En: Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima. Noviembre, 2006.
- Lock, G. W. 1962. Sisal. Twenty-five years' sisal research. Spottiswoode, Ballantyne and Co., Ltd., London, UK.
- Pacheco S. C. 2002. Efectividad biológica de los entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor., sobre el picudo del agave tequilero *Scyphophorus acupunctatus* Gyll. en Atotonilco, Jalisco. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 53 pp.
- Paniagua V. H. A. 2002. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal y su relación con la bacteria *Erwinia* sp. en plantas de *Agave tequilana* Weber en Jalisco, México. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 51pp.
- Pérez S. P. 1980. Principales problemas fitosanitarios del maguey pulquero (*Agave atrovirens* Karw.) en la Mesa Central de México. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 61 pp.
- Pineda, M. G. 1983. Control químico de plagas y enfermedades más comunes del maguey pulquero *Agave atrovirens* karw. Tesis de Licenciatura U.A.Ch., Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México.
- Ramírez-Choza, J. L. 1993. Max del henequén *Scyphophorus interstitialis* Gylh. Bioecología y control. Serie: Libro Técnico. Centro de Investigación Regional del Sureste. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos. Mérida, Yucatán, México.
- Rangel-Reyes, D. N. 2007. Atracción de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) a algunos volátiles del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Rojas J. C., H. González H., C. Ruiz M., D. N. Rangel R., E. I. Ceja., G. García C. y I. Del Real L. 2006. Optimización de un sistema de monitoreo/trampeo masivo

- para el manejo del picudo del agave, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal. pp: 51-58. En: Simposio sobre trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de plagas de importancia económica. J. F. Barrera y P. Montoya (eds.). Sociedad Mexicana de Entomología y El Colegio de la Frontera Sur.
- Rubio C., R. 2007. Enfermedades del cultivo de agave. pp:169-195. En: Conocimiento y practicas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en zona de Denominación de Origen de Tequila. J. F. Pérez D. y J. I. Del Real L. (eds.). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de investigación Regional del Pacifico Centro.
- Ruiz M., C., H. González H., J. Leyva, C. Llanderal C., L. Cruz L. and J. C. Rojas. 2003. Evidence for a male-produced aggregation pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 96: 1126-1131.
- Ruiz-Montiel, C., G. García-Coapio, J. C. Rojas, E. A. Malo, L. Cruz-López, I. del Real, and H. González-Hernández. 2008. Aggregation pheromone of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). Entomol. Exp. Appl. 127: 207-217.
- Ruiz-Montiel, C., J. C. Rojas, L. Cruz-López, and H. González-Hernández. 2009. Factors affecting pheromone release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). Environ. Entomol. 38: 1423-1428.
- SAGARPA (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) 2010. Disponible en <http://www.sagarpa.org.mx>. Consulta:
- Servín R., A. Tejas, M. Arce M. y M. L. Robert. 2006. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) como potencial insecto plaga de *Yucca valida* Brandegees en Baja California Sur, México. Folia Entomol. Mex. 45:1-7.
- Siller, J. M. G. 1985. Ciclo biológico del picudo del maguey *S. acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) y algunas consideraciones sobre su impacto económico. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. D.F.
- Solís-Aguilar, J. F., H. Hernández González, J. L. Leyva Vázquez., A. Equihua Martínez, F. J. Flores Mendoza, and A. Martínez Garza. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, a agave tequilero pest in Jalisco, México. Agrociencia 35: 663-670.
- Valdés, M. E., L. Aldana, B. R. Figueroa, O. M. Gutiérrez, R. M. C. Hernández, and M. T. Chavela. 2005. Trapping of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera:

- Curculionidae) with two natural baits in a field of *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in the State of Morelos, Mexico. Fla. Entomol. 88: 334-338.
- Valdés-Rodríguez, S., J. L. Ramírez-Choza, J. Reyes-López, and A. Blanco-Labra. 2004. Respuesta del insecto max (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) hacia algunos compuestos atrayentes del henequén. Acta Zool. Mex. 20: 157-166.
- Virgen C., G. 2004. Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. azul. pp: 95-145. En: Avances de la Investigación en el Agave Tequilero. Editorial Ágata. Guadalajara, Jalisco, México.

## CAPÍTULO 2

### FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DEL PICUDO DEL AGAVE *Scyphophorus acupunctatus* AL COMPUESTO PRINCIPAL DE SU FEROMONA DE AGREGACIÓN

#### RESUMEN

Para el monitoreo y control de *Scyphophorus acupunctatus*, el compuesto sintético 2-metil-4-octanona es una opción, pero es necesario el conocimiento de los factores involucrados en la respuesta del picudo a este compuesto. Por lo tanto, mediante electroantenografía, bioensayos de olfatómetro y análisis de la región mitocondrial COI se determinó el efecto del sexo, la edad y la estructura genética en la respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona. Se demostró que la respuesta electrofisiológica y de comportamiento del picudo del agave al 2-metil-4-octanona no es igual entre las poblaciones de insectos procedentes de diferentes cultivos y regiones geográficas. Así mismo, se observó que en ambas respuestas de *S. acupunctatus* interviene la edad y los cambios genéticos presentes en el ADN mitocondrial. Esta información puede ser útil como línea base para diseñar un método de control del picudo del agave por región geográfica y tipo de hospedero.

**Palabras clave:** Semioquímicos, *Scyphophorus*, electroantenografía, respuesta de comportamiento.

## ABSTRACT

The agave weevil *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal causes economic damage in *Agave tequilana* F.A.C Weber var. Blue, *A. fourcroydes* Lem., *A. angustifolia* Haw and *Polianthes tuberosa* L.. Synthetic insecticides as control have been restricted due to their risk to human health. Currently, the use of semiochemicals has increased, and in particular, the synthetic compound 2-methyl-4-octanone is used to monitor *S. acupunctatus*. In the present study, we investigated the effect of sex, age and genetic structure in the electrophysiological response and search behavior of *S. acupunctatus* to 2-methyl-4-octanone using electroantennography and olfactometer bioassays, and analysis of the COI mitochondrial region. We show that the electrophysiological and behavioral response of the agave weevil to 2-methyl-4-octanone differs among the populations of insects from different crops and geographic regions. This suggests that in both responses of *S. acupunctatus* age of insects and the genetic changes in mitochondrial DNA are involved. This information provides a baseline to design a control method of the agave weevil by geographic region and type of host.

**Key words:** Semiochemicals, *Scyphophorus*, electroantennography, electrophysiological response.

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Para controlar a *Scyphophorus acupunctatus* se ha recurrido al uso de insecticidas sintéticos, sin embargo, estos productos no han sido exitosos debido a que tanto larvas como adultos se alojan dentro de la piña agave, donde difícilmente son afectados (Valdés-Rodríguez et al. 2004, Terán-Vargas et al. 2012). Aunado a esto, el uso de la piña como materia prima en la obtención del tequila ha restringido los plaguicidas, ya que por su acumulación, la salud humana está en riesgo constante (Solís-Aguilar et al. 2001); por tal motivo, se han buscado nuevas opciones de control. Actualmente los semioquímicos como kairomonas, alomonas y feromonas han generado buenos resultados en la detección, monitoreo y control de insectos plaga pertenecientes a la familia Curculionidae (Tumlinson et al. 1969, Budenberg et al. 1993, Rochat et al. 2000, Tafoya et al. 2007). En el caso del picudo del agave, Ruiz-Montiel et al. (2008) reportaron que este insecto produce una feromona de agregación formada por dos alcoholes y dos cetonas, en la cual el 2-metil-4-octanona es el compuesto principal. En campo, con el uso de este compuesto sintético se ha logrado el trapeo a *S. acupunctatus* (Ruiz-Montiel et al. 2008). Sin embargo, la efectividad de este compuesto sintético es baja y más aún cuando se usa sin un atrayente alimenticio como la cabeza de la planta de agave (Ruiz-Montiel et al. 2008). En otras especies de picudos, la edad, el sexo, el tipo de hospedero y los cambios genéticos juegan un papel importante tanto en la producción como en la respuesta a la feromona (Giblin-Davis et al. 2000). En el picudo del agave se ha observado que el tipo de alimentación y la edad de los adultos están correlacionados con la producción de la feromona (Ruiz-Montiel et al. 2008, 2009). No se tienen reportes del efecto de los factores antes mencionados en

el comportamiento de respuesta en este insecto, por lo que es necesario un mayor conocimiento de los factores involucrados en la comunicación química de *S. acupunctatus*. En la presente investigación se determinó la participación del sexo, de la edad y de la estructura genética en la respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Insectos.

Se colectaron larvas y adultos de *S. acupunctatus* en plantas dañadas de *A. tequilana* F.A.C. Weber var. Azul, *A. angustifolia* Haw y *P. tuberosa* L. en los estados de Tamaulipas, Jalisco, Guerrero y Morelos, en México. Los insectos encontrados se confinaron en jaulas entomológicas (30 cm altura y 10 cm de diámetro). Los adultos se clasificaron por sexo con base en los caracteres taxonómicos de esta especie descritos por Ramírez-Chozá (1993), que incluyen al último segmento abdominal en vista ventral y la abertura de la genitalia. El último segmento en la hembra es angosto y puntiagudo, mientras que el del macho es truncado y romo. La abertura de la genitalia en el macho presenta forma de media luna, mientras que en la hembra es en forma de ranura.

Los insectos se confinaron de manera individual en recipientes de plástico (10 cm altura y 1.5 cm de diámetro) y se mantuvieron a  $24 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10$  % de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12. Un día después los insectos fueron utilizados en los bioensayos.

Las larvas se mantuvieron en recipientes de plástico (30 cm altura y 10 cm de diámetro) y se alimentaron con el hospedero de donde se recolectaron. El alimento

se retiró cuando las larvas puparon. Al emerger los adultos se clasificaron por sexo y se utilizaron en los bioensayos descritos a continuación.

### **2.2.2 Compuesto 2-metil-4-octanona.**

El compuesto se obtuvo de Sigma-Aldrich (Toluca, México) con una pureza mayor de 95%, la cual se confirmó por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MSD) en el Laboratorio de Ecología Química de Insectos del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, estado de México.

### **2.2.3 Electroantenograma (EAG).**

La respuesta electrofisiológica de hembras y machos de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona fue determinada mediante el EAG. Para efectuar los ensayos, de cada región geográfica (Jalisco, Tamaulipas, Guerrero y Morelos) se seleccionaron al azar 120 adultos (60 machos y 60 hembras) recolectados en campo y 120 adultos (60 machos y 60 hembras) con ocho días de edad, los cuales emergieron de las larvas criadas en el laboratorio.

El ensayo de EAG consistió en desprender la antena y asentarla en el electrodo de lectura (Spectra 360<sup>®</sup>, Parker, Orange, New Jersey). El electrodo se introdujo en un amplificador Spectra 360<sup>®</sup>, y enseguida se aplicaron 10 µg µL<sup>-1</sup> del 2-metil-4-octanona sobre una pieza de papel filtro (0.5 x 3.0 cm, Whatman, No. 1). Después de 20 segundos, la pieza de papel se insertó en una pipeta Pasteur, cuya base se conectó a la manguera del controlador de flujo de aire (CS-05 Syntech, Parker, Orange, New Jersey), mientras que la punta de la misma se introdujo en un orificio localizado en el punto medio de un tubo de vidrio por el cual fluía constantemente aire húmedo a 0.5 litros/segundo en dirección a la antena del insecto. Un estímulo de aire (1 s/min), generado por el controlador CS-05 Syntech, fue aplicado para arrastrar al compuesto 2-metil-4-octanona de la pieza de papel

hacia la antena del insecto. Como testigo, se consideró una pipeta Pasteur con una pieza de papel filtro cargado con 1  $\mu\text{L}$  de hexano, ya que el compuesto sintético se diluyó con este solvente.

#### **2.2.4 Bioensayo de olfatómetro.**

Un tubo en forma de “Y” conocido como olfatómetro se utilizó para determinar la respuesta de hembras y machos de *S. acupunctatus* al compuesto 2-metil-4-octanona. La base del olfatómetro fue de 2.5 cm de diámetro. La base y los dos brazos del olfatómetro de 15 cm de largo. Cada brazo fue conectado a un contenedor de fuente de olor (recipientes de vidrio de 4.5 cm de diámetro y 15 cm de largo), y ambos recipientes de vidrio a un flujómetro (Gilmont Instruments, Barnant Co., Barrigto, IL), para desembocar en una sola entrada a una bomba que emitía un flujo de 0.2 litros/segundo a cada brazo del tubo.

En uno de los recipientes de vidrio se colocó una pieza de papel filtro (0.5 x 3.0 cm, Whatman, N0. 1) con 10  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  del 2-metil-4-octanona y en el otro recipiente una pieza de papel filtro con 1  $\mu\text{L}$  de hexano como testigo.

Un adulto colectado en campo se confinó en la base del tubo y se le dieron cinco minutos para seleccionar una de las dos vías del olfatómetro. La respuesta al 2-metil-4-octanona o al testigo se consideró cuando el insecto rebasó o se mantuvo por 20 segundos en la línea de elección (4 cm después de la división de la base del tubo). Los insectos que mostraron atracción por los olores durante cinco minutos, pero que no rebasaban o se mantenían en la línea de elección se consideraron como insectos sin respuesta. La respuesta de 100 adultos por región geográfica fue determinada, a cada adulto se le consideró como una repetición. Después de 10 repeticiones, el olfatómetro y los recipientes de vidrio se lavaron con detergente y

luego se enjuagaron con acetona más agua destilada, así también se expusieron a 120°C por 40 minutos.

Los bioensayos se desarrollaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y 70-80 % de humedad relativa. Con los resultados de los insectos que respondieron y aquellos sin respuesta se determinó la actividad y preferencia de los picudos a las fuentes de olor mediante la ecuación descrita por Presuna et al. (2008). La actividad se consideró como el número de insectos que mostraron movimientos en el olfatómetro (hacia el brazo derecho o izquierdo), comparado con los insectos que no respondieron (no mostraron movimiento hacia ninguno de los dos brazos). La preferencia se estimó como el número de insectos que eligieron uno u otro brazo del olfatómetro.

#### **2.2.5 Análisis de los datos de conducta.**

Para determinar el efecto del sexo y edad en la respuesta electrofisiológica determinada en el EAG, las respuestas de todos los picudos por población fueron comparadas mediante un análisis de dos vías (ANOVA), seguido por una prueba de Tukey HDS. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, fueron estabilizados usando la transformación  $\log(y-1)$  antes de analizarlos. La actividad, preferencia de elección y respuesta al compuesto sintético obtenida en el olfatómetro se compararon entre poblaciones mediante el diseño estadístico no paramétrico Kruskal Wallis, con una probabilidad de  $\alpha = 0.05$ . La preferencia de los adultos por el compuesto sintético o testigo se determinó por población con la prueba de Mann Whitney U. Todos los análisis se realizaron utilizando SAS ver. 9.1 (SAS-Institute 2004).

### 2.2.6 Comparación genética del picudo del agave *S. acupunctatus*.

El ADN se extrajo del tórax de doce adultos de *S. acupunctatus* que se colectaron en cuatro diferentes regiones geográficas (Jalisco, Tamaulipas, Guerrero y Morelos) utilizando el método CTAB (Möller et al. 1992). El gen COI mitocondrial se amplificó con los iniciadores universales CI-J-1718 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' y TL2-N-3014 5'-TAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA-3' (Simons et al. 1994), los cuales amplifican ~1157 pares de bases (bp). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL, con 2.0 µL de ADN mitocondrial, 5.0 µL de 5X PCR buffer, 3.0 µL dNTPs, 3.5 µL MgCl<sub>2</sub>, 1.0 µL de cada iniciador y 0.25 µL de la enzima Taq polimerasa (Promega). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de temperatura de desnaturalización a 94 °C por 1 min, el alineamiento a 50 °C por 45 s, una extensión final a 72 °C por 1 min y un ciclo de amplificación a 72 °C por 5 min. El proceso de PCR se realizó en un termociclador automático (Biometra Tpersonal Termocycle, Gottingen, Germany). Los productos amplificados se enviaron a MacroGen (MacroGenInc, Seoul, Korea) para su purificación y secuenciación.

Las secuencias (894 bp, número de acceso= JX134898-4909) fueron revisadas y ensambladas con el programa Geneious Pro versión 4.6.5 (Biomatters, Auckland, New Zealand), posteriormente alineadas con Clustal W versión 1.8.1 (Thompson et al. 1994). La lectura correspondiente a 385 aminoácidos se realizó con el programa MEGA ver.4.0.5 (Tamura et al. 2011). La reconstrucción filogenética de *S. acupunctatus* de la región mitocondrial COI se realizó a partir de la matriz de Distancia-P (proporción de diferencias de nucleótidos detectadas entre dos secuencias alineadas), usando el método Neighbor-Joining (NJ) y Tamura-Nei

(Tamura y Nei 1993). Ambos métodos fueron corridos con un bootstrap a 500 repeticiones (Felsenstein 1985). Las secuencias de *Scyphophorus yuccae* (número de acceso = AY131110.3) y *Sphenophorus striatopunctatus* (AY131106.1) se incluyeron como grupos externos. El programa DnaSP versión 5.10 (Librado y Rozas 2009) se usó para calcular el número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) (Nei 1987), número de posiciones polimórficas (S) y el número medio de diferencias nucleotídicas (K) entre cada par de secuencias (Tajima 1989).

### 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las poblaciones la edad y la interacción sexo y edad influyen en la respuesta electrofisiológica de *S. acupunctatus* (Cuadro 2). En general, las antenas de las hembras y machos recolectados en *A. tequilana* var. Azul, *A. angustifolia* y *P. tuberosa* mostraron mayor sensibilidad a los  $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  del compuesto sintético 2-metil-4-octanona, comparado con la sensibilidad de las antenas de los adultos con 8 días de edad criados en el laboratorio.

Al igual que el resultado de respuesta electrofisiológica, el comportamiento de *S. acupunctatus* no mostró dimorfismo sexual, es decir, ambos sexos fueron atraídos por los  $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de 2-metil-4-octanona.

Por otro lado, el análisis de la actividad mostró diferencias entre poblaciones de insectos (Figura 3a). Los insectos colectados en *A. tequilana* var. Azul, en Jalisco y Tamaulipas, e insectos procedentes del cultivo de *A. angustifolia*, en Guerrero, exhibieron mayor actividad al liberarse en la base del olfatómetro, en comparación con los insectos procedentes de *P. tuberosa* de Morelos. En el análisis de preferencia, los insectos recolectados en Jalisco manifestaron mayor preferencia o capacidad para elegir una de las dos fuentes de olor (2-metil-4-octanona vs testigo),

seguidos por los adultos de Guerrero, Tamaulipas y Morelos, respectivamente (Figura 3b). Todas las poblaciones de insectos respondieron en mayor porcentaje al 2-metil-4-octanona que al testigo (Figura 4). Sin embargo, los insectos recolectados en Jalisco, Tamaulipas y Guerrero expresaron mayor respuesta al 2-metil-4-octanona en comparación con los insectos procedentes de Morelos (Figura 5).

El análisis de las secuencias del gen COI señala que existe variación dentro y entre las poblaciones de insectos. La variación total de nucleótidos y aminoácidos fue de 25 y 14, respectivamente, mientras que la variación dentro de las poblaciones fue de 24 nucleótidos y 13 aminoácidos en Tamaulipas, 15 y 6 en Jalisco, 1 y 0 en Morelos y Guerrero no presentó variación. Así mismo, se determinó que la población de Tamaulipas y Jalisco fueron más variantes en el promedio de diferencias nucleotídicas y en la diversidad nucleotídica (Cuadro 3). Por otro lado, en total se observaron tres haplotipos. Estos permitieron diferenciar a dos grupos filogenéticos (Figura 6). El Grupo I se conformó por insectos procedentes de las cuatro zonas geográficas, mientras que el Grupo II lo conformaron los insectos procedentes de Jalisco y Tamaulipas. El Grupo I se separó del Grupo II por presentar seis cambios en los aminoácidos de tipo no sinónimos: Val-Phe, Ser-Trp, Trp-Ala, Gly-Trp, Ser-Phe y Lys-Ile, respectivamente.

Ruiz-Montiel et al. 2008 con experimentos establecidos en campo demostraron que las hembras de *S. acupunctatus* son más atraídas que los machos por el 2-metil-4-octanona. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos en laboratorio indican que en las cuatro poblaciones de *S. acupunctatus* el sexo del insecto no influye en la respuesta electrofisiológica de sus antenas ni en el comportamiento de búsqueda de los adultos al 2-metil-4-octanona. Sin embargo, se observó diferencia en ambas respuestas entre poblaciones de insectos. En campo, *S. acupunctatus* responden

en mayor porcentaje al sinergismo que se genera entre el 2-metil-4-octanona y la mezcla de volátiles liberados por el material vegetal (trozos de piña de agave) usado en las trampas que a su feromona de agregación (Ruiz-Montiel et al. 2003, 2008). Esto sugiere que la diferencia de respuesta de *S. acupunctatus* por el 2-metil-4-octanona determinada en la presente investigación podría estar relacionada a los volátiles que liberan las plantas de *A. angustifolia*, *A. tequilana* var. Azul y *P. tuberosa*, lo que se ha observado en otros insectos. Beran et al. (2011) demostraron que *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae) produce una feromona de agregación a la que ambos sexos responden en mayor porcentaje si los volátiles de su planta hospedera se encuentran presentes. Mientras que Varela et al. (2011) observaron que *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) manifiesta mayor respuesta a su feromona sexual cuando la feromona se acompaña con una mezcla de compuestos obtenidos de la planta hospedera de este insecto.

Por otro lado, en los ensayos de EAG las antenas de los adultos recolectados en campo mostraron mayor sensibilidad al 2-metil-4-octanona. Se ha observado que la diferencia en respuesta puede ser por la falta de desarrollo de neuronas olfativas presentes en las antenas del insecto de menor madurez sexual (Addesso et al. 2009). Los insectos con cero días de edad responden a una amplia variedad de compuestos, mientras que los que obtienen madurez fisiológica responden a volátiles específicos como los olores de su feromona o cultivo hospedante (Wong et al. 1991, Addesso et al. 2009). La edad en el caso de los adultos de *S. acupunctatus* juega un papel importante, ya que afecta la oviposición, la viabilidad de los huevos (Hernández et al. 2006) y la producción de la feromona (Ruíz-Montiel et al. 2009). Los machos jóvenes (1 mes) de *S. acupunctatus* liberan menos feromona que los machos adultos (Ruíz-Montiel et al. 2009). Lo anterior y nuestros resultados,

demuestran que la edad es un factor que interviene en el comportamiento de respuesta y en la producción de la feromona de *S. acupunctatus*.

En cuanto a la diversidad genética, se observaron polimorfismos en nucleótidos y aminoácidos en los insectos recolectados en Jalisco, Tamaulipas, Morelos y Guerrero. El mayor grado de polimorfismo genético se observó en las poblaciones provenientes de Tamaulipas y Jalisco, comparado con los insectos de Morelos y Guerrero. Estos cambios genéticos se correlacionan con la respuesta electrofisiológica y en el comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona, ya que estas poblaciones respondieron diferente al compuesto sintético. Se han observado que los cambios génicos en la región COI se correlacionan con el cambio de la feromona en insectos pertenecientes a la familia Curculionidae (El-Sayed et al. 2003, Geiler y Harrison 2010). Por ejemplo, Gablin-Davis et al. (2000) encontraron una correlación entre 5.5 % de variación en el ADN mitocondrial y la producción de nuevos compuestos de la feromona de *Rhabdoscelus obscurus* (Coleoptera: Curculionidae).

Los patrones de variación de *S. acupunctatus* sugieren que las poblaciones han divergido lo suficiente como para observar un impacto en la preferencia del hospedero a nivel de comportamiento. Sería interesante explorar la asociación de la variación de respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona a los receptores de olores (familia de OR) y a las deltas proteínas (desaturasas), ya que se conoce su participación directa en la discriminación de moléculas de olores (feromona vs volátiles de las plantas) y en la formación de los compuestos de la feromona de agregación en la familia Curculionidae, y en otras familias de insectos (Kendra et al. 2005, Geiler y Harrison 2010, Sookoian et al. 2011). En principio, esperaríamos que las diferencias en las

desaturasas y en los receptores concordaran con los patrones de diferenciación genética y de comportamiento descritos aquí. Estudios sobre la participación de estos indicadores en la respuesta del picudo del agave al 2-metil-4-octanona y a compuestos específicos liberados por *A. angustifolia*, *A. tequilana* var. Azul y *P. tuberosa* ayudarán a entender mejor la ecología química de este insecto plaga.

En conclusión, este estudio muestra que la respuesta de la preferencia al 2-metil-4-octanona en los adultos de *S. acupunctatus* es distinta entre poblaciones de diferentes regiones geográficas. y que está correlacionada con la edad, tipo de hospedero y a patrones de variabilidad genética presente en el ADN mitocondrial de este insecto.

**Cuadro 1.** Análisis de varianza del efecto del sexo, edad y la interacción entre sexo y edad en la respuesta electrofisiológica de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona.

<b>Estados</b>	<b>Fuentes de variación</b>	<b>F-valor</b>	<b>(<i>P</i> &lt; 0.05)</b>
Jalisco	sexo	0.00	0.75
	edad	4092.02	<.0001
	sexo*edad	1364.00	<.0001
Tamaulipas	sexo	0.58	0.44
	edad	1770.91	<.0001
	sexo*edad	0.18	<.0001
Guerrero	sexo	0.00	0.64
	edad	8.92	<.0001
	sexo*edad	226.82	<.0001
Morelos	sexo	0.01	0.05
	edad	3.12	<.0001
	sexo*edad	48.34	<.0001

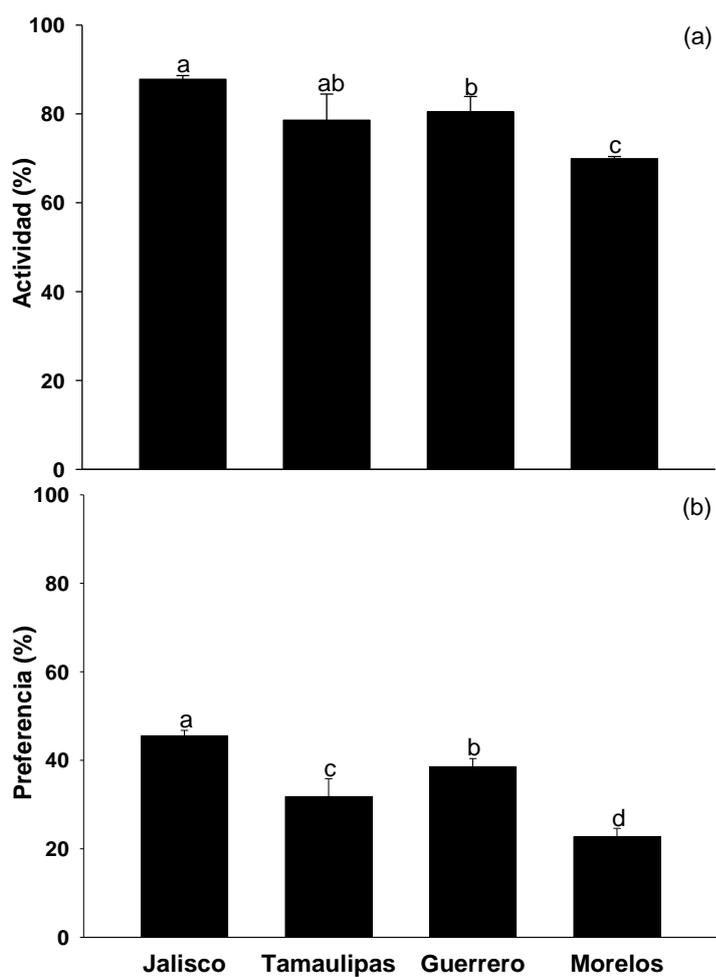
**Cuadro 2.** Resumen estadístico de las secuencias COI de *S. acupunctatus*.

Población	n	h	Hd	S	K	$\pi$
Jalisco	3	2	0.6670	15	10	0.0178
Tamaulipas	3	2	0.6670	24	16	0.0098
Guerrero	3	1	0.0000	0	0.0	0.0000
Morelos	3	2	0.6670	1	0.6667	0.0007
<i>Total</i>	15	3	2.0010	25	26.667	0.0284

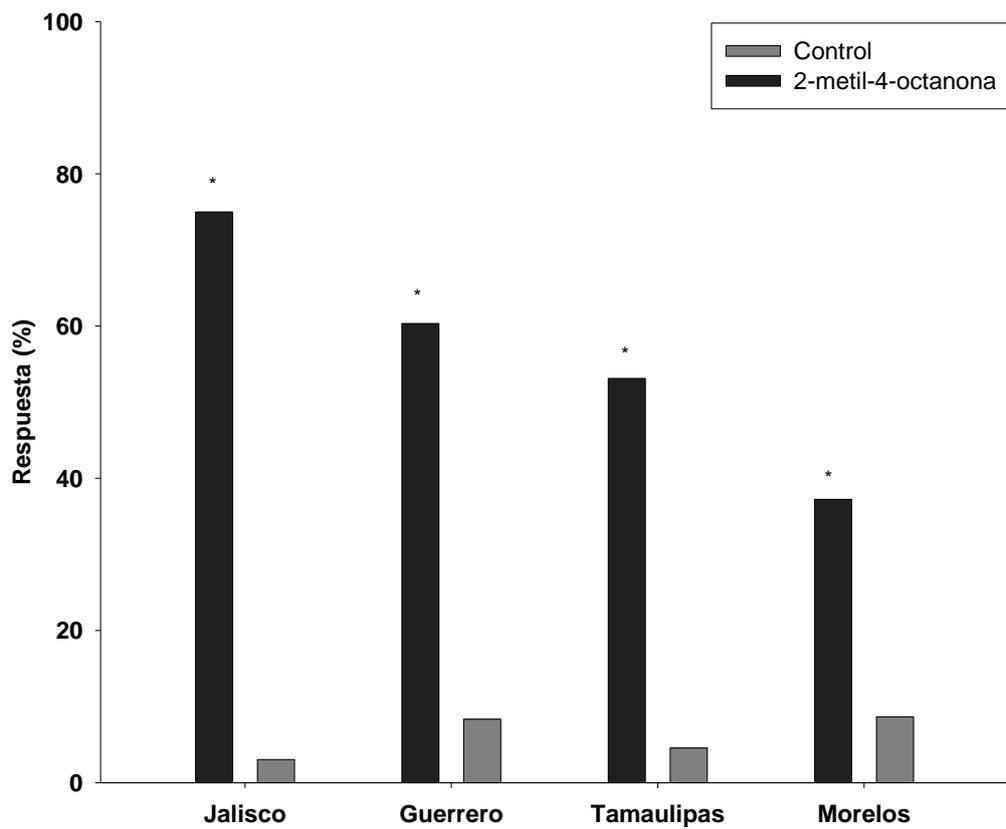
n = número de muestras, h = número de haplotipos, Hd= diversidad haplotípica,

S= número de sitios variables, K= promedio de diferencias nucleotídicas,

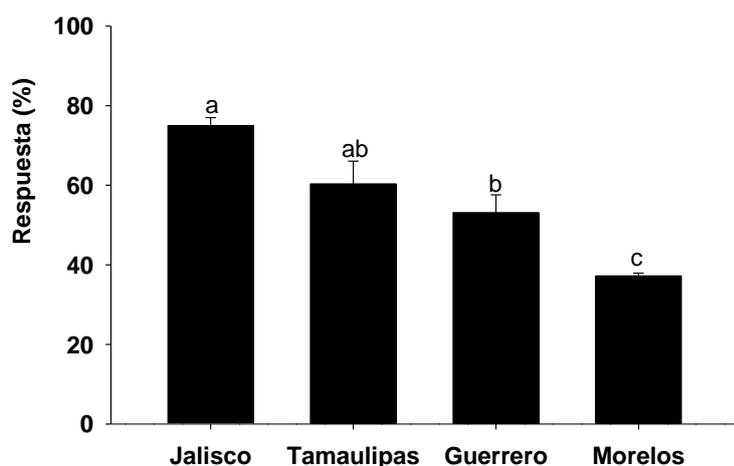
$\pi$ = diversidad nucleotídica.



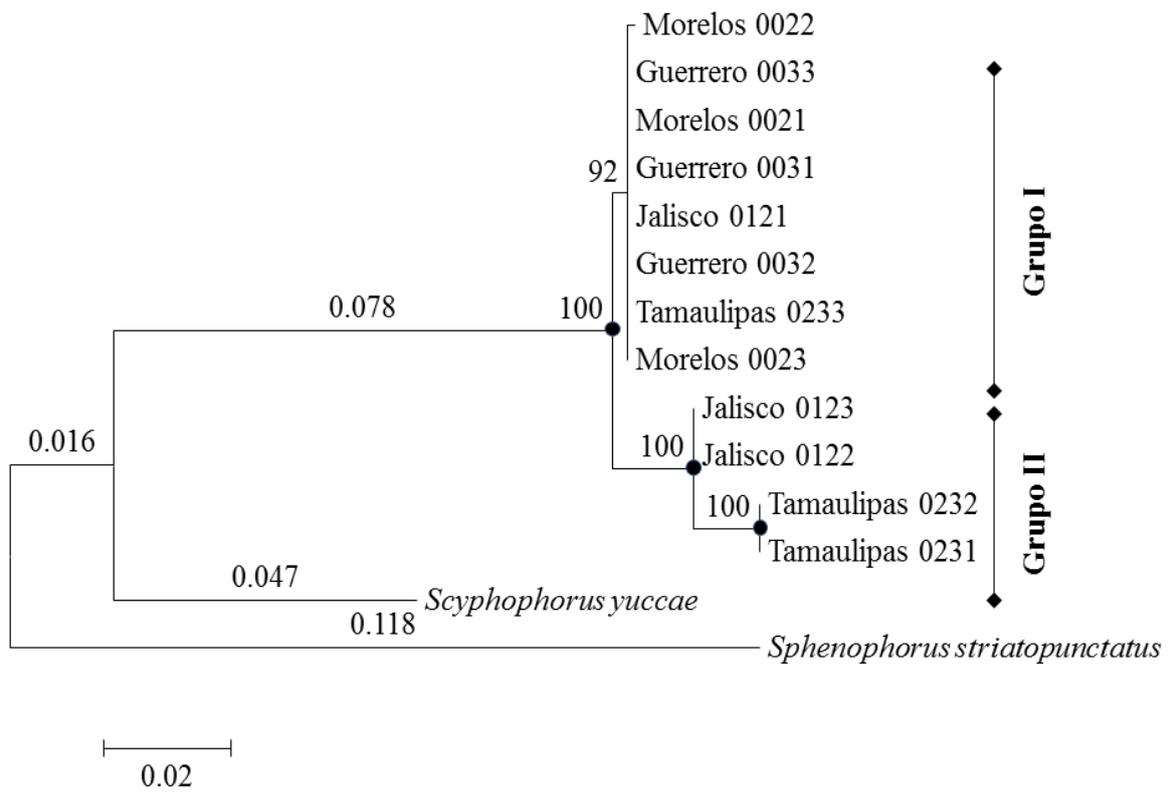
**Figura 1.** Resultado de actividad (a) y preferencia (b) de elección de *Scyphophorus acupunctatus* en el olfatómetro. Debido a que no se observaron diferencias entre sexos, los datos de ambos sexos se combinaron en estas figuras. Las barras verticales sobre las columnas representan el error estándar de la media. La diferencia estadística es indicada por diferente letra (Kruskal Wallis, Bonferroni,  $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Resultado del bioensayo de comportamiento de *Scyphophorus acupunctatus* obtenido en el olfatómetro. La respuesta de machos y hembras no fue diferente. Los datos se combinaron para el análisis; el porcentaje de la respuesta de *S. acupunctatus* al 2-metil-4-octanona vs testigo se comparó usando la prueba de Mann-Whitney U (\*  $P < 0.05$ ).



**Figura 3.** Comparación del porcentaje de respuesta al 2-meti-4-octanona entre poblaciones de insectos recolectados en diferentes regiones geográficas. La respuesta de los machos y las hembras no fue diferente, debido a esto los datos se combinaron para el análisis, las barras verticales sobre las columnas representan el error estándar de la media, la diferencia significativa es indicada por diferentes letras (Kruskal Wallis, Bonferroni,  $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Árbol basado en Neighbor-Joining de COI en *S. Acupunctatus*. El valor sobre los brazos represente a la distancia genética, mientras que el valor sobre los entrenodos de los brazos soporta el clade calculado con 500 replicaciones bootstrap.

## 2.4 LITERATURA CITADA

- Addesso, K. M. and H. J. McAuslane. 2009. Pepper weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38:216-224.
- Beran, F., I. Mewis, R. Srinivasan, J. Svoboda, C. Vial, H. Mosimann, W. Boland, C. ttner, C. Ulrichs, B. Hansson, and A. Reinecke. 2011. Male *Phyllotreta striolata* (F.) produce an aggregation pheromone: identification of male-specific compounds and interaction with host plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 37:85-97.
- Budenberg, W. J., I. O. Ndiege, and F. W. Karago. 1993. Evidence for volatile male-produced pheromone in banana weevil *Cosmopolites sordidus*. *J. Chem. Ecol.* 19:1905-1916.
- Camino, L. M., V. R. Castrejon Gomez, R. Figueroa Brito, L. Aldana Llanos, and M. Valdes Estrada. 2002. *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, Mexico. *Fla. Entomolo.* 85:392-393.
- El-Sayed, A. M., J. Delisle, N. De Lury, L. J. Gut, G. J. R. Judd, S. Legrand, W. H. Reissig, W. L. Roelofs, C. R. Unelius, and R. M. Trimble. 2003. Geographic variation in pheromone chemistry, antennal electrophysiology, and pheromone-mediated trap catch of north American populations of the *Obliquebanded Leafroller*. *Environ. Entomol.* 32:470-476.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Geiler, K. A. and R. G. Harrison. 2010. A Delta 11 desaturase gene genealogy reveals two divergent allelic classes within the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *BMC. Evol. Biol.* 10:112.
- Giblin-Davis, R. M., R. Gries, B. Crespi, L. N. Robertson, A. H. Hara, G. Gries, C. W. O'Brien, and H. D. Pierce. 2000. Aggregation pheromones of two geographical isolates of the New Guinea sugarcane weevil, *Rhabdoscelus obscurus*. *J. Chem. Ecol.* 26:2763-2780.
- Hernández, R. M., M. Gutiérrez O, L. Aldana LI, and M. Valdés E. 2006. Fecundity of the Sisal weevil, *S. acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae), on *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae). *Fla. Entomol.* 89:518-520.

- Kendra, P. E., W. S. Montgomery, D. M. Mateo, H. Puche, N. D. Epsky, and R. R. Heath. 2005. Effect of age on EAG response and attraction of female *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to ammonia and carbon dioxide. *Environ. Entomol.* 34:584-590.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Möller, E. M., G. Bahnweg, H. Sandermann, and H. H. Geiger. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic. Acids. Res.* 20:6115-6116.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 331 p.
- Presuna, A. L., K. N. Jyothi, A. R. Prasad, J. S. Yadav, and B. Padmanaban. 2008. Olfactory responses of banana pseudostem weevil, *Odoiporus longicollis* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) to semiochemicals from conspecifics and host plant. *Current Science* 94:896-900.
- Ramírez-Choza, J. L. 1993. Max del henequén *Scyphophorus interstitialis* Gylh. *Bioecología y control*. Centro de Investigación Regional del Sureste. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos, Mérida, Yucatán, México.
- Rochat, D., P. N.-L. Meillour, J. R. Esteban-Duran, C. Malosse, B. Perthuis, J.-P. Morin, and C. Descoins. 2000. Identification of pheromone synergists in American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and attraction of related *Dynamis borassi*. *J. Chem. Ecol.* 26:155-187.
- Ruiz-Montiel, C., G. García-Coapio, J. C. Rojas, E. A. Malo, L. Cruz-López, I. Del Real, and H. González-Hernández. 2008. Aggregation pheromone of the agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 127:207-217.
- Ruiz-Montiel, C., H. Gonzalez-Hernandez, J. Leyva, C. Llanderal-Cazares, L. Cruz-Lopez, and J. C. Rojas. 2003. Evidence for a male-produced aggregation pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 96:1126-1131.
- Ruiz-Montiel, C., J. C. Rojas, L. Cruz-Lopez, and H. Gonzalez-Hernandez. 2009. Factors affecting pheromone release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38:1423-1428.

- SAS-Institute. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's guide, 2nd.SAS Institute, Cary, NC. USA.
- Seybold, S., D. Huber, J. Lee, A. Graves, and J. Bohlmann. 2006. Pine monoterpenes and pine bark beetles: a marriage of convenience for defense and chemical communication. *Phytochemistry Reviews* 5:143-178.
- Simons, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu, and P. Floors. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 87:651-701.
- Solís-Aguilar, J. F., H. González-Hernández, J. L. Leyva, A. Equihua-Martínez, J. Flores, and A. Martínez-Garza. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, plaga del agave tequilero en Jalisco, México. *Agrociencia* 35:663-670.
- Sookoian, S., A. Burgueño, T. F. Gianotti, G. Marillet, and C. J. Pirola. 2011. Odor perception between heterosexual partners: Its association with depression, anxiety, and genetic variation in odorant receptor OR7D4. *Biolo. Psychol.* 86:153-157.
- Szendrei, Z. S. Z., A. Averill, H. Alborn, and C. Rodriguez-Saona. 2011. Identification and field evaluation of attractants for the Cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37:387-397.
- Tafoya, F., M. E. Whalon, C. Vandervoot, A. B. Coombs, and J. Cibrian-tovar. 2007. Aggregation pheromone of *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae): Chemical analysis and field test. *Environ. Entomol.* 36:53-57.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512-526.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*
- Terán-Vargas, A., A. Azuara-Domínguez, P. Vega-Aquino, J. Zambrano-Gutiérrez, and C. Blanco. 2012. Biological effectivity of insecticides to control the Agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), in Mexico. *Southwest. Entomolo.* 37:1-7.

- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 22:4673-4680.
- Tumlinson, J. H., D. D. Hardee, R. C. Gueldner, A. C. Thompson, P. A. Hedin, and J. P. Minyard. 1969. Sex pheromones produced by male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. *Science* 166:1010-1012.
- Valdés-Rodríguez, S., J. L. Ramírez-Choza, J. Reyes-López, and A. Blanco-Labra. 2004. Respuesta del insecto max (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) hacia algunos compuestos atrayentes del henequén. *Acta Zool. Mex.* 20:157-166.
- Valdés, M. A., L. I. Aldana, B. Figueroa, O. M. Gutiérrez, R. M. Hernández, and M. T. Chavelas. 2005. Trapping of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) with two natural baits in a field of *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in the State of Morelos, México. *Fla. Entomol.* 88:338-340.
- Varela, N., J. Avilla, S. Anton, and C. Gemeno. 2011. Synergism of pheromone and host-plant volatile blends in the attraction of *Grapholita molesta* males. *Entomol. Exp. Appl.* 141:114-122.
- Vaurie, P. 1971. Review of *Scyphophorus* (Curculionidae: Rhynchophorinae). *The Coleopterists Bulletin* 25:1-8.
- Wong, T. T. Y., D. O. McInnis, M. M. Ramadan, and J. I. Nishimoto. 1991. Age-related response of male melon flies *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) to cue-lure. *J. Chem. Ecol.* 17:2481-2487.

## CAPÍTULO 3

### TRAMPEO CON AGAVE FERMENTADO E IDENTIFICACIÓN DE LOS VOLÁTILES INVOLUCRADOS EN LA ATRACCIÓN DEL PICUDO DEL AGAVE

#### *Scyphophorus acupunctatus.*

#### RESUMEN

Se evaluó la eficiencia de la “cabeza” de *A. tequilana*, que es la parte central de la planta, en estado fermentado, para el trapeo de *S. acupunctatus*, identificando los compuestos volátiles involucrados en la atracción de este insecto. En campo, de agosto de 2009 a diciembre de 2011, se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) feromona, 2) feromona + cabeza en estado fermentado, 3) feromona + cabeza sin fermentar, 4) cabeza fermentada, 5) cabeza sin fermentar y 6) testigo (agua + insecticida). El diseño experimental fue bloques completamente al azar con seis repeticiones. Los volátiles se muestrearon usando la técnica de Micro extracción en Fase Solida (SPME) y se identificaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC/MS). Las trampas cebadas con la feromona y cabeza en estado fermentado capturaron más picudos que los otros tratamientos. La cabeza en estado fermentado fue más atractiva que sin fermentar. En la cabeza fermentada se identificaron los siguientes volátiles: acetato de etilo, etanol, 2-butanol y ácido acético. Mientras que en la cabeza sin fermentar se colectaron 24 compuestos volátiles diferentes a los encontrados en la cabeza fermentada. Esto indica que los volátiles liberados por la fermentación son atractivos y producen sinergia en la respuesta del picudo del agave hacia su feromona de agregación.

**Palabras clave:** Feromona de agregación, 2-metil-4-octanona, acetato de etilo.

## ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of the fermented part called “head” of *A. tequilana*. We also identified volatile compounds attractive to the agave weevil. In the field, between August 2009 to December 2011, we evaluated the following treatments: 1) pheromone, 2) pheromone + fermented head, 3) pheromone + non fermented head, 4) fermented head, 5) non fermented head, and control (water + insecticide). The volatiles were sampled using the technique of solid-phase microextraction (SPME) and identified with a gas chromatograph coupled to a mass selective detector (GC/MS). The traps baited with the pheromone and fermented head caught more weevils than the other treatments. The fermented agave head increased the attraction of *S. acupunctatus*, while non fermented head did not contribute significantly. The following volatiles were identified in the fermented head: ethyl acetate, ethanol, 2-butanol, and acetic acid. Whereas in the non fermented head, 24 volatile compounds were collected, they were different than those identified in the fermented head. The results obtained indicated that the fermented material is a viable alternative to optimize trapping of *S. acupunctatus*, because the liberated volatile chemical compounds of this attractant captured a greater number of weevils in field.

**Key words:** Aggregation pheromone, 2-methyl-4-octanone, ethyl acetate.

### 3.1 INTRODUCCIÓN

El picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), utiliza a las plantas de la familia Agavaceae y Dracaenaceae para ovipositar, crecer sus larvas y pupar (Lock 1962). La mayoría de los hospederos de este insecto son de importancia económica, ya que de ellos se obtiene fibra y/o bebidas alcohólicas como el pulque, mezcal y tequila, respectivamente (Pott 1975, Waring y Smith 1986, Morton y Dawling 1992, Valenzuela 1994). En estos cultivos los insecticidas son comúnmente aplicados para el control del picudo del agave (Solís-Aguilar et al. 2001, Terán-Vargas et al. 2012). La constante aplicación de estos productos químicos incrementa el riesgo de una contaminación ambiental y a la salud humana (Solís-Aguilar et al. 2001). Por lo tanto, nuevas estrategias integradas para el manejo de esta plaga son necesarias.

Las feromonas de agregación en conjunto con el tejido de la plantas hospederas están siendo utilizadas recientemente para el trapeo de insectos plaga pertenecientes a la familia Curculionidae ( Budenberg et al. 1993, Rochat et al. 2000, Tafoya et al. 2007). Por ejemplo, para el trapeo de *Rhyncophorus cruentatus* F., *R. palmarum* L., *R. phoenicis* L. y *R. ferrugineus* se ha utilizado, con sus respectivas feromonas de agregación, el tejido de la palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., y la caña de azúcar *Saccharum* sp. (Chinchilla et al. 1993, Oehlschlager et al. 1993, Alpizar et al. 2002). Para capturar adultos de *Metamasius hemipterus* L. se utiliza la fruta de manzano *Malus domestica* Borkh y el tallo de la caña de azúcar. Mientras que para el trapeo de *Cosmopolites sordidus* G., se utilizan rizomas de la planta de plátano *Musa* sp., más su feromona de agregación (Tinzaara et al. 2003). En el caso de *S. acupunctatus* se recomienda su feromona de

agregación más el tejido vegetal de la planta de agave tequilero *A. tequilana* F.A.C. Weber variedad azul (Ruiz-Montiel et al. 2008).

Otra opción para el trapeo de *R. cruentatus* F., *R. palmarum* L., *R. phoenicis* L., *R. ferrugineus*, *M. hemipterus* L. y *C. sordidus* G. es el uso de la palma de aceite, caña de azúcar, fruta del manzano y rizomas de la planta de plátano en estado fermentado, ya que estos atrayentes fermentados incrementan las capturas de estos picudos (Chinchilla et al. 1993, Jeffé et al. 1993, Oehlschlager et al. 1993, Giblin-Davis et al. 1994, Alpizar et al. 2002, Tinzaara et al. 2003). El resultado anterior, está relacionado a que el material fermentado libera compuestos volátiles que tienen una acción sinérgica en la respuesta de los picudos a su feromona de agregación (Giblin-Davis et al. 1994, Gries et al. 1994, Jaffé et al. 1994, Pérez et al. 1997).

Por ejemplo, de los compuestos encontrados en los materiales fermentados mencionados anteriormente, el propionato y el isobutirato de etilo tienen una función sinérgica en la atracción de *R. phoenicis* L. a su feromona de agregación (Gries et al. 1994). El acetato de etilo, pentano, hexanal, isoamil acetato y isopentanol en la respuesta de *R. palmarum* L. a su feromona de agregación (Jaffé et al. 1994). Mientras que, el acetato de etilo, el (s)-(-) lactato de etilo, el butirato de etilo, el isobutirato de etilo y el etanol en *R. cruentatus* F. a su feromona de agregación (Giblin-Davis et al. 1994).

En el caso de *S. acupunctatus* se sabe que responde al maguey *A. salmiana* Otto ex. SalmDyck fermentado, y a la piña madura *Ananas comosus* L. Merr. (Valdés et al. 2005). Sin embargo, se desconocen los volátiles que estos atrayentes liberan, así como también, la respuesta de este insecto a otros atrayentes alimenticios en condiciones de campo. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia en el trapeo *S. acupunctatus* con la cabeza de la

planta de agave tequilero en estado fermentado e identificar los compuestos volátiles involucrados en la atracción del picudo del agave.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Trampa.**

Una garrafa de plástico blanco de 20 L con dos ventanas de 15 cm x 15 cm realizadas a 10 cm de la base. En el centro de la trampa se colocó un gancho de alambre del cual se suspendió un liberador de feromona.

### **3.2.2 Feromona y atrayente alimenticio.**

El 2-metil-4-octanona se obtuvo de Sigma-Aldrich® (Toluca, México). Éste se confinó en una membrana de polietileno (Liberador) y su tasa de liberación fue de 3.1 mg/día en condiciones de campo. Para el atrayente alimenticio se utilizó el *A. tequilana* F.A.C. Weber variedad azul de siete años de edad con y sin fermentar. Para preparar el atrayente fermentado, 25 kg de la cabeza (piña) se confinaron en un recipiente que contenía cinco litros de melaza más 100 litros de agua. El recipiente se cerró herméticamente y la mezcla se dejó fermentar por cinco días. En campo, dentro de cada trampa se confinó un kilogramo del material fermentado o sin fermentar. Ambos atrayentes se remplazaron cada semana, mientras que el liberador con el 2-metil-4-octanona se cambió a intervalos de 25 días. Todos los tratamientos fueron acompañados con tres litros de agua más 1 g de i.a L<sup>-1</sup> del insecticida metomil (Lannate 90 Dupont®, Ciudad de México, México) para matar a los adultos capturados.

### **3.2.3 Experimentos en campo.**

Durante agosto de 2009 a diciembre de 2011, los siguientes tratamientos fueron evaluados: T1) feromona, T2) feromona + cabeza en estado fermentado, T3)

feromona + cabeza sin fermentar, T4) cabeza en estado fermentado, T5) cabeza sin fermentar y T6) testigo (agua). El experimento se estableció dentro de una plantación de agave tequilero *A. tequilana* de siete años de edad, localizada en Mante, Tamaulipas, México. Los tratamientos se distribuyeron al azar con una separación de 50 m. El diseño experimental fue bloques completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento. Cada ocho días las trampas se rotaron y los insectos capturados fueron retirados. Los adultos colectados por trampa fueron depositados en recipientes y contados en el laboratorio.

#### **3.2.4 Análisis estadístico.**

Todos los conteos de 2009 y 2011 fueron convertidos en número de insectos capturados por trampa por día. Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA), con la estimación de la varianza mínima cuadrática (PROC MIXED MIVQUE0). Las medias fueron separadas por una prueba de Tukey utilizando SAS ver. 9.1 (SAS-Institute 2004).

#### **3.2.5 Muestreo de volátiles.**

Los volátiles emitidos de la cabeza de la planta de agave con y sin fermentar se muestrearon usando la técnica de Micro extracción en Fase Solida (SPME). Para la captura de los volátiles se empleó una fibra (color rojo) de 65  $\mu\text{m}$  cubierta con polímero dimetilsiloxano (PDMS-DVB, Supelco, Bellefonte, PA). El material vegetal (14 g) se confinó en un vial de vidrio de 10 ml equipado con una tapa de poliuretano (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Toluca, México). El tiempo de captura de los volátiles fue de 14 minutos, después la fibra se retiró y se insertó en el inyector de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC/MS).

### 3.2.6 Análisis químicos.

Los análisis por cromatografía se corrieron en un cromatógrafo de gases GC (Agilent 6850. Serie II; Agilent, Foster City, CA). Éste fue equipado con una columna capilar DB-Wax (30 m por 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor) y acoplado a un detector de masas MS (5975C, Agilent, Foster City, CA). La temperatura del programa fue de 70 °C por 2 minutos, 70 °C - 270 °C a 30 °C / minuto y 270 °C por 3 minutos. La temperatura del inyector y detector fue de 250 °C. La identidad de los compuestos se obtuvo con la biblioteca NIST 98 (*National Institute of Standard and Technology*) y mediante la comparación del tiempo de retención y espectro de masas de los estándares auténticos.

## 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las trampas cebadas con la feromona y la cabeza fermentada (T2) capturaron significativamente más picudos ( $F = 290.89$ ;  $df = 5$ ;  $P < 0.001$ ) con respecto al feromona (T1), feromona más la cabeza sin fermentar (T3), cabeza fermentada (T4), cabeza sin fermentar (T5) y testigo (T6) (Figura 1).

Valdés et al. (2005) observaron que el picudo del agave responde al tejido fermentado del maguey (*A. salmiana* L.) y a la piña madura (*A. comosus* L.). Sin embargo, ambos atrayentes no se han evaluado en conjunto con la feromona de este insecto, así como también, no se han identificado los compuestos involucrados en la atracción del picudo del agave hacia estos atrayentes.

En otras especies de picudos como *R. palmarum* y *R. cruentatus*, con el material fermentado (tejido de coco, palma de coco y piña) y la feromona de agregación que producen, se han obtenido mayores capturas de estos insectos (Jaffé et al. 1993, Giblin-Davis et al. 1994, 1996, Jayaraman et al. 1997, Cerda et al.

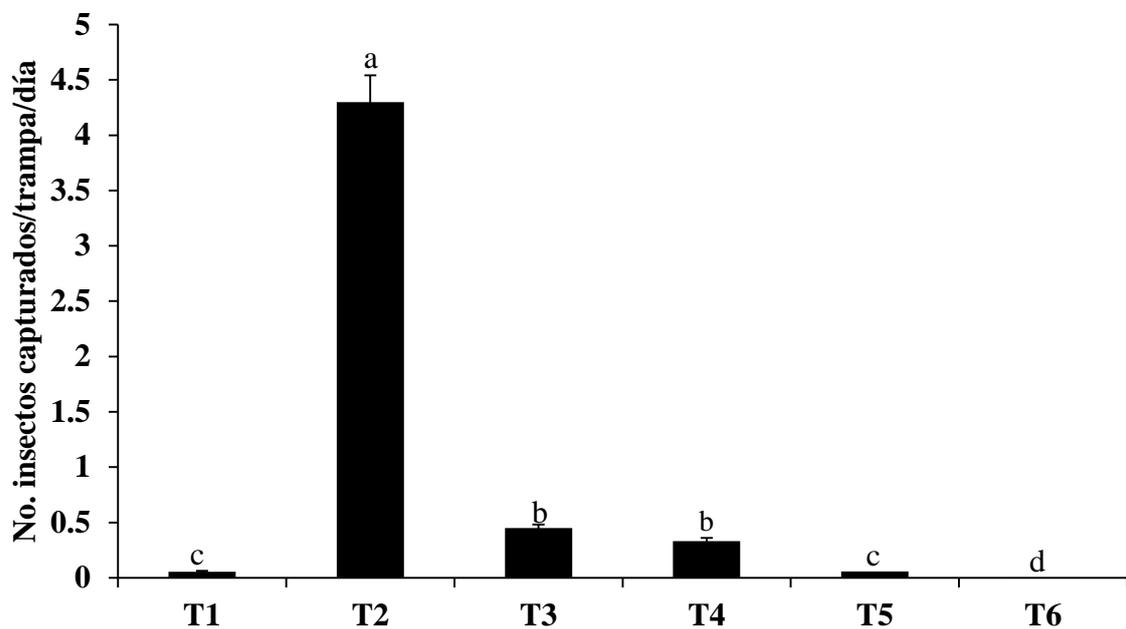
1999, Rochat et al. 2000). En el presente estudio la piña de agave fermentada incrementó la atracción de *S. acupunctatus*, mientras que la cabeza sin fermentar no contribuyó significativamente. Este resultado es posible que esté relacionado a la mezcla de volátiles liberados de ambos atrayentes. Los resultados por GC/MS indican que los atrayentes liberan diferentes compuestos volátiles (Figura 2). Los volátiles identificados de la cabeza fermentada son: el acetato de etilo, el etanol, el 2-butanol y el ácido acético (Figura 2a). Mientras que de la cabeza sin fermentar se colectaron 24 compuestos volátiles (Figura 2b), de los cuales la mayoría son reportados en el cultivo de agave (Altuzar et al. 2007, Rangel-Reyes 2007).

Los volátiles de la cabeza de agave en estado fermentado también se han colectado en otro tipo de material vegetal en estado fermentado. Por ejemplo, el acetato de etilo de la caña de azúcar, en la piña y en la fruta de plátano (Flath y Forrey 1970, Godshall et al. 1980, Macku y Jennings 1987). El etanol del tejido de coco, en la caña de azúcar, en la piña y en la fruta de plátano (Flath y Forrey 1970, Macku y Jennings 1987). Ambos volátiles también se han encontrado en la palma de aceite *E. guineensis* Jacq (Gries et al. 1994, Perez et al. 1997, Rochat et al. 2000) y durante la destilación del tequila (Arrizon et al. 2006, Pinal et al. 2009). El etanol y el acetato de etilo son atractivos para la mayoría de los insectos pertenecientes a la familia Rhynchophorinae (Giblin-Davis et al. 1994, 1996, Jayaraman et al. 1997, Cerda et al. 1999, Rochat et al. 2000). Se conoce que ambos atrayentes en el campo, en mezcla o solos, generan un efecto sinérgico cuando son acompañados con la feromona de agregación de *R. palmarum* L., *M. hemipterus* y *Rhabdoscelus obscurus* (Hacley 1965, Pérez et al. 1997, Reddy et al. 2005). Así mismo, se ha reportado que el acetato de etilo es precursor de la feromona de *R. palmarum* (Jaffé et al. 1993). Lo anterior puede indicar que los

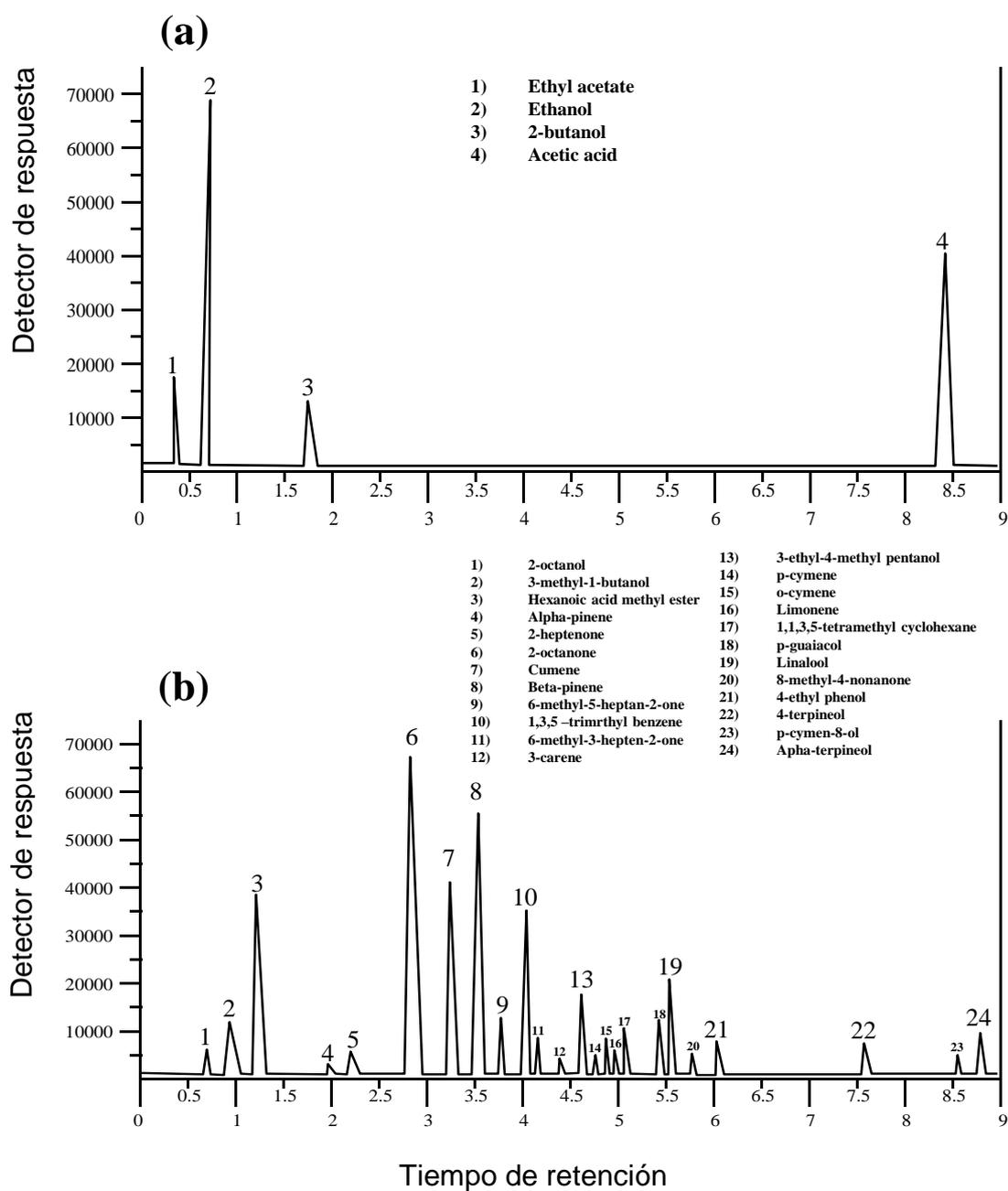
volátiles en la cabeza de la planta de agave en estado fermentado, solos o en mezcla, podrían ser atractivos para *S. acupunctatus*, y es posible que éstos, en conjunto con el 2-metil-4-octanona, generen un efecto sinérgico atractivo para el picudo del agave.

Los compuestos en la cabeza de la planta agave sin fermentar, el limoneno, linalol, 3-careno,  $\alpha$ -pineno y  $\alpha$ -terpinenol, son atractivos para el picudo del agave en bioensayos de laboratorio (Altuzar et al. 2007, Rangel-Reyes 2007). Sin embargo, en campo los compuestos no resultan ser atractivos (Altuzar et al. 2007, Rangel-Reyes 2007, Garcia-Coapio 2009). La falta de atracción del picudo del agave hacia estos compuestos volátiles puede ser debido a la concentración de cada compuesto. Por ejemplo, Altuzar et al (2007) reportaron la presencia de linalol en la piña y hojas del cultivo de agave, y determinaron que este volátil en bajas dosis es atractivo para el picudo del agave, mientras que en altas dosis ( $\geq 100 \mu\text{g}$ ) el compuesto ejerció un efecto de repelencia en el laboratorio. En este experimento, es posible que la concentración de los compuestos volátiles liberado del material sin fermentar interfirió en la respuesta del picudo del agave hacia las trampas cebadas con su feromona más este atrayente. Así también, es posible que algunos de los volátiles liberados de la cabeza de la planta de agave sean indicadores del picudo del agave en condiciones de campo. Observaciones en campo demuestran que la mayoría de los monoterpenos son liberados de las plantas después de ser atacadas por insectos herbívoros (Kessler y Baldwin 2001). Éstos permiten a insectos parasitoides y depredadores distinguir entre plantas infestadas y no infestadas. Así mismo, a localizar a su hospedero o presa (Agrawal et al. 2000, Reddy y Guerrero 2004).

En conclusión, los resultados sugieren que si se desea optimizar el trapeo de *S. acupunctatus* se debe sustituir el material vegetal sin fermentar por el material fermentado, pues los compuestos químicos volátiles liberados atraen significativamente mayor número de adultos de *S. acupunctatus* en condiciones de campo.



**Figura 5.** Promedio de picudos (media  $\pm$  SE) capturados por trampa por día en trampas cebadas con: T1) feromona, T2) feromona + cabeza fermentada, T3) feromona + cabeza sin fermentar, T4) cabeza en estado fermentado, T5) cabeza sin fermentar y T6) testigo (Tukey,  $P < 0.05$ ).



**Figura 6.** Cromatograma de los volátiles recolectados con la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) en la cabeza en estado fermentado (a) y sin fermentar (b). El número sobre la base del pico corresponde al compuesto volátil muestreado.

### 3.4 LITERATURA CITADA

- Agrawal, A. A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 329-335.
- Alpizar, M. D., M. Fallas, A. C. Oehlschlager, L. M. González, C. M. Chinchilla-López, and J. M. Bulgarelli-Mora. 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.
- Altuzar, A., E. A. Malo, H. González-Hernández, and J. C. Rojas. 2007. Electrophysiological and behavioural responses of *Scyphophorus acupunctatus* (Col., Curculionidae) to *Agave tequilana* volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 121-127.
- Arrizon, J., C. Fiore, G. Acosta, P. Romano, and A. Gschaedler. 2006. Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar; *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Anton. Leeuw.* 89: 181-189.
- Budenberg, W. J., I. O. Ndiege, F. W. Karago, and B. S. Hansson. 1993. Behavioral and electrophysiological responses of the banana weevil *Cosmopolites sordidus* to host plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* 19: 267-277.
- Cerda, H., F. Gerson, A. Lopez, and J. Varga. 1999. Olfactory attraction of the sugar cane weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant odors, and its aggregation pheromone. *Fla. Entomol.* 82: 103-112.
- Chinchilla, C. M., A. C. Oehlschlager, and L. M. González. 1993. Management of red ring disease in oil palm through pheromone-based trapping of *Rhynchophorus palmarum*, pp. A428-A441. PORIM International Oil Palm Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, September.
- Flath, R. A., and R. R. Forrey. 1970. Volatile components of smooth cayenne pineapple. *J. Agr. Food Chem.* 18: 306-309.
- García-Coapio, G. 2009. Sistema de trampeo con feromona de agregación y volátiles vegetales para el picudo del agave, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Giblin-Davis, R. M., T. J. Weissling, A. C. Oehlschlager, and L. M. Gonzalez. 1994. Field response of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae) to

- its aggregation pheromone and fermenting plant volatiles. Fla. Entomol. 77: 164-177.
- Giblin-Davis, R., J. Peña, A. Oehlschlager, and A. Perez. 1996. Optimization of semiochemical-based trapping of *Metamasius hemipterus sericeus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). J. Chem. Ecol. 22: 1389-1410.
- Godshall, M. A., E. J. Roberts, and M. G. Legendre. 1980. Identification of volatile constituents responsible for characteristic molasses aroma by unconventional gas chromatography. J. Agr. Food Chem. 28: 856-858.
- Gries, G., R. Gries, A. L. Pérez, L. M. Gonzales, H. D. Pierce, A. Cameron Oehlschlager, M. Rhainds, M. Zebeyou, and B. Kouame. 1994. Ethyl propionate: synergistic kairomone for African palm weevil of *Rhynchophorus phoenicis* L. (Coleoptera: Curculionidae). J. Chem. Ecol. 20: 889-897.
- Hacley, E. A. C. 1965. Tests of attractants for the palm weevil. J. Econ. Entomol. 58: 1002-1003.
- Jaffé, K., P. Sánchez, H. Cerda, J. V. Hernández, R. Jaffé, N. Urdaneta, G. Guerra, R. Martínez, and B. Miras. 1993. Chemical ecology of the palm weevil; *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. J. Chem. Ecol. 19: 1703-1720.
- Jayaraman, S., I. O. Ndiege, A. C. Oehlschlager, L. M. Gonzalez, D. Alpizar, M. Falles, W. J. Budenberg, and P. Ahuya. 1997. Synthesis, analysis, and field activity of sordidin, a male-produced aggregation pheromone of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. J. Chem. Ecol. 23: 1145-1161.
- Kessler, A., and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291: 2141-2144.
- Lock, G. W. 1962. Sisal: twenty-five years's sisal research. Spottiswoode, Ballantyne and Co., Ltd., London, UK.
- Macku, C., and W. G. Jennings. 1987. Production of volatiles by ripening bananas. J. Agr. Food Chem. 35: 845-848.
- Morton, J. F., and C. F. Dowling. 1992. The spineless yucca deserves more attention as an ornamental and food plant. Proc. Florida State Hort. Soc. 104: 341-345.
- Oehlschlager, A. C., C. M. Chinchilla, L. M. Gonzalez, L. F. Jiron, R. G. Mexzon, and B. Morgan. 1993. Development of a pheromone-based trapping system for

- Rhynchophorus palmarum* Coleoptera: Curculionidae. J. Econ. Entomol. 86: 1381-1392.
- Perez, A. L., Y. Campos, C. M. Chinchilla, A. C. Oehlschlager, G. Gries, R. Gries, R. M. Giblin Davis, G. Castrillo, J. E. Pena, R. E. Duncan, L. M. Gonzalez, H. D. Pierce, R. McDonald, and R. Andrade. 1997. Aggregation pheromones and host kairomones of West Indian sugarcane weevil, *Metamasius hemipterus sericeus*. J. Chem. Ecol. 23: 869-888.
- Pinal, L., E. Cornejo, M. Arellano, E. Herrera, L. Nuñez, J. Arrizon, and A. Gschaedler. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. J. Ind. Microbiol. Biot. 36: 655-661.
- Pott, J. N. 1975. A yucca borer *Scyphophorus acupunctatus* in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 88: 414-416.
- Ramírez-Choza, J. L. 1993. Max del henequén *Scyphophorus interstitialis* Gylh. Bioecología y control. Serie: Libro Técnico. Centro de Investigación Regional del Sureste. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos. Mérida, Yucatán, México.
- Rangel-Reyes, D. N. 2007. Atracción de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) a algunos volátiles del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Reddy, G. V. P., and A. Guerrero. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. Trends Plant Sci. 9: 253-261.
- Reddy, G. V. P., Z. T. Cruz, J. Bamba, and R. Muniappan. 2005. Development of a semiochemical-based trapping method for the New Guinea sugarcane weevil, *Rhabdoscelus obscurus* in Guam. J. Appl. Entomol. 129: 65-69.
- Rochat, D., P. N.-L. Meillour, J. R. Esteban-Duran, C. Malosse, B. Perthuis, J.-P. Morin, and C. Descoins. 2000. Identification of pheromone synergists in American palm weevil, *Rhynchophorus Palmarum*, and attraction of related *Dynamis Borassi*. J. Chem. Ecol. 26: 155-187.
- Ruiz-Montiel, C., H. González-Hernández, J. Leyva, C. Llanderal-Cazares, L. Cruz-Lopez, and J. C. Rojas. 2003. Evidence for a male-produced aggregation

- pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol. 96: 1126-1131.
- Ruiz-Montiel, C., G. García-Coapio, J. C. Rojas, E. A. Malo, L. Cruz-López, I. del Real, and H. González-Hernández. 2008. Aggregation pheromone of the agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus*. Entomol. Exp. Appl. 127: 207-217.
- SAS-Institute. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide, 2nd ed. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Solís-Aguilar, J. F., H. González-Hernández, J. L. Leyva, A. Equihua-Martínez, J. Flores, and A. Martínez-Garza. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, plaga del agave tequilero en Jalisco, México. Agrociencia 35: 663-670.
- Tafoya, F., M. E. Whalon, C. Vandervoot, A. B. Coombs, and J. Cibrian-Tovar. 2007. Aggregation pheromone of *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae): chemical analysis and field test. Environ. Entomol. 36: 53-57.
- Terán-Vargas, A., A. Azuara-Domínguez, P. Vega-Aquino, J. Zambrano-Gutiérrez, and C. Blanco. 2012. Biological effectivity of insecticides to control the Agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), in Mexico. Southwest Entomolo 37: 1-7.
- Tinzaara, W., M. Dicke, A. Van Huis, J. J. A. Van Loon, and C. S. Gold. 2003. Different bioassays for investigating orientation responses of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, show additive effects of host plant volatiles and a synthetic male-produced aggregation pheromone. Entomol. Exp. Appl. 106: 169-175.
- Valdés, M. A., L. I. Aldana, B. Figueroa, O. M. Gutiérrez, R. M. Hernández, and M. T. Chavelas. 2005. Trapping of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) with two natural baits in a field of *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in the State of Morelos, México. Fla. Entomol. 88: 338-340.
- Valdés-Rodríguez, S., J. L. Ramírez-Choza, J. Reyes-López y A. Blanco-Labra. 2004. Respuesta del insecto max (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) hacia algunos compuestos atrayentes del henequén. Acta Zool. Mex. 20: 157-166.
- Valenzuela, Z. A. G. 1994. El agave tequilero, cultivo e industrial de México. 3ª edición. Editorial Mundi Prensa. México, D. F.

Waring, G. L., and R. L. Smith. 1986. Natural history and ecology of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) and its associated microbes in cultivated and native agaves. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 79: 334-340.

## CAPÍTULO 4

### EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS PARA EL CONTROL DEL PICUDO DEL AGAVE *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (*Coleoptera*: *Curculionidae*).

#### RESUMEN

Para el control de *Scyphophorus acupunctatus* los insecticidas sintéticos se consideran como la principal estrategia, pero se desconoce la eficacia de estos en el control de esta plaga. Se evaluó la efectividad de insecticidas sintéticos de diferentes grupos toxicológicos en *S. acupunctatus*. El diseño experimental fue en completamente al azar. El número de adultos muertos fue analizado usando análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis. Los porcentajes de eficacia biológica de los insecticidas en cada bioensayo se obtuvieron mediante el uso de la fórmula de Abbott. Los insecticidas malatión, endosulfán, metomilo y fipronil mostraron mayor eficacia biológica con respecto al testigo. Mientras que los insecticidas cipermetrina, lambda-cihalotrina, deltametrina, y beta-ciflutrina, de uso constante para el control de *S. acupunctatus* en Tamaulipas, mostraron menor efecto, en algunos casos similar al testigo. No obstante, aunque algunos de los productos evaluados resultaron ser eficientes, se recomienda que estos se usen en rotación con insecticidas de diferente modo de acción o en conjunto con otras alternativas como los atrayentes alimenticios, hongos entomopatógenos y feromonas de agregación, para obtener mejor control de *S. acupunctatus* en condiciones de campo.

**Palabras clave:** agave tequilero, malatión, endosulfán, metomilo y fipronil

## ABSTRACT

Insecticides are commonly employed for *S. acupunctatus* control, but the efficacy of insecticides to control this pest is unknown. In this study, we evaluated the effectiveness of synthetic insecticides of different toxicological groups to control *S. acupunctatus*. The experimental design was completely randomized. The number of dead adults was analyzed using a nonparametric variance of Kruskal Wallis. The percentages of biological effectiveness of insecticides in each bioassay were obtained by using the Abbott formula. Malathion, endosulfan, methomyl, and fipronil showed high biological efficacy. Conversely, cypermethrin, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, and betacifluthrin, of constant use in Tamaulipas to control *S. acupunctatus*, produced a minor effect similar to the nontreated check. However, although some insecticides were effective, it is recommended they be rotated with insecticides with different modes of action or in conjunction with other controls such as food attractants, entomopathogenic fungi and nematodes, and aggregation pheromones, to obtain better control of *S. acupunctatus* and prevent development of resistance to insecticide.

**Key words:** Agave tequilana, Malathion, endosulfan, methomyl, and fipronil

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

En México, el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) causa 30% de pérdidas en los cultivos de agave tequilero *Agave tequilana* F.A.C. Weber y agave pulquero *A. salmiana* Otto, 46% *A. angustifolia* Haw, 50% en henequén *A. fourcroydes* Lem. y 69% en plantaciones de nardo *Polianthes tuberosa* L., en los estados de Jalisco, Morelos, Oaxaca y Yucatán, respectivamente (Ramírez-Choza 1993, Solís-Aguilar et al. 2001, Camino et al. 2002, Valdés et al. 2005). El uso de insecticidas sintéticos reduce la cantidad de daño causado por este insecto plaga (Pineda 1983, Ramírez-Choza 1993, Solís-Aguilar et al. 2000, Pérez y Del Real 2007), sin embargo, el control en campo de *S. acupunctatus* con estos químicos es limitado (Solís-Aguilar et al. 2001). Esto puede ser causado debido a la aplicación ineficiente, al uso de ingredientes activos inadecuados o por que las larvas y adultos de *S. acupunctatus* con frecuencia se encuentran dentro de la piña de la planta de agave donde difícilmente podrían ser alcanzados por los insecticidas (Lock 1962, Hill 1983, Siller 1985, Ruiz-Montiel et al. 2009). Todos estos factores generan costos extras en la producción y comercialización del cultivo de agave, así como también el uso excesivo de químicos aumenta el riesgo en la salud humana y en la contaminación ambiental. El conocimiento de las limitaciones biológicas de los insecticidas usados para el control de *S. acupunctatus* es importante para minimizar el problema, ya que el costo de producción puede ser reducido por el menor número de aplicaciones, así como también la insensibilidad de *S. acupunctatus* a los insecticidas podría evitarse, ya que esta se ha reportado en la familia Curculionidae a la que pertenece el picudo del agave (Terán-Vargas y Wolfenbarger 2001). Por lo tanto, en el presente estudio se determinó el nivel de efectividad biológica de insecticidas con diferente modo de

acción en *S. acupunctatus* procedente del cultivo de agave tequilero en González, Tamaulipas, México.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Material biológico.

Los adultos de *S. acupunctatus* fueron recolectados en abril 2010 en una plantación de agave de 7 a 8 años de edad localizada en el municipio de González, Tamaulipas (22° 39' 77" N; -98° 34' 28" WO). Los insectos encontrados fueron colocados en una caja entomológica [10 (anchura) x 6 (altura) x 20 (largo)] hecha con tela de tul (0.5 x 0.5 cm), transportados al laboratorio de entomología del Campo Experimental de las Huastecas (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) y mantuvieron a  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de humedad relativa, y a fotoperiodo de L12:D12. Un día después, los insectos fueron utilizados en los bioensayos.

### 4.2.2 Insecticidas.

Los insecticidas evaluados fueron malatión (Malatión 1000 CE<sup>®</sup>, concentrado emulsionable, 1000 g de ingrediente activo (i.a.) L<sup>-1</sup>, Agricultura Nacional S.A. de C.V.), endosulfán (Thiodan 35 CE<sup>®</sup>, concentrado emulsionable, 350 g de i.a., Bayer de México S.A. de C.V.), oxamil (Vydate L<sup>®</sup>, concentrado acuoso, 250 g de i.a., Dupont México S.A. de C.V.), cipermetrina (Cipermetrina<sup>®</sup>, concentrado emulsionable, 200 g de i.a., Síntesis y Formulaciones, de Alta Tecnología S. A. de C.V.), lambda cihalotrina (Karate<sup>®</sup>, suspensión encapsulada, 50 g de i.a., Syngenta Agro S. A. de C. V.), deltrametrina (Decis 2.5 CE<sup>®</sup>, concentrado emulsionable, 25 g de i.a., Bayer de México S.A. de C.V.), Betaciflutrin (Bulldock 125 SC<sup>®</sup>, suspensión concentrada, 125 g de i.a., Bayer de México S.A. de C.V.), fipronil (Regent 200

SC<sup>®</sup>, suspensión acuosa, 200 g de i.a., BASF Mexicana S.A. de C.V.) y metomilo (Lannate<sup>®</sup>, polvo soluble, 900 g de i.a., Dupont México S.A. de C.V.). Las concentraciones usadas son enlistadas en el Cuadro 1.

#### **4.2.3 Bioensayos.**

Los bioensayos fueron repetidos tres veces para cada tratamiento. Durante la prueba, los insectos se mantuvieron en jaulas entomológicas [10 (anchura) x 10 (altura) x 40 (largo)] hechas con tela de alambre (0.5 x 0.5 cm). Las jaulas fueron distribuidas bajo un diseño completamente al azar. Cada insecticida fue preparado en 3 litros de agua y aplicado con un equipo manual de CO<sub>2</sub> (Modelo T, Bellspray-INC, LA). El equipo fue calibrado para asperjar 200 L de agua/ha<sup>-1</sup> a 27.18 kg /0.9461 m<sup>2</sup> utilizando una boquilla de cono hueco serie TXVS-6 (Teejet-Spraying Systems, Wheaton, IL).

El número de insectos muertos y vivos fueron contados a 24, 48 y 72 horas después de aplicación de los insecticidas. Un adulto fue considerado vivo si manifestaba movimientos coordinados después de ser tocado con un pincel (FAO 1984).

Los bioensayos incluían 32 tratamientos y un testigo (se aplicó agua). Cada tratamiento fue replicado cuatro veces y a un grupo de 15 adultos se le considero como una unidad experimental.

#### **4.2.4 Análisis estadístico.**

El número de insectos muertos fue analizado mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis (aproximación de  $X^2$ ). Cuando se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), con las medias obtenidas de cada tratamiento se realizaron comparaciones pareadas con el método de Bonferroni (SAS 1999). El

porcentaje de efectividad biológica de los insecticidas en cada bioensayo fue obtenido con la fórmula de Abbott (Abbott 1925).

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los bioensayos, malatión (1500 g de i.a., BE= 90%), fipronil (60 g de i.a., BE=95%) (80 g de i.a., BE= 98%), endosulfán (700 g de i.a., BE= 100%), malatión (2,000 g de i.a., BE= 100%) y metomilo (450 g de i.a., BE= 100%) fueron más efectivos comparados con el testigo después de 72 h (Cuadro 1). Los insecticidas con moderada actividad fueron metomilo (270 g de i.a., BE= 63%), fipronil (40 g de i.a., BE= 60%) y endosulfán (525 g de i.a., BE= 47%). La eficacia biológica de los otros tratamientos fue menor que el 20%, y en algún caso similar al testigo.

La eficacia biológica de los insecticidas determinados en altas dosis para controlar los adultos de *S. acupunctatus* fue similar con fipronil, malatión, endosulfán y metomilo, al ser aplicados directamente al picudo del agave. A diferencia de este estudio, cuando los insecticidas son aplicados directamente a las plantas de agave no se han observado resultados claros de efectividad biológica. Por ejemplo, González-Díaz (2002) obtuvo menor efectividad biológica a la observada en nuestro experimento después de aplicar 360 g de i.a de metomilo, 525 g i.a. del endosulfán y 2.000 g i.a de malatión directamente a las plantas de agave.

En este mismo experimento, el autor observó que los insecticidas pertenecientes al grupo de los piretroides mostraban efectividad biológica. Al igual que González-Díaz (2002), Solís-Aguilar et al. (2001) obtuvieron resultados similares al aplicar 50 g de i.a de cipermetrina y 62.5 g i.a de lambda-cialotrina para el control de *S. acupunctatus* en el cultivo de agave tequilero. En el presente estudio, observamos que efecto toxico de los insecticidas piretroides fue en algunos casos similar al testigo.

La falta de control del picudo del agave puede ser atribuido al uso constante de insecticida del mismo grupo toxicológico en la misma área y probablemente a algunos insectos resistente de la población. Por lo tanto, es recomendable que los insecticidas que mostraron mayor eficiencia biológica en el presente estudio se usen en rotación con insecticidas de diferente modo de acción o en conjunto con otras alternativas de control. Por ejemplo, el control cultural (jima fitosanitaria) (Solis-Agular et al. 2001), atrayentes alimenticios (Ramírez-Choza1993), nematodos y hongos entomopatógenos (Bolaños et al. 2006) y feromonas de agregación (Ruiz-Montiel et al. 2008), con el fin de obtener un control más efectivo de *S. acupunctatus* y disminuir el riesgo de resistencia. Estas recomendaciones se basan también en el hecho de que en varias parte del mundo la familia Curculionidae tiene antecedentes de resistencia a malatión, endosulfán, oxamil, cipermetrina, lambda cihalotrina, deltametrin, paratión metílico y azinfos metílico (Mello 1965, Champ et al. 1976, Kerr 1977, Kanga et al. 1995, Ribeito et al. 2003, Heimbach et al. 2006, Kanga y Peric 2006, Kljajic y Peric 2006, Ramouter et al. 2009, IRAC 2010).

Con base en nuestros resultados, nosotros recomendamos la exclusión por un periodo de tiempo de los insecticidas piretroides (cipermetrina, Lambda cihalotrina, deltrametrin y betaciflutrin) para el control del picudo del agave en Tamaulipas. Nosotros también sugerimos la implementación de un programa de rotación de insecticidas con el insecticida malatión a 1500 g de i.a. (Organofosforado), metomilo a 450 g de i.a. (Carbamato) y el insecticida fipornil a 60 g de i.a. L<sup>-1</sup> (Pirazol), con el objeto de reducir la selección de adultos de *S. acupunctatus* resistente en cada generación. De esta forma, se puede alargar la vida útil de los insecticidas evaluados y de los genes susceptibles presentes en la población.

**Cuadro 3.** Mortalidad observada en el picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus*, en Tamaulipas.

Tratamiento	g i.a.	24 h		48 h		72 h		Efectividad biológica (%)
Beta-ciflutrina	12.50	0	d	0	f	0	g	0
	25.00	0	d	0	f	0	g	0
	50.00	0	d	0.25	ef	1.25	efg	8
	62.50	0	d	2.00	cdef	5.25	abcde	35
Cipermetrina	50.00	0	d	0	f	0	g	0
	100.00	0	d	0	f	0	g	0
	150.00	0	d	0	f	1.50	cdefg	10
	200.00	0	d	0	f	1.75	defg	12
Deltametrina	25.00	0	d	0	f	0	g	0
	40.00	0	d	0	f	0.25	fg	2
	60.00	0.50	bcd	0	ef	0.75	cdefg	5
Endosulfán	175.00	0	d	0	f	0	g	0
	262.50	0	d	0	f	0	g	0
	350.00	0	d	0	f	0.50	efg	3
	525.00	1.25	abc	4.50	abc	7.00	abcd	47
	700.00	1.50	ab	11.25	a	15.00	a	100
Fipronil	40.00	0.25	ab	3.25	abcd	9.00	abcd	60
	60.00	2.25	cd	4.75	abc	14.25	ab	95
	80.00	0	cd	6.50	ab	14.75	ab	98
L. cihalotrina	10.00	0	d	0	f	0	g	0
	25.00	0	d	0	f	0	g	0
	37.50	0.25	cd	0.75	def	1.25	defg	8
	50.00	0.50	bcd	1.25	bcde	4.00	abcde	27
Malatión	500.00	0	d	0	f	0	g	0
	750.00	0	d	0	f	1.25	cdefg	8
	1,000.00	0	d	0	f	1.75	bcdef	12
	1,500.00	4.00	a	6.50	ab	13.50	ab	90
	2,000.00	5.75	a	11.50	a	15.00	a	100
Metomilo	270.00	0.75	bcd	3.25	abc	9.50	abc	63
	450.00	2.25	ab	12.00	a	15.00	a	100
Testigo	0.00	0	d	0	f	0	g	0
$\chi^2$		104.59		117.59		115.7		
df		32		32		32		
<i>p</i>		< 0.0001		< 0.0001		< 0.0001		

#### 4.4 LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Bolaños, T. A., J. R. Vega y M. I. Cruz. 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nematodos y hongos entomopatógenos en Agave en Oaxaca, México. UDO Agrícola 6: 92-101.
- Camino, L. M., V. C. Figueroa, L. Aldana, and M. E. Valdés. 2002. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, México. Fla. Entomol. 85: 392-393.
- Champ, B. R., and C. E. Dyte. 1976. FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests, FAO Plant Production Prot. Ser. 5.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1984. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Prot. Bull. 32: 25-27.
- González-Díaz, J. C. 2002. Evaluación de insecticidas para el control del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyll., en Tela, Jalisco, México. Tesis de Licenciatura U.A.Ch., Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México.
- Heimbach, U., A. Mueller, and T. Thieme. 2006. First steps to analyze pyrethroid resistance of different oil seed rape pests in Germany. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschulzd. 58: 1-5.
- Hill, D. S. 1983. Agricultural insect pests of the tropics and their Control. Cambridge University Press, New York.
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2007. Mode of action and classification of insecticide. Revisado y reeditado en Julio de 2007. [http://www.irc-online.org/documents/moa\\_us.pdf](http://www.irc-online.org/documents/moa_us.pdf).(consulta, 4 de Octubre de 2010).
- Kanga, L. H. B., F. W. Plapp Jr., M. L. Wall, M. A. Karner, R. L. Huffman, T. W. Fuchs, G. W. Elzen, and J. L. Martinez-Carrillo. 1995. Monitoring tolerance to insecticides in boll weevil populations (Coleoptera: Curculionidae) from Texas, Arkansas, Oklahoma, Mississippi, and Mexico. J. Econ. Entomol. 88: 198-204.
- Kerr, R. W. 1977. Resistance to control chemicals in Australian arthropod pests. J. Aust. Entomol. Soc. 16: 327-334.

- Kljajic, P., and I. Peric. 2006. Susceptibility to contact insecticides of granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) originating from different locations in the former Yugoslavia. *J. Stored Prod. Res.* 42: 149-161.
- Lock, G. W. 1962. *Sisal. Twenty-five Years' Sisal Research.* Spottiswoode, Ballantyne and Co., Ltd., London, UK.
- Mello, E. J. R. 1965. Constatacao de resistencia da broca do algodeiro a acao de insecticidas clorados ciclodienos nas condicoes de laboratorio. *Biologico (Brazil)* 34: 257-261.
- Pérez, D., J. F., and J. L. Del Real L. 2007. Enfermedades del cultivo de agave, pp. 169-195. *In* F. O. Rulfo V. [ed.], *Conocimiento y Prácticas Agronómicas para la Producción del Agave tequilana Weber en la Zona de Dominación de Origen del Tequila.* Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
- Pineda, M. G. 1983. Control químico de plagas y enfermedades más comunes del maguey pulquero *Agave altrovirens* karw. Tesis de Licenciatura U.A.Ch., Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México.
- Ramírez-Choza, J. L. 1993. Max del henequén *Scyphophorus interstitialis* Gylh. Bioecología y control. Serie: Libro Técnico. Centro de Investigación Regional del Sureste. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos. Mérida, Yucatán, México.
- Ramoutar, D., S. R. Alm, and R. S. Cowles. 2009. Pyrethroid resistance in populations of *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae) from Southern New England golf courses. *J. Econ. Entomol.* 102: 388-392.
- Ribeiro, B. M., R. N. C. Guedes, E. E. Oliveira, and J. P. Santos. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Products Res.* 39: 21-31.
- Ruiz-Montiel, C., G. García-Coapio, J. C. Rojas, E. A. Malo, L. Cruz-López, I. del Real, and H. González-Hernández. 2008. Aggregation pheromone of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Entomol. Exp. Appl.* 127: 207-217.

- Ruiz-Montiel, C., J. C. Rojas, L. Cruz-López, and H. González-Hernández. 2009. Factors affecting pheromone release by *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 38: 1423-1428.
- SAS Institute. 1999. Version 8.1 SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Siller, J. M. G. 1985. Ciclo biológico del picudo del maguey *S. acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) y algunas consideraciones sobre su impacto económico. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. D.F.
- Solís-Aguilar., J. F., E. H. González-Hernández, A. Valle, J. F. Flores, J. L. Leyva y A. Equihua Martínez. 2000. Control químico del “Picudo del agave” *Scyphophorus acupunctatus* Gylh. (Coleoptera: Curculionidae) en Jalisco, México, pp. 679-682. *In* Memorias del XXXV Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Mexicana de Entomología, Acapulco, Guerrero, México.
- Solís-Aguilar, J. F., H. Hernández González, J. L. Leyva Vázquez., A. Equihua Martínez, F. J. Flores Mendoza, and A. Martínez Garza. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, a agave tequilero pest in Jalisco, México. *Agrociencia* 35: 663-670.
- Terán-Vargas, A. P., and D. A. Wolfenbarger. 2001. Response of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) to malathion and methyl parathion in southern Tamaulipas. *Southwest. Entomol.* 24: 69-73.
- Valdés, M. E., L. Aldana, B. R. Figueroa, O. M. Gutiérrez, R. M. C. Hernández, and M. T. Chavela. 2005. Trapping of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) with two natural baits in a field of *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in the State of Morelos, Mexico. *Fla. Entomol.* 88: 334-338.

## CONCLUSIONES GENERALES

La respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda del picudo del agave al 2-metil-4-octanona no es igual entre las poblaciones de insectos procedentes de diferentes cultivos y regiones geográficas. En ambas respuestas de *S. acupunctatus* interviene la edad de los adultos y los cambios genéticos presentes en el ADN mitocondrial.

Las trampas cebadas con la feromona y cabeza en estado fermentado son más eficientes en el trapeo del picudo del agave que los otros tratamientos. En la cabeza fermentada se identificaron volátiles atractivos que producen sinergia en la respuesta del picudo del agave hacia su feromona de agregación.

Los insecticidas malatión, endosulfán, metomilo y fipronil mostraron mayor eficacia en el control de *S. acupunctatus*. Mientras que los insecticidas cipermetrina, lambda-cihalotrina, deltametrina, y beta-ciflutrin mostraron menor efecto en los adultos del picudo del agave.