



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

## **ATRACCIÓN DEL PICUDO DEL CHILE A COMPUESTOS VOLÁTILES DE SUS HOSPEDEROS**

**Manolo Muñiz Merino**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

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

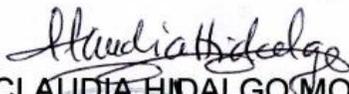
**2013**

La presente tesis titulada: **Atracción del picudo del chile a compuestos volátiles de sus hospederos**, realizada por el alumno Manolo Muñiz Merino, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

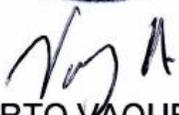
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**FITOSANIDAD**  
**ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

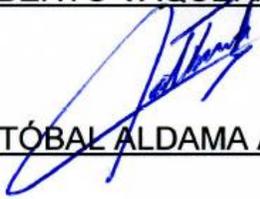
CONSEJO PARTICULAR

  
**CONSEJERO: DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR**

  
**ASESORA: DRA. CLAUDIA HIDALGO MORENO**

  
**ASESOR: DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ**

  
**ASESOR: DR. HUMBERTO VAQUERA HUERTA**

  
**ASESOR: DR. CRISTÓBAL ALDAMA AGUILERA**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2013.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 229415, otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 16 (LPI-16: Innovación Tecnológica) del Colegio de Postgraduados, por el apoyo financiero.

Al Dr. Juan Cibrián Tovar por su asesoría, dirección y apoyo para la realización de esta tesis.

A los Doctores: Néstor Bautista Martínez, Claudia Hidalgo Moreno, Humberto Vaquera Huerta y Cristóbal Aldama Aguilera, por las observaciones, sugerencias o apoyo brindados durante la investigación.

Al Dr. Felipe Tafoya Rangel, por las facilidades y apoyo brindados para el uso de los equipos del laboratorio de Ecología, en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Al Dr. Esteban Rodríguez Leyva, por el préstamo de espacios para establecer experimentos.

Al Dr. Julio Velázquez González, por compartir sus conocimientos acerca del manejo del equipo de cromatografía y espectrometría de masas.

A mi familia, por su apoyo de toda la vida.

A la Psic. Misrai Gutiérrez Gutiérrez, por su apoyo moral.

A mis compañeros del equipo de trabajo del laboratorio de Ecología Química de Insectos: Ing. Ricardo Castro, Dr. Ausencio Azuara, M.C. Estrella Peña, Ing. José Manuel Pineda, Ing. Hanzel Barroso, Ing. Elsy Delgado, Srita. Shaira Margalli y Sr. Eduardo Paredes.

A todas las personas que me brindaron algún tipo de apoyo durante mis estudios de Doctorado.

**Dedico esta tesis:**

A mi Familia

A mi Novia

A Mí

## CONTENIDO

	Página
<b>LISTA DE CUADROS</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>RESUMEN GENERAL</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
<b>1.1. Antecedentes y justificación</b>	1
<b>1.2. Objetivos</b>	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.1. Objetivos particulares	2
<b>1.3. Hipótesis</b>	2
<b>1.4. Revisión de literatura</b>	3
1.4.1. Cultivo de chile	3
1.4.2. Picudo del chile	4
1.4.3. Liberadores de semioquímicos	6
<b>1.5. Literatura citada</b>	7
<b>CAPÍTULO 2. COMPUESTOS VOLÁTILES DE CHILE Y HIERBAMORA, PLANTAS HOSPEDERAS DE <i>Anthonomus eugenii</i> Cano</b>	13
<b>2.1. Resumen</b>	13
<b>2.2. Abstract</b>	14
<b>2.3. Introducción</b>	15
<b>2.4. Materiales y métodos</b>	16
2.4.1. Material vegetal	16
2.4.2. Compuestos químicos	16
2.4.3. Aislamiento y análisis de compuestos	16
<b>2.5. Resultados y discusión</b>	18
<b>2.6. Conclusiones</b>	30
<b>2.7. Literatura citada</b>	30

	Página
<b>CAPÍTULO 3. COMPUESTOS VOLÁTILES DE <i>Capsicum</i> QUE ATRAEN AL PICUDO DEL CHILE Y AUMENTAN EL EFECTO ATRAYENTE DE SU FEROMONA DE AGREGACIÓN</b>	35
<b>3.1. Resumen</b>	35
<b>3.2. Abstract</b>	36
<b>3.3. Introducción</b>	37
<b>3.4. Materiales y métodos</b>	38
3.4.1. Insectos	38
3.4.2. Compuestos químicos	38
3.4.3. Pruebas de atracción	39
3.4.4. Análisis estadístico	40
<b>3.5. Resultados y discusión</b>	42
<b>3.6. Conclusiones</b>	48
<b>3.7. Literatura citada</b>	48
<b>CAPÍTULO 4. LIBERADORES PARA COMPUESTOS VOLÁTILES ATRAYENTES DEL PICUDO DEL CHILE</b>	52
<b>4.1. Resumen</b>	52
<b>4.2. Abstract</b>	53
<b>4.3. Introducción</b>	54
<b>4.4. Materiales y métodos</b>	55
4.4.1. Lugar de estudio	55
4.4.2. Compuestos	55
4.4.3. Liberadores	56
4.4.4. Experimento en túnel de viento	56
4.4.5. Experimento en invernadero	57
4.4.6. Análisis estadísticos	58
<b>4.5. Resultados y discusión</b>	59
4.5.1. Tasas de liberación de cinco tipos de emisores	59
4.5.2. Tasas de liberación de emisores tipo vial en invernadero	64

	Página
4.5.3. Influencia de factores ambientales y del emisor en las tasas de liberación	66
<b>4.6. Conclusiones</b>	68
<b>4.7. Literatura citada</b>	68
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	72

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Compuestos volátiles identificados en las yemas florales de cinco tipos de plantas hospederas de <i>Anthonomus eugenii</i> .	20
Cuadro 2. Compuestos volátiles identificados en los frutos de cinco plantas hospederas de <i>Anthonomus eugenii</i> .	22
Cuadro 3. Proporciones de los compuestos volátiles comunes en especies y tipos de plantas hospederas de <i>Anthonomus eugenii</i> .	26
Cuadro 4. Proporciones de los compuestos volátiles comunes <i>Capsicum annum</i> , plantas hospedera de <i>Anthonomus eugenii</i> .	28
Cuadro 5. Número y cantidad relativa de compuestos volátiles de cada grupo funcional identificado en plantas hospederas de <i>Anthonomus eugenii</i> .	29
Cuadro 6. Compuestos volátiles sintéticos evaluados como atrayentes de <i>Anthonomus eugenii</i> , en cinco series de experimentos realizados en un olfatómetro tipo Y.	41
Cuadro 7. Modelos de regresión lineal múltiple generados para tres compuestos volátiles, liberados en viales de vidrio.	67
Cuadro 8. Contribución de variables en los modelos de regresión generados para tres compuestos volátiles, liberados en viales de vidrio.	67

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Atracción de <i>Anthonomus eugenii</i> hacia compuestos volátiles sintéticos, individuales o combinados.	43
Figura 2. Respuesta de <i>Anthonomus eugenii</i> a los dos mejores estímulos de la primera serie de experimentos.	43
Figura 3. Atracción de <i>Anthonomus eugenii</i> hacia mezclas cuaternarias de compuestos volátiles sintéticos.	44
Figura 4. Efecto de isómeros del (Z)- $\beta$ -Ocimeno en la respuesta de <i>Anthonomus eugenii</i> a compuestos volátiles de su hospedero.	46
Figura 5. Respuesta de <i>Anthonomus eugenii</i> a compuestos volátiles de su hospedero y a su combinación con la feromona de agregación comercial.	47
Figura 6. Tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno en cinco tipos de emisores, utilizando dos solventes.	60
Figura 7. Tasas de liberación de 2-isobutil-3-metoxipirazina en cinco tipos de emisores, utilizando dos solventes.	61
Figura 8. Tasas de liberación de 3-hexen-1-ol-acetato en cinco tipos de emisores, utilizando dos solventes.	62
Figura 9. Tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno (A), 2-isobutil-3-metoxipirazina (B) y 3-hexen-1-ol-acetato (C) en emisores tipo vial, con aceite o hexano como solventes.	63
Figura 10. Tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno (A), 2-isobutil-3-metoxipirazina (B) y 3-hexen-1-ol-acetato (C) en viales de vidrio con orificios en la tapa.	65

## RESUMEN GENERAL

El picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), principal plaga del chile (*Capsicum* spp.) en América, responde a los aromas de sus plantas hospederas, por lo que estos podrían ser de utilidad como fuentes de atrayentes. En la presente investigación se analizaron los compuestos volátiles de las yemas florales y frutos de cinco hospederos de *A. eugenii*: chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.), pimiento morrón (*C. annuum*), chile manzano (*C. pubescens* Ruiz y Pav), chile chiltepe (*C. frutescens* L) y hierbamora (*Solanum americanum* Mill.). En una segunda fase, se evaluó la respuesta conductual de los adultos de *A. eugenii* a mezclas de compuestos volátiles sintéticos y se determinó la efectividad de atracción de la mejor mezcla de volátiles del hospedero en comparación con la feromona de agregación de *A. eugenii* o combinada con ésta. Finalmente, se estudió la dinámica de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y (Z)-3-hexen-1-ol acetato en cinco tipos de emisores potenciales, y su relación con variables ambientales. Los compuestos se capturaron por microextracción en fase sólida (SPME) y se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La respuesta del insecto se evaluó en un olfatómetro tipo Y, mediante experimentos de elección por pares. Las tasas de liberación se determinaron a partir de análisis en GC-MS, de los volátiles colectados por aireación dinámica, o mediante el método gravimétrico. Se identificaron 44 compuestos en los cinco hospederos, 32 de ellos en las yemas florales y 37 en los frutos; hidrocarburos y ésteres fueron los más frecuentes y abundantes. Los ensayos de comportamiento mostraron que una mezcla de (Z)- $\beta$ -ocimeno, D-limoneno y 2-isobutil-3-metoxipirazina atrajo a hembras ( $p=0.022$ ) y machos ( $p=0.005$ ) de *A. eugenii*. El (Z)-3-hexenil acetato y el terpinoleno, adicionados individualmente a la combinación anterior, aumentaron la respuesta de hembras ( $p=0.011$ ) y machos ( $p=0.005$ ), respectivamente. La sustitución de (Z)- $\beta$ -ocimeno por su estereoisómero (E)- $\beta$ -ocimeno propició una mayor atracción de los machos ( $p=0.022$ ), en tanto que la eliminación de su isómero estructural D-limoneno, no disminuyó la efectividad de atracción de la mezcla terciaria de compuestos sintéticos. Los machos respondieron en mayor proporción a la mezcla de compuestos volátiles del hospedero ( $p=0.041$ ) y a su combinación con la feromona de agregación de *A. eugenii* ( $p\leq 0.0001$ ), que a la

feromona sola; en contraste, las hembras no mostraron diferencia en su elección. Uno de los dispensadores evaluados, consistente en un vial de vidrio con tapa de caucho, a la cual se le hicieron orificios, liberó (Z)- $\beta$ -ocimeno, isobutil-3-metoxipirazina y (Z)-3-hexen-1-ol acetato en forma estable. La variación de las tasas de liberación de los compuestos, en este dispositivo, dependió de la temperatura, humedad relativa y/o tiempo de exposición del liberador.

**Palabras clave:** atrayentes, *Anthonomus eugenii*, *Capsicum*, kairomonas, *Solanum americanum*, tasas de liberación.

### ABSTRACT

The pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano), a major pest of pepper (*Capsicum* spp.) in America, responds to scents from its host plants, they could be useful as a source of attractants. In this study, we analyzed the volatile compounds of flower buds and fruits from five host plants of *A. eugenii*: jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.), bell pepper (*C. annuum*), manzano pepper (*C. pubescens* Ruiz and Pav) chiltepe pepper (*C. frutescens* L.) and nightshade (*Solanum americanum* Mill.). In a second phase, we assessed the behavioral response of pepper weevil adults to mixtures of synthetic volatile compounds and determined the attractiveness of the best mixture of host volatiles versus the aggregation pheromone of *A. eugenii* or combined with it. Finally, we studied the release dynamics of (Z)- $\beta$ -ocimene, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine and (Z)-3-hexen-1-ol acetate in five types of potential dispensers, and its relationship with environmental variables. The compounds were collected by solid phase microextraction (SPME) and identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Insect response was evaluated in a Y-type olfactometer by pairwise choice experiments. The release rates were determined after GC-MS analysis of the volatiles collected from the dispensers by headspace, or through the gravimetric method. Forty-four compounds were identified in the five hosts, 32 of them in flower buds and 37 in fruits; hydrocarbons and esters were the most frequent and abundant. Behavioral assays showed that a mixture of (Z)- $\beta$ -ocimene, D-limonene and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine attracted both females ( $p=0.022$ ) and males ( $p=0.005$ ) of *A. eugenii*. The compounds (Z)-3-hexenyl acetate and terpinolene, added individually to the above combination, increased the

response of females ( $p=0.011$ ) and males ( $p=0.005$ ), respectively. Substituting (Z)- $\beta$ -ocimene by its stereoisomer (E)- $\beta$ -ocimene resulted in increased attraction of males ( $p=0.022$ ), while removing its structural isomer D-limonene, did not diminish the attractiveness of the above synthetic mixture. A greater number of males responded to the mixture of host-volatile compounds ( $p=0.041$ ) and to its combination with the aggregation pheromone of *A. eugenii* ( $p\leq 0.0001$ ), than to the pheromone alone; in contrast, females showed no difference in their choice. One of the dispensers evaluated consisting of a glass vial with holes in its rubber cap released (Z)- $\beta$ -ocimene, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine and (Z)-3-hexen-1-ol acetate in a stable manner. The variation in release rates of the compounds, in this device, was dependent on temperature, relative humidity and lifetime of the releaser.

**Key words:** *Anthonomus eugenii*, attractants, *Capsicum*, kairomones, release rates, *Solanum americanum*.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Antecedentes y justificación

El chile (*Capsicum* spp.) se cultiva y consume actualmente en diversos países de los cinco continentes (Nuez *et al.*, 2003). Su demanda para consumo en fresco, en seco o procesado, ha aumentado en los últimos años (SIAP, 2010). Entre las principales limitantes para producir esta solanácea se encuentra el ataque de insectos fitófagos asociados al cultivo. En México y otras zonas tropicales y subtropicales de América, la plaga de mayor importancia económica es el picudo o barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano; Coleoptera: Curculionidae) (Abreu y Cruz, 1985; Andrews *et al.*, 1986; Arcos *et al.*, 1998; Toapanta *et al.*, 2005). Esta especie ocasiona pérdidas que varían entre 20 y 100 % de la producción (Cortez-Mondaca, 2008).

El manejo integrado de una plaga determinada debe considerar técnicas de detección oportunas, así como medidas de control de bajo impacto ambiental y riesgo mínimo para la salud de quienes consumen los productos agrícolas (Abrol y Shankar, 2012). En el caso del picudo del chile, el monitoreo se realiza mediante muestreo visual (Cartwright *et al.*, 1990; Riley *et al.*, 1992) o con el uso de trampas cebadas con una feromona de agregación aislada de los machos (Eller *et al.*, 1994). El primer método es laborioso, consume mucho tiempo y tiene baja confiabilidad (Szendrei *et al.*, 2011), en tanto que la efectividad atrayente de la feromona disminuye considerablemente durante algunas etapas fenológicas (Eller *et al.*, 1994). Respecto al combate del insecto, este se basa casi exclusivamente en el uso de insecticidas, con la realización de hasta 15 aplicaciones por temporada de producción (Cartwright *et al.*, 1990).

Los compuestos volátiles del hospedero, solos o combinados con feromonas de agregación, han mostrado potencial en el desarrollo de atrayentes para diversas especies de curculiónidos (Innocenzi *et al.*, 2001; Tinzaara *et al.*, 2007; Szendrei *et al.*, 2011). Adesso y McAuslane (2009) y Adesso *et al.* (2010) encontraron que los adultos de *A. eugenii* responden a los olores que las plantas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.), hierbamora (*Solanum americanum* Mill) y berenjena (*Solanum melongena* L.) liberan durante la floración y fructificación. Velázquez González (2011) también reportó que las yemas florales y flores de chile serrano estimulan a hembras y machos de *A. eugenii*. Aún no se explotan las sustancias involucradas en dicha

atracción, en el manejo del picudo del chile. Estos compuestos podrían utilizarse para mejorar las técnicas de monitoreo de *A. eugenii* o en el trapeo masivo del insecto, representando así una alternativa al control químico.

## **1.2. Objetivos**

### 1.2.1. Objetivo general

- Buscar kairomonas potenciales para *A. eugenii* en sus plantas hospederas.

### 1.2.2. Objetivos particulares

- Aislar, identificar y comparar los compuestos volátiles que liberan las yemas florales y frutos en desarrollo de cinco tipos de plantas hospederas de *A. eugenii*: chile jalapeño (*C. annuum*), pimiento morrón (*C. annuum*), chile chiltepe (*C. frutescens*), chile manzano (*C. pubescens*) e hierbamora (*Solanum americanum* Mill.).
- Evaluar la efectividad de compuestos volátiles sintéticos y mezclas de los mismos, como atrayentes de hembras y machos adultos del picudo del chile.
- Estudiar la dinámica de liberación de tres compuestos sintéticos, atrayentes del picudo del chile, en cinco tipos de emisores, y determinar la influencia de variables ambientales sobre las tasas de liberación de los mismos.

## **1.3. Hipótesis**

Los perfiles de volátiles de las yemas florales y frutos en desarrollo de chile (*Capsicum* spp.) y hierbamora (*S. americanum*), hospederos de *A. eugenii*, contienen compuestos comunes, que intervienen en la interacción química insecto-planta. Los compuestos sintéticos correspondientes atraen a los adultos de *A. eugenii*, ya sea de forma individual, en mezcla o en combinados con la feromona de agregación que producen los machos coespecíficos. La liberación de los compuestos atrayentes se puede realizar mediante alguno de los emisores comúnmente utilizados para semioquímicos.

## 1.4. Revisión de literatura

### 1.4.1. Cultivo de chile

El chile comenzó a formar parte de la dieta humana desde 7000 años A.C. (Bosland, 1994). Se consume fresco, deshidratado, en salsas o en escabeche, y es útil como saborizante de alimentos, ingrediente farmacéutico, para la obtención de aceites esenciales, oleorresinas y pigmentos, e incluso en la elaboración de cerveza (Bosland, 1996; COVECA, 2011).

Todos los tipos y formas de chile conocidas pertenecen al género *Capsicum* (Solanaceae). Con excepción de *C. anomalum* (Nuez *et al.*, 2003), las especies incluidas en esta categoría taxonómica son originarias de las zonas tropicales y subtropicales de América (Wang y Bosland, 2006). El género está conformado por 30 especies (Wang y Bosland, 2006). Cinco de ellas se cultivan con fines comerciales: *C. annum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L. y *C. pubescens* Ruiz y Pavon (Bosland, 1992). La mayor parte de las variedades de chile que se cultivan a escala comercial corresponden a *C. annum* y, en menor proporción, a *C. frutescens* (chile tabasco) y *C. chinense* (chile habanero) (Bosland, 1994).

*Capsicum annum* es la especie de mayor importancia económica a nivel mundial. Esta incluye frutos dulces y picosos, con una variedad de formas y tamaños (Wang y Bosland, 2006). El centro de origen y domesticación de *C. annum* se localiza en México y Guatemala (Bosland, 1994). La mayor variedad de formas cultivadas y silvestres de esta especie se encuentran en la República Mexicana, distribuidas en todo el territorio nacional (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010; COVECA, 2011).

La diversidad del chile se ha descrito principalmente con base en la clasificación comercial. Esta comprende diferentes tipos de chile, dependiendo de la forma de los frutos. En México existen al menos 55 tipos, entre los que destacan: ancho, serrano, jalapeño, morrón, habanero, mirasol, pasilla, mulato, guajillo, morita, cascabel, manzano, chiltepín y pico de paloma (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010; COVECA, 2011).

El chile es un cultivo económica, social y culturalmente muy importante en México, pues se utiliza en la mayor parte de los platillos (Huerta de la Peña *et al.*, 2007). Nuestro país es el principal consumidor, con un promedio de 15.4 kg per cápita / año (SIAP, 2010) y el segundo productor mundial (después de China) de chile verde, con un

volumen de 2, 131, 740 t (FAO, 2013); esto último representa aproximadamente el 7 % de la producción mundial. El chile se cultiva en todas las entidades federativas del país, desde el nivel del mar hasta una altitud de 2500 m (COVECA, 2011), en una superficie de alrededor de 150,000 ha. La producción nacional se concentra en su mayoría en Chihuahua (42.0 %), Sinaloa (12.9 %), Jalisco (6.6 %) y Michoacán (6.3 %). Los tipos de chile que aportan los mayores porcentajes a este rubro son jalapeño (31.0 %), serrano (10.9 %), poblano (9.7 %) y morrón (8.1 %). Los rendimientos varían entre 7.8 t / ha (en Zacatecas) y 37 t/ha (en Colima), con un promedio nacional de 14.1 t / ha (SIAP, 2010), aunque pueden obtenerse producciones tan bajas como 0.14 t / ha, en parcelas de temporal cultivadas con chile piquín (COVECA, 2011).

México es el principal exportador de chile verde y el sexto en ventas de chile seco al extranjero. En el 2009 se exportaron 734, 499 t; 98.3 % de este volumen se vendió a los Estados Unidos de América, 1 % a Reino Unido, Canadá y Alemania, y el 0.7 % restante a otros 48 países, de los cinco continentes (SIAP, 2010). En el mismo año, se importaron 41,931 t de chile, de 41 países, principalmente de China, Perú y los Estados Unidos de América (SIAP, 2010). Más del 95 % de las exportaciones se realizan entre diciembre y abril, época en que las producciones de los Estados Unidos de América y Canadá son bajas. Los productos frescos más exportados son los chiles tipo bell y jalapeño (COVECA, 2011).

Además de la importancia económica, reflejada en el valor de la producción (que se genera por el consumo nacional y la exportación de chile verde, seco y procesado), el cultivo de chile tiene un impacto social, al generar empleos; tan solo las labores de cosecha requieren, en promedio, de 150 jornales / ha, en zonas de riego (SIAP, 2010).

#### 1.4.2. Picudo del chile

El picudo o barrenillo del chile, como se le conoce comúnmente en México, pertenece a la especie *Anthonomus eugenii* Cano, la cual se ubica taxonómicamente en el orden Coleoptera, familia Curculionidae, subfamilia Curculioninae y tribu Anthonomini (Triplehorn y Johnson, 2005). Este insecto se reportó por primera vez en México, donde actualmente se distribuye en todo el territorio nacional (Arcos *et al.*, 1998). De aquí se dispersó al sur de los Estados Unidos de América (Arizona, California, Florida, Georgia, Louisiana, Nuevo México, Texas y Hawai), y a Centroamérica y el Caribe (El Salvador,

Guatemala, Honduras y Puerto Rico) (O'Brien y Wibmer, 1982; Calvo-Domingo *et al.*, 1989, Andrews *et al.*, 1986; Abreu y Cruz, 1985). En Canadá hubo dos brotes, pero estos se erradicaron (Costello y Gillespie, 1993).

*Anthonomus eugenii* es capaz de sobrevivir en los géneros *Capsicum* y *Solanum*. Sus principales hospederos son especies de chile (*Capsicum* spp.), cultivadas y silvestres (Acosta *et al.*, 1987). Un desarrollo completo del insecto ocurre en chile (*Capsicum* spp.), hierbamora (*Solanum* spp.) y berenjena (*Solanum melongena* L.). Otras solanáceas como *Datura stramonium*, *Nicotiana glauca*, *Petunia parviflora*, *Physalis pubescens*, *Lycopersicon esculentum* y *Solanum tuberosum*, solo le sirven como alimento (Patrock y Schuster, 1992).

El mayor daño del insecto, en especies de *Capsicum*, es la destrucción de yemas florales, flores y frutos, ocasionada por las larvas mientras se alimentan; estas estructuras se tornan amarillos y se desprenden de las plantas (Gordon y Armstrong, 1990). El aborto de frutos es la causa principal de pérdidas en la producción (Segarra-Carmona y Pantoja, 1988). Otras afectaciones incluyen la pudrición interna de los frutos, por la invasión del hongo *Alternaria alternata* (Bruton *et al.*, 1989) y la caída de yemas florales, flores y frutos pequeños, causada por la alimentación de los adultos (Gordon y Armstrong, 1990).

La comunicación química intraespecífica de *A. eugenii* se da mediante feromonas. Dos de estos semioquímicos se han identificado en los adultos del insecto. Eller *et al.* (1994) aislaron e identificaron una feromona de agregación producida por los machos adultos, para atraer a hembras y machos de su misma especie. La mezcla consta de seis compuestos: (Z)-2-(3,3-dimetilciclohexilideno) etanol [grandlure II], (E)-2-(3,3-dimetilciclohexilideno) etanol, (Z)-(3,3-dimetilciclohexilideno) acetaldehído [grandlure III], (E)-(3,3-dimetilciclohexilideno) acetaldehído [grandlure IV], ácido 2,6-octadienoico (ácido geránico) y (E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (geraniol). Varias especies del género comparten los compuestos constituyentes de sus feromonas de agregación, con diferencias en las concentraciones. De las sustancias que conforman la feromona de *A. eugenii*, tres (grandlure II, III y IV) se encuentran también en la feromona de *A. grandis* Boheman (Tumlinson *et al.*, 1969), cuatro (grandlure II, III y IV, y geraniol) en la de *A.*

*musculus* Say (Szendrei *et al.*, 2011) y una en la de *A. rubi* Herbst. (Innocenzi *et al.*, 2001).

Addesso *et al.* (2007) mostraron evidencia de que los tapones de exudados anales (que las hembras del picudo del chile colocan sobre los huevecillos después de depositarlos en los frutos), junto con las heces fecales, contienen una feromona de marcaje, la cual disuade la oviposición de otras hembras; aún no se identifican los compuestos que la conforman.

Los compuestos volátiles de los hospederos de *A. eugenii* parecen jugar un papel importante en la interacción insecto-planta. Así lo muestran los trabajos de Addesso y McAuslane (2009) y Addesso *et al.* (2010), quienes reportan que los adultos de ambos sexos responden a los olores liberados por chile jalapeño (*C. annuum*), hierbamora (*S. americanum*) y berenjena (*S. melongena*). Las estructuras reproductivas (yemas florales, flores y frutos en desarrollo) son las partes de la planta que más estimulan la respuesta de *A. eugenii* (Velázquez-González, 2011).

La atracción hacia compuestos volátiles del hospedero se ha demostrado en otros miembros del género *Anthonomus*. Por ejemplo, *A. grandis* responde a cuatro compuestos producidos por los brotes de algodón:  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno y  $\beta$ -bisabolol (Mynyrd *et al.*, 1969). Similarmente, los volátiles de las flores de manzana (Z)-3-hexen-1-ol, perileno,  $\beta$ -cariofileno, E,E-  $\alpha$ -farneseno y 3-careno atraen a los adultos de *A. pomorum* (Kalinová *et al.* 2000). Los volátiles del hospedero también pueden actuar como potenciadores del efecto atrayente de las feromonas de agregación en especies de *Anthonomus* (Innocenzi *et al.*, 2001; Tinzaara *et al.*, 2007).

En adición al factor químico, la orientación visual podría jugar un papel importante en las especies de *Anthonomus*. Es posible que los curculiónidos tengan un sistema visual tricromático y que incluyan señales visuales, como siluetas y colores de fondo, para localizar a sus hospederos en el campo. Así lo sugiere un estudio realizado en la especie *A. pomorum* (Hausman *et al.*, 2004).

#### 1.4.3. Liberadores de semioquímicos

Los dispositivos para liberación de feromonas, desarrollados hasta ahora, se pueden clasificar en tres grupos (Heuskin *et al.*, 2011): liberadores de matriz sólida, formulaciones líquidas para aspersión y formulaciones tipo reservorio.

En el primer tipo de liberadores, los semioquímicos se incorporan en una matriz sólida. Se han utilizado diversos materiales. Las matrices sólidas más comunes son los tubos, sacos y viales de polietileno (Johansson *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008), los dispensadores de membrana, polímeros en espiral (Tomaszewska *et al.*, 2005), películas de polímeros, septos de caucho (McDonough, 1992; Möttus *et al.*, 1997), cloruro de polivinilo, fibras huecas (Golub *et al.*, 1983), cuerdas impregnadas, formulaciones a base de ceras y liberadores tipo gel (Atterholt *et al.*, 1999).

Las formulaciones asperjables generalmente están compuestas de una matriz líquida biodegradable, en la que se disuelve el semioquímico. La matriz puede consistir de microencapsulados, obtenidos por microemulsión, los cuales contienen el semioquímico disperso en una matriz líquida (Heuskin *et al.*, 2011). Recientemente, se han comenzado a desarrollar formulaciones de este tipo a base de nano-liberadores de semioquímicos. Algunos ejemplos incluyen el uso de encapsulados de poliurea para la liberación prolongada de (Z)-11-hexadecenil acetato, componente principal de las feromonas sexuales de diversas especies de noctuidos (Mihou *et al.*, 2007), y micropartículas a base de polímeros, utilizadas en la liberación de feromonas sexuales para interrumpir la cópula de la palomilla gitana (*Lymantria dispar*), de la palomilla de la manzana (*Cydia pomonella*) (Stipanovic, *et al.*, 2004) y de otros lepidópteros de importancia agrícola (Serban *et al.*, 2010). La ventaja principal de las formulaciones asperjables es que se pueden aplicar a todo el cultivo (Heuskin *et al.*, 2011).

Los liberadores tipo reservorio generalmente se componen de dos partes, un contenedor y un área de difusión. En este grupo se incluyen tubos y viales de vidrio, aluminio u otros materiales impermeables (reservorio), que cuentan con un área de difusión a base de un material permeable, como polietileno o silicón (Hofmeyr *et al.*, 1995; Shem *et al.*, 2009). Los liberadores en aerosol también entran en esta categoría (Heuskin *et al.*, 2011).

### **1.5. Literatura citada**

Abreu, E. and C. Cruz. 1985. The occurrence of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* in Puerto Rico. *Journal of the Agricultural University of Puerto Rico* 69: 223-224.

Abrol, D. P. and U. Shankar. 2012. History, overview and principles of ecologically-based pest management. *In: Integrated pest management, principles and*

- practice. Abrol, D. P. and U. Shankar (eds.). CAB International. London, UK. pp. 1-26.
- Acosta, N., N. Vicente, E. Abreu and S. Medina-Gaud. 1987. Chemical control of *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchus reniformis* and *Anthonomus eugenii* in *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*. *Nematropica* 17: 163-170.
- Addesso, K. M. and H. J. McAuslane. 2009. Pepper weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38: 216-224.
- Addesso, K. M., H. J. McAuslane, and H. T. Albom. 2010. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Addesso, K. M. and H. J. McAuslane, P. A. Stansly and D. J. Schuster. 2007. Host-marking pheromone by female pepper weevils, *Anthonomus eugenii*. *Entomol. Exp. Appl.* 125(3): 269-276.
- Aguilar-Rincón, V. H., T. Corona-Torres, P. López-López, L. Latournerie-Moreno, M. Ramírez-Meraz, H. Villalón-Mendoza y J. A. Aguilar-Castillo. 2010. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- Andrews, K. L., A. Rueda, G. Gandini, S. Evans, A. Arango and M. Avedillo. 1986. A supervised control program for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* in Honduras, Central America. *Tropical Pest Management* 32: 1.4.
- Arcos, G., J. Hernández, D. E. Uriza, O. Pozo, y A. Olivera. 1998. Tecnología para producir chile jalapeño en la planicie costera del Golfo de México. INIFAP–PRODUCE. Secretaría de Agricultura, México. Folleto técnico No. 24. 206 p.
- Atterholt, C.A., M. J. Delwiche, R. E. Rice and J. M. Krochta. 1999. Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *J. Controlled Release* 57: 233-247.
- Bosland, P. W. 1992. Chiles: a diverse crop. *Horttechnology* 2: 6-10.
- Bosland, P.W. 1994. Chiles: history, cultivation, and uses. p. 347-366. In: G. Charalambous (ed.), *Spices, herbs, and edible fungi*. Elsevier Publ., New York.
- Bosland, P.W. 1996. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. p. 479-487. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA.

- Bruton B. D., L. D. Chadler and M. E. Miller. 1989. Relationships between pepper weevil and internal mould of sweet pepper. *Plant Disease* 73: 170-173.
- Calvo-Domingo, G., A. B. Pacheco, J. B. French and E. Alvarado. 1989. Economic analysis of the weevil *Anthonomus eugenii* in Zacapa, Guatemala. *Manejo Integrado de Plagas* 11: 31-50.
- Cartwright, B., T.G. Teague., L. D. Chandler., J.V. Edelson., and G. Bentsen. 1990. An action threshold for management of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae) on bell peppers. *J. Econ. Entomol.* 83: 2003-2007.
- Cortez-Mondaca, E. 2008. Picudo del chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera; Curculionidae). *In: Casos de control biológico en México.* Arredondo-Bernal. H. C. Y L. A. Rodríguez del Bosque (eds.). Ed. Mundi-Prensa. México. pp. 127-135.
- Costello, R.. A. and D. R. Gillespie. 1993. The pepper weevil, *Anthonomus eugenii* as a greenhouse pest in Canada. *Bulletin SROP* 16: 31-34.
- COVECA (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). 2011. Monografía del chile. Gobierno del Estado de Veracruz. México. 31 p.
- Eller, F. J., R. J. Bartelt., B. S. Shasha., D. J. Schuster., D. G. Riley., P. A. Stansly., T. F. Mueller., K. D. Shuler., B. Johnson., J. H. Davis., and C. A. Sutherland. 1994. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 2: 1537-1555.
- FAO (Food and Agriculture Organization for the United Nations). 2013. Top production – chillies and peppers green – 2011. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Golub M., J. Weatherston and M. H. Benn. 1983. Measurement of release rates of gossypure from controlled release formulations by mini-airflow method. *J. Chem. Ecol.* 9(3): 323-333.
- Gordon R. and A. M. Armstrong. 1990. Biología del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), en Puerto Rico. *Journal of Agriculture* 74: 69-73.
- Hausmann, C. J. Samietz and S. Dorn. 2004. Visual orientation of overwintering *Anthonomus pomorum* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 33(5): 1410-1415.

- Heuskin, S.; F. J. Verheggen; E. Haubruge; J. P. Wathelet; G. Lognay. 2011. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(3): 459-470.
- Hofmeyr H. and B. V. Burger. 1995. Controlled-release pheromone dispenser for use in traps to monitor flight activity of false codling moth. *J. Chem. Ecol.* 21(3): 355-363.
- Huerta de la Peña, A., S. Fernández-Rojas e I. Ocampo-Fletes. 2007. Manual de chile poblano, importancia económica y sociocultural. Colegio de Postgraduados. México. 80 p.
- Innocenzi, P. J., D. R. Hall, and J. V. Cross. 2001. Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 27: 1203-1218.
- Johansson B.G., O. Anderbrant, J. Simandl, N. D. Avtzis, C. Salvadori, E. Hedenstrom, H. Edlund and H. E. Hogberg. 2001. Release rates for pine sawly pheromones from two types of dispensers and phenology of *Neodiprion sertifer*. *J. Chem. Ecol.*, 27(4): 733-745.
- Kalinová, B., K. Stránský, J. Harmatha, R. Cvrtecka, and J. Zdárek. 2000. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? *Entomol. Exp. Appl.* 95: 47-52.
- McDonough L.M., W. C. Aller W.C. and A. L. Knight. 1992. Performance characteristics of a commercial controlled release dispenser of sex pheromones for control of codling moth (*Cydia pomonella*) by mating disruption. *J. Chem. Ecol.* 18(12): 2177-2189.
- Milhou, A. P., A. Michaelakis, F. D. Krokos, B. E. Mazomenos and E. A. Couladourus. 2007. Prolonged slow release of (Z)-11-hexadecenil acetate employing polyurea microcapsules. *J. Appl. Entomol.* 131(2): 128-133.
- Minyard, J.P., Hardee, D.D., Gueldner, R.C., Thompson, A.C., Wiygul, G., and Hedin, P.A. 1969. Constituents of the cotton bud. Compounds attractive to the boll weevil. *J. Agric. Food Chem.* 17:1093-1097.

- Möttus, E., V. Nõmm, I. H. Williams and I. Liblikas. 1997. Optimization of pheromone dispensers for diamondback moth *Plutella xylostella*. J. Chem. Ecol. 23(9): 2145-2159.
- Nuez, F., R. Gil-Ortega y J. Costa. 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 607 p.
- O'Brien, C. W. and G. J. Wibmer. 1982. Annotated checklist of the weevils (Curculionidae *sensu lato*) of north America, Central America and the West Indies (Coleoptera: Curculionidae). Memoirs of the American Entomologist Institute 34: 107.
- Patrock R. J. and D. J. Schuster. 1992. Feeding, oviposition and development of the pepper weevil, (*Anthonomus eugenii* Cano), on selected species of Solanaceae. Tropical Pest Management 38: 65-69.
- Riley, D. G., D. J. Schuster., and C. S. Barfield. 1992. Refined action threshold for pepper weevil adults (Coleoptera: Curculionidae) in bell peppers. J. Econ. Entomol. 85: 1919-1925.
- Segarra-Carmona A. E. and A. Pantoja. 1988. Secuential sampling plan, yield loss components and economic tresholds for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 72: 375-385.
- Serban, F. P., F. Oancea, O. A. Siciua, F. Constanstinescu and S, Dinu. 2010. Responsive polymers for crop protection. Polymers 2(3): 229-251.
- Shem, P.M., P. M. Shiundu, N. K. Giconyo, A. H. Ali and R. K. Saini. 2009. Release kinetics of a synthetic tsetse allomone derived from waterbuck odour from a Tygon silicon dispenser under laboratory and semi field conditions. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 6(6): 625-636.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Un panorama del cultivo del chile. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). México. 20 p.
- Stipanovic, A.J., P. J. Hennessy, F. X. Webster and Y. Takahashi. 2004. Microparticle dispensers for the controlled release of insect pheromones. J. Agric. Food Chem. 52: 2301-2308.

- Szendrei, S., A. Averill, H. Alborn, and C. Rodríguez-Saona. 2011. Identification and field activity of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- Tinzaara, W., C. S. Gold, M. Dicke, A. Van Huis, and P. Ragama. 2007. Host plant odours enhance the response of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone Cosmolure. *Int. J. Pest Manage.* 53: 127-137.
- Toapanta, M. A., D. J. Schuster, and P. A. Stansly. 2005. Development life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 34: 999-1008.
- Tomaszewska, E., V. R. Hebert, J. F. Brunner, V. P. Jones, M. Doerr and R. Hilton. 2005. Evaluation of pheromone release from commercial mating disruption dispensers. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 2399-2405.
- Triplehorn, Ch. A. and N. F. Johnson. 2005. Borror and DeLong's introduction to the study of insects. 7th edition. Thompson Learning Inc. USA. 864 p.
- Tumlinson, J.H., Hardee, D.D., Gueldner, R.C., Thompson, A.C., Hedin, P.A., and Minyard, J.P. 1969. Sex pheromones produced by male boll weevil: isolation, identification, and synthesis. *Science.* 166:1010-1012.
- Velázquez-González. 2011. Compuestos volátiles que median la interacción entre *Anthonomus eugenii* Cano y *Capsicum annuum*. Tesis de Doctorado. Postgrado en Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, México. 59 p.
- Wang, D. and P. W. Bosland. 2006. The genes of *Capsicum*. *Hortscience* 41(5): 1169-1187.
- Zhang, A., L. F. Kuang, N. Maisin, B. Karumuru, I. Viridiana, S. Lambert, H. Bin-Purung, S. Wang and P. Hebbar. 2008. Activity evaluation of cocoa pod borer sex pheromone in cacao fields. *Environ. Entomol.* 37(3): 719-724.

## CAPÍTULO 2. COMPUESTOS VOLÁTILES DE CHILE Y HIERBAMORA, PLANTAS HOSPEDERAS DE *Anthonomus eugenii* Cano

### 2.1. Resumen

Los adultos del picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) responden a los olores que liberan las estructuras reproductivas de sus plantas hospederas. Los compuestos volátiles que conforman dicho aroma podrían ser de utilidad como atrayentes del insecto. En la presente investigación se aislaron, identificaron y cuantificaron los compuestos volátiles producidos por las yemas florales y frutos en desarrollo de cinco hospederos de *A. eugenii*: chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.), pimiento morrón (*C. annuum*), chile manzano (*C. pubescens* Ruiz y Pav), chile chiltepe (*C. frutescens* L.) y hierbamora (*Solanum americanum* Mill.). Los compuestos volátiles se capturaron por el método de microextracción en fase sólida (SPME) y se analizaron en un cromatógrafo de gases (HP-6890) acoplado a un espectrómetro de masas (HP-5973). En total, se identificaron 44 compuestos en los cinco hospederos; 32 de ellos en las yemas florales y 37 en los frutos. Las sustancias más frecuentes fueron hidrocarburos (13) y ésteres (11). Estas representaron más del 70 % de la masa total de los compuestos identificados en ambas estructuras vegetales de cada hospedero. Los compuestos (Z)-3-hexenol, (E)- $\beta$ -ocimeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, metil salicilato,  $\beta$ -elemeno, hexil acetato, (Z)-3-hexenil butirato, (Z)-3-hexenil isovalerato, (Z)-3-hexenil isobutirato, hexil butirato y (E)-2-hexenil-2-metilbutirato, estuvieron presentes en los cuatro tipos de chile; los primeros cinco coincidieron en todos los hospederos bajo estudio. Se discute el potencial de estas sustancias como atrayentes de *A. eugenii*.

**Palabras clave:** atrayentes, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum pubescens*, picudo del chile, *Solanum americanum*.

## 2.2. Abstract

It is known that the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) adults respond to odors released by reproductive structures of their host plants. The volatile compounds that constitute this scent could be useful as attractants for the insect. In this research, we isolated, identified and quantified the volatile compounds produced by the flower buds and young fruits from five host plants of *A. eugenii*: jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.), bell pepper (*C. annuum*), manzano pepper (*C. pubescens* Ruiz and Pav.) chiltepe pepper (*C. frutescens* L) and nightshade (*Solanum americanum* Mill.) The volatiles were collected by the method of solid phase microextraction (SPME) and analyzed in a gas chromatograph (HP-6890) coupled to a mass spectrometer (HP-5973). A total of 44 compounds were identified in the five hosts, 32 of them in flower buds and 37 in the fruits. Hydrocarbons and esters were the most common substances. These accounted for over 70% of the total mass of the compounds identified in both structures of each host plant. The compounds (Z)-3-hexenol, (E)- $\beta$ -ocimene, (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene, methyl salicylate,  $\beta$ -elemene, hexyl acetate, (Z)-3-hexenyl butyrate, (Z)-3-hexenyl isovalerate, (Z)-3-hexenyl isobutyrate, hexyl butyrate and (E)-2-hexenyl-2-methylbutyrate, were present in the four types of pepper; the first five ones were common to all hosts. The potential of these substances as attractants for *A. eugenii* is discussed.

**Key words:** attractants, *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum pubescens*, pepper weevil, *Solanum americanum*.

### 2.3. Introducción

La producción de compuestos volátiles es la forma principal en que las plantas interactúan con otros organismos. Los insectos herbívoros utilizan estas sustancias para localizar a sus plantas hospederas (Das *et al.*, 2013).

*Anthonomus eugenii* es la principal plaga del cultivo de chile (*Capsicum* spp.) en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Toapanta *et al.*, 2005). Las hembras de esta especie ovipositan en las yemas florales, flores o frutos de diversos tipos y especies de chile (Patrock y Schuster, 1992; Berdegue *et al.*, 1994). Al emerger, las larvas barrenan el interior de estas estructuras reproductivas, mientras se alimentan de ellas. Como resultado, las yemas florales, flores y frutos se desprenden de las plantas; su aborto constituye el principal componente de las pérdidas ocasionadas por el insecto (Segarra-Carmona y Pantoja, 1988). Aunado a lo anterior, el ataque de *A. eugenii* facilita la infección de los frutos por microorganismos, como el hongo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Bruton *et al.*, 1989). Los adultos de *A. eugenii* también se alimentan de las plantas de chile (Patrock y Schuster, 1992), aunque su daño es poco significativo, comparado con el de las larvas.

*Anthonomus eugenii* solo sobrevive en plantas de la familia Solanaceae. Un desarrollo completo del insecto ocurre en su principal hospedero, chile (*Capsicum* spp.), y en dos hospederos alternos, hierbamora (*Solanum* spp.) y berenjena (*S. melongena* L.). Sin embargo, también es capaz de alimentarse en especies de los géneros *Physalis*, *Lycopersicon*, *Datura*, *Petunia* y *Nicotiana* (Patrock y Schuster, 1992).

De acuerdo con estudios anteriores (Addesso y McAuslane, 2009; Addesso *et al.*, 2010), los adultos de *A. eugenii* son atraídos por los olores que liberan las plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y hierbamora (*Solanum americanum* Mill.), durante su floración y fructificación. Los compuestos que conforman el aroma de las estructuras reproductivas de tales plantas hospederas, podrían ser de utilidad en programas de manejo integrado del picudo del chile. Por lo tanto, en la presente investigación se planteó el objetivo de aislar, identificar y cuantificar los compuestos volátiles producidos por las yemas florales y frutos en desarrollo de chile y hierbamora. Considerando que *A. eugenii* tiene diversos hospederos y que los compuestos volátiles de éstos pueden variar con la especie y variedad vegetal (Takabayashi *et al.*, 1994), se incluyeron cuatro

tipos de chile cultivado (jalapeño, morrón, manzano y chiltepe) y una especie de hierbamora (*Solanum americanum* Mill.). Los chiles pertenecen a las especies *C. annuum* L. (jalapeño y morrón), *C. frutescens* L. (chiltepe), y *C. pubescens* Ruiz y Pav. (manzano); las tres son susceptibles al ataque de *A. eugenii* (Patrock y Schuster, 1992; Berdegue *et al.*, 1994).

## **2.4. Materiales y métodos**

### **2.4.1. Material vegetal**

Las plantas de chile manzano cv Puebla (Universidad Autónoma Chapingo), chile chiltepe (criollo proveniente de la región Valles Centrales, Oaxaca, México), chile jalapeño cv Don Benito (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Centro de Investigación Regional Noreste — INIFAP-CIRNE), pimiento morrón cv California Wonder (Petoseed) y hierbamora, se cultivaron en invernadero. La semilla de hierbamora se obtuvo de plantas silvestres, colectadas en el municipio de Tecamatlán, Puebla, México, las cuales se identificaron como *Solanum americanum* Mill.; ejemplares de las mismas se depositaron en el herbario-hortorio Chapa (Colegio de Postgraduados, campus Montecillo; Postgrado de Botánica). La siembra se realizó en bolsas de plástico negro, de 25 x 25 cm, utilizando suelo agrícola como sustrato. Se aplicaron los riegos necesarios y se fertilizó con Yaramila Unik 16® (16-16-16; Yara México; Jalisco, México).

### **2.4.2. Compuestos químicos**

Se utilizaron los siguientes estándares (se indica su pureza): trans- $\beta$ -ocimeno [mezcla de (E)- $\beta$ -ocimeno (89.1 %) y (Z)- $\beta$ -ocimeno (10.2 %)], cis- $\beta$ -ocimeno [mezcla de (Z)- $\beta$ -ocimeno (63.4 %) y D-limoneno (26.6 %)], D-limoneno (98 %), 2-isobutil-3-metoxipirazina (99 %),  $\beta$ -ionona (90 %), tetrametil pirazina (98 %), hexil butirato (98 %), (Z)-3-hexenil acetato (98 %), (Z)-3-hexenol (98 %), terpinoleno (90 %), (Z)-3-hexenil butirato (98 %), geraniol (98 %), y salicilato de metilo (98 %). Estos se adquirieron en Sigma-Aldrich de México (Toluca, Estado de México, México).

### **2.4.3. Aislamiento y análisis de compuestos**

Los compuestos volátiles de yemas florales y frutos en desarrollo, de los cuatro tipos de chile y de la hierbamora, se colectaron mediante el método de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) (Balasubramanian y Panigrahi, 2011),

empleando una fibra de polidimetilsiloxano (100  $\mu\text{m}$  PDMS; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Los frutos de chile tenían una longitud de  $1.6 \pm 0.4$  cm y los de hierbamora  $0.6 \pm 0.2$  cm de diámetro ecuatorial. La fibra se acondicionó en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG/DSM 6890/5973; Agilent, Palo Alto, CA, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante; su limpieza se verificó en el mismo equipo.

En un frasco de vidrio (25 mL de capacidad), previamente enjuagado con cloruro de metileno grado HPLC (J. T. Baker; Toluca, Estado de México, México) y mantenido en un horno a 200 °C durante dos horas, se depositaron 80 yemas florales o cuatro frutos de chile, recién cortados de las plantas. La abertura del frasco se cubrió con dos capas de papel aluminio (previamente tratado con calor, junto con los frascos) y dos de cinta adhesiva transparente. Entre las capas de cinta adhesiva se colocó un tapón de caucho rojo, de 11 mm de diámetro (Agilent Technologies de México; México D. F.). Alrededor de la abertura se colocó más cinta adhesiva, para sellarla, y evitar fuga de compuestos y contaminación del sistema. Después de 5 min de estabilización, el dispositivo de SPME se insertó a través del septo de caucho y su fibra se expuso en el espacio libre del frasco durante 30 min. Inmediatamente después, la fibra se desadsorbió por 10 min en el puerto de inyección del cromatógrafo.

La colecta de los compuestos volátiles se realizó en el laboratorio de Ecología Química de Insectos (Colegio de Postgraduados: Entomología), entre las 11:00 y 17:00 horas, a temperatura ambiente ( $26 \pm 1$  °C). Se efectuaron cuatro repeticiones, por tipo de hospedero y estructura vegetal, en días diferentes. Los índices de retención de Kovats (IUPAC, 2006) se determinaron mediante la inyección conjunta de una mezcla de alcanos de 7 a 20 carbonos (Sigma-Aldrich; Toluca, Estado de México, México).

Las muestras se analizaron en el CG/DSM, mencionado con anterioridad. Este se mantuvo con el inyector a 200 °C, en modo *splitless*; el horno inició en 40 °C e incrementó  $10$  °C  $\text{min}^{-1}$ , hasta llegar a 200 °C, por lo que el tiempo de la corrida fue de 16 min. Las demás condiciones de operación del equipo fueron las mismas descritas por Velázquez-González *et al.* (2011).

Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con los de estándares auténticos. Cuando se careció de ellos, los

espectros de los compuestos desconocidos y sus índices de retención, se compararon con los espectros de la biblioteca NIST 2002 o con los índices reportados previamente en literatura relacionada, respectivamente.

La cuantificación se realizó por el método del estándar externo de un solo punto (Skelton *et al.*, 2010). La abundancia de los compuestos cuyos estándares no estuvieron disponibles se estimó con alguna sustancia de estructura química semejante. Los compuestos de referencia se diluyeron en cloruro de metileno grado HPLC (J. T. Baker; Toluca, Estado de México, México). 1  $\mu$ L de solución, conteniendo 10 ng de cada compuesto, se introdujo en el frasco de captura, con la ayuda de una jeringa Hamilton<sup>®</sup> (Hamilton Company; Reno, Nevada, USA) de 5  $\mu$ L. Su captura e inyección en el CG se realizaron en las mismas condiciones descritas para el análisis de muestras vegetales.

## 2.5. Resultados y discusión

Se identificaron 44 compuestos en las estructuras reproductivas de los cinco tipos de plantas (correspondientes a cuatro especies vegetales) incluidas en este estudio. Treinta y dos de ellos estuvieron presentes en las yemas florales (Cuadro 1) y 37 en los frutos (Cuadro 2). Algunas de esas sustancias se han reportado previamente como parte del perfil de compuestos volátiles de especies vegetales en las que se desarrolla *Anthonomus* spp., tales como *C. annuum* (In-Kyung, *et al.*, 2007; Adesso *et al.*, 2010), *C. chinense* (Pino *et al.*, 2006; Gahunu *et al.*, 2011; Dos Santos-Garruti *et al.*, 2013) y *C. frutescens* (Cardeal *et al.*, 2006; Quijano y Pino, 2010), hospederos de *A. eugenii*, y *Vaccinium corymbosum* L. (Szendrei *et al.*, 2009), hospedero de *A. musculus*.

Los volátiles (E)- $\beta$ -ocimeno [BOCLe], (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno [DMNT] y  $\beta$ -Elemeno (BELEM) se encontraron de manera consistente en las yemas florales de los cinco tipos de plantas. Otras dos sustancias, (Z)-3-Hexenol [Z3HOL] y metil salicilato [MESA] también fueron identificadas en las cuatro especies, pero sólo en cuatro tipos de plantas, ya que no se detectaron en chile jalapeño (Cuadro 1). Su ausencia en este último tipo de chile podría estar relacionada con la variedad, pues la presencia y abundancia de los volátiles que libera *Capsicum* spp. dependen parcialmente de este factor (Dos Santos- Garruti *et al.*, 2013; Quijano y Pino, 2010).

Diez sustancias coincidieron en las tres especies del género *Capsicum*, principal hospedero de *A. eugenii* (Patrock y Schuster, 1992): Z3HOL, 1-Hexanol (1HOL), BOCle, DMNT, (Z)-3-Hexenil isobutirato (Z3HIB), (Z)-3-hexenil butirato (Z3HB), Hexil butirato (HBUT), MESA, (Z)-3-Hexenil isovalerato (Z3HIV) y BELEM; cinco de ellas (BOCle, DMNT, Z3HB, Z3HIV y BELEM) se presentaron en los cuatro tipos de chile (Cuadro 1).

Los frutos de las tres especies de *Capsicum* analizadas produjeron consistentemente nueve sustancias: hexanal (HNAL), Z3HOL, 1HOL, BOCle, DMNT, Z3HB, HBUT, MESA y Z3HIV. De estas, HBUT y Z3HIV no fueron detectables en jalapeño, por lo que solo siete (HNAL, Z3HOL, 1HOL, BOCle, DMNT, Z3HB y MESA) coincidieron en frutos de los cuatro tipos de chile (Cuadro 2). Los compuestos BOCle, DMNT y MESA se identificaron en los cinco tipos de plantas (Cuadro 2).

De los 44 compuestos presentes en yemas florales o frutos, de uno o más tipos de plantas, 25 resultaron comunes a ambas estructuras reproductivas. Cinco sustancias (Z3HOL, BOCle, DMNT, MESA y BELEM) coincidieron en los cinco tipos de plantas; trece [HNAL, Z3HOL, 1HOL, Hexil acetato (HAC), BOCle, DMNT, Z3HIB, Z3HB, HBUT, MESA, Z3HIV, (E)-2-Hexenil-2-metilbutirato (H2MB) y BELEM], en los cuatro tipos de plantas correspondientes a las tres especies de *Capsicum*; y diez (HNAL, Z3HOL, 1HOL, HAC, BOCle, DMNT, Z3HB, MESA, Z3HIV y BELEM) coincidieron en las tres especies de *Capsicum*, pero solo en tres tipos de planta (debido a que en chile jalapeño no se detectó Z3HIB, HBUT y H2MB) (Cuadro 3).

De los cinco compuestos comunes en yemas florales y frutos de todos los tipos de plantas, los que mostraron la mayor abundancia fueron BOCle (en pimiento morrón, chile jalapeño y chile manzano), Z3HB (en chile chiltepe) y MESA (en hierbamora) (Cuadro 3).

**Cuadro 1. Compuestos volátiles identificados en las yemas florales de cinco tipos de plantas hospederas de *Anthonomus eugenii*.**

No. †	Compuesto	IR <sup>††</sup>	Cantidad de cada compuesto (ng / g de muestra / hora) por tipo de hospedero				
			Pimiento	Chile	Chile	Chile	Hierba
			morrón	jalapeño	chiltepe	manzano	mora
1	Hexanal	802	–¶	–	–	0.44	–
2	(Z)-3-Hexenol	861	0.25	–	2.89	0.72	1.55
3	1-Hexanol	873	0.21	–	1.37	1.26	–
4	Butil butirato	996	0.15	0.12	–	–	0.37
5	(Z)-3-Hexenil acetato	1008	0.58	0.24	3.31	–	1.43
6	Hexil acetato	1014	0.30	–	0.60	–	–
7	(Z)-β-ocimeno	1041	0.14	0.16	–	–	–
8	(E)-β-ocimeno	1053	9.56	5.79	11.60	0.14	3.17
9	(Z)-3-Hexenil propionato	1099	0.21	–	–	–	–
10	Linalool	1107	0.26	–	–	–	–
11	(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	1118	0.06	0.78	0.55	0.67	10.76
12	E,E-Cosmeno	1137	–	0.19	–	–	–
13	(Z)-3-Hexenil iso-butirato	1145	0.89	–	1.44	0.20	–
14	Etil benzoato	1178	–	–	0.15	–	–
15	(Z)-3-hexenil butirato	1187	8.75	0.11	14.63	0.80	–
16	Hexil butirato	1191	5.05	–	2.28	0.31	–
17	Metil salicilato	1207	0.93	–	4.72	1.87	14.58
18	(Z)-3-Hexenil isovalerato	1233	1.33	0.17	4.46	0.15	–

**Cuadro 1. Continuación.**

No. †	Compuesto	IR <sup>††</sup>	Cantidad de cada compuesto (ng / g de muestra /				
			h) por tipo de hospedero				
			Pimiento morrón	Chile jalapeño	Chile chiltepe	Chile manzano	Hierba mora
19	(E)-2-Hexenil 2-metilbutirato	1236	1.11	– <sup>¶</sup>	0.89	–	–
20	Dimetil salicilato	1349	–	–	0.13	–	1.43
21	(Z)-3-Hexenil Hexanoato	1384	–	–	0.18	–	–
22	Copaeno	1388	–	–	–	0.88	–
23	β-Elemeno	1402	5.30	0.25	0.75	1.41	8.14
24	β-Cariofileno	1436	–	–	–	–	0.60
25	(E)-α-Bergamoteno	1445	–	0.47	–	–	0.88
26	(E)-Geranil acetona	1456	–	–	–	–	7.20
27	Germacreno-D	1504	–	–	–	4.88	–
28	(E,E)-α-Farneseno	1511	–	0.23	–	–	1.33
29	δ-Cadinene	1539	–	–	–	0.66	–
30	(E)-Nerolidol	1571	–	–	–	–	1.18
31	(E,E)-4,8,12-Trimetil- 1,3,7,11-tridecatetraeno	1583	0.59	0.82	0.83	–	16.06
32	Hexil benzoato	1589	0.25	–	–	–	–

† Número consecutivo asignado a cada compuesto. †† Índice de retención de Kovats. ¶ Compuesto no detectado.

**Cuadro 2. Compuestos volátiles identificados en los frutos de cinco plantas hospederas de *Anthonomus eugenii*.**

No. †	Compuesto	IR††	Cantidad de cada compuesto (ng / g de muestra / h) por tipo de hospedero				
			Pimiento	Chile	Chile	Chile	Hierba
			morrón	jalapeño	chiltepe	manzano	mora
1	Hexanal	802	0.10	0.28	0.30	0.78	–†
2	(E)-2-Hexenal	855	–	0.12	–	0.27	–
3	(Z)-3-Hexenol	861	0.24	0.90	4.82	0.76	–
4	1-Hexanol	873	0.11	0.84	5.24	1.88	–
5	Triciclono	926	0.61	0.52	0.60	–	–
6	1R- $\alpha$ -Pinenol	937	–	–	–	–	0.10
7	$\beta$ -Mirceno	993	–	–	–	–	0.24
8	Butil butanoato	996	–	0.22	–	–	0.20
9	(Z)-3-Hexenil acetato	1008	0.46	1.20	8.89	–	–
10	Hexil acetato	1014	0.12	0.67	4.44	–	–
11	D-Limoneno	1036	–	–	–	–	0.58
12	(Z)- $\beta$ -ocimeno	1041	1.35	–	–	–	–
13	(E)- $\beta$ -ocimeno	1053	134.85	1.14	0.74	3.29	1.58
14	Terpinoleno	1093	–	–	–	–	0.36
15	Linalool	1107	0.20	–	–	–	–
16	(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	1118	2.80	0.88	0.11	0.10	0.61
17	1,3,8-p-Mentatrieno	1129	0.17	–	–	–	–
18	E,E-Cosmeno	1137	1.59	–	–	–	–
19	cis-3-Hexenil iso-butarato	1145	0.17	–	0.42	–	–

**Cuadro 2. Continuación.**

No. †	Compuesto	IR <sup>††</sup>	Cantidad de cada compuesto (ng / g de muestra / h) por tipo de hospedero				
			Pimiento	Chile	Chile	Chile	Hierba
			morrón	jalapeño	chiltepe	manzano	mora
20	2-Isobutil-3-metoxipirazina	1185	1.37	0.26	– <sup>‡</sup>	–	–
21	(Z)-3-hexenil butirato	1187	3.35	0.12	6.35	0.41	–
22	Hexil butirato	1191	0.67	–	2.43	0.32	–
23	Metil salicilato	1207	0.66	1.48	6.21	0.36	0.27
24	(Z)-3-Hexenil isovalerato	1233	0.46	–	0.64	0.05	–
25	(E)-2-Hexenil 2-metilbutirato	1236	–	–	0.21	0.05	–
26	Dimetil salicilato	1349	–	–	0.05	–	–
27	2-Metiltridecano	1364	–	–	0.41	–	–
28	(Z)-3-Hexenil hexanoato	1384	–	–	0.25	–	–
29	Copaeno	1388	1.42	–	–	–	–
30	β-Elemeno	1402	4.11	–	–	0.71	0.49
31	α-Santaleno	1430	0.38	0.15	–	–	–
32	(E)-α-Bergamoteno	1445	6.36	2.59	–	–	0.10
33	(E)-Geranil acetona	1456	–	–	–	0.10	–
34	(E)-β-Farneseno	1459	2.29	0.79	–	–	0.27
35	(E,E)-α-Farneseno	1511	–	–	–	–	0.14
36	β-Himachaleno	1526	0.69	–	–	–	–
37	(E,E)-4,8,12-Trimetil- 1,3,7,11-tridecatetraene	1583	6.03	0.96	0.12	–	0.11

† Número consecutivo asignado a cada compuesto. †† Índice de retención de Kovats. ‡ Compuesto no detectado.

Los cinco compuestos volátiles (Z3HOL, BOCle, DMNT, MESA y BELEM) que coincidieron en los cinco tipos de plantas analizadas (Cuadro 3) podrían tener importancia en la atracción de *A. eugenii* hacia las plantas de Chile. En un trabajo previo (Addesso *et al.*, 2010) las plantas de Chile jalapeño con frutos dañados por la alimentación de adultos de *A. eugenii* fueron más atractivas para insectos coespecíficos, que las que tenían frutos intactos; análisis del perfil de volátiles mostraron que una serie de sustancias, entre ellas Z3HOL, BOCle, DMNT, MESA y BELEM, eran liberadas en mayor cantidad en los primeros. Lo anterior, aunado al hecho de que todos los tipos de plantas incluidas en este estudio son susceptibles al ataque del picudo del Chile, sugiere que las cinco sustancias mencionadas podrían estar funcionando como señales olfativas en la localización del hospedero por *A. eugenii*.

BOCle fue el compuesto liberado en mayor cantidad por el pimiento morrón, Chile jalapeño y Chile manzano (Cuadro 3). Similarmente, Addesso *et al.* (2010), determinaron que el pico más sobresaliente en el perfil de volátiles de Chile jalapeño correspondía a BOCle. Tal compuesto actúa como atrayente de varias especies de coleópteros, incluyendo *Myllocerinus aerolineatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae; Sun *et al.*, 2010), *Scolytus intricatus* Ratzeburg (Coleoptera: Scolytidae; Vrkočová *et al.*, 2000) y *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae; Bartelt *et al.*, 2009), por lo que podría ser clave en la interacción de *A. eugenii* con sus hospederos.

Al igual que BOCle, los otros cuatro compuestos han sido reportados como constituyentes de semioquímicos con actividad atrayente sobre diversas especies pertenecientes a Curculionidae u otras familias de Coleoptera. Por ejemplo, Z3HOL y DMNT también forman parte del atrayente de *M. aerolineatus*, junto con BOCle (Sun *et al.*, 2010). Z3HOL es componente de mezclas que atraen a diversos curculionidos, como *A. pomorum* Linnaeus (Kalinová *et al.*, 2000), *Tanymecus dilaticollis* Gyllenhal (Toshova *et al.*, 2010) y *Otiorhynchus sulcatus* (Van Tol y Visser, 1998). El metil salicilato ha mostrado poder estimulante sobre coleópteros tales como *Pachnoda interrupta* Oliver (Coleoptera: Scarabaeidae; Wolde Hawariat *et al.*, 2005), *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae; Martel *et al.*, 2005) e *Hylastinus obscurus* Marsham (Coleoptera: Scolytidae; Kamm y Buttery, 1984). BELEM forma

parte de una kairomona que interviene en la comunicación sexual de *Anoplophora malasiaca* Thompson (Coleoptera: Cerambycidae; Yasui *et al.*, 2008).

Es conocido que el picudo del chile se desarrolla principalmente en *Capsicum* spp. y que sólo utiliza a *S. americanum* como hospedero alterno (Patrock y Schuster, 1987 y 1992). El factor olfativo está relacionado con tal preferencia, ya que los olores de las plantas de chile son más estimulantes para los adultos de *A. eugenii*, que los de las plantas de hierbamora (Addesso y McAuslane, 2009). Es posible que compuestos de *Capsicum* spp., no presentes en *S. americanum*, contribuyan a tal diferencia. En este trabajo se identificaron 10 compuestos volátiles comunes a las tres especies de chile bajo estudio (Cuadro 3): Z3HOL, BOCle, DMNT, MESA, BELEM, HAC, Z3HB, Z3HIV, Z3HIV y HBUT. Los últimos cinco fueron exclusivos de *Capsicum* spp.; de estos, HAC está reportado como parte de una mezcla de volátiles del hospedero que atrajo al curculiónido *Conotrachelus nenuphar* Herbst (Prokopy *et al.*, 2001), por lo que es probable que intervenga en la interacción *A. eugenii*-*Capsicum*.

De las tres especies de chile analizadas en este estudio, *Capsicum annuum* es la que se cultiva más extensivamente en el mundo (Bosland, 1994). Hay evidencias de que, tanto *C. annuum* (Bosland, 1994) como *A. eugenii* (Rodríguez-Leyva, 2006; Capinera, 2008) se originaron en México y parte de Centroamérica. Esto supone un proceso coevolutivo más prolongado de *A. eugenii* con *C. annuum*, en comparación con las otras especies del género *Capsicum*. Lo anterior, aunado a que todos los tipos de chile de la especie *C. annuum* evaluados hasta ahora han resultado ser susceptibles a *A. eugenii* (Patrock y Schuster, 1992; Berdegue *et al.*, 1994), sugiere que la fracción volátil de *C. annuum* contiene compuestos importantes en la interacción química *Capsicum*-*A. eugenii*.

Los análisis cromatográficos de pimiento morrón y chile jalapeño (*C. annuum*), realizados en la presente investigación, mostraron veinte compuestos comunes en las estructuras reproductivas de los dos tipos de chile (Cuadro 4). Algunos de estos ya han sido identificados en *C. annuum*, o forman parte de mezclas que atraen a insectos de taxa cercanos a *A. eugenii*. Entre estos se puede mencionar al (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraene (TMTT).

**Cuadro 3. Proporciones de los compuestos volátiles comunes en cinco tipos de plantas hospederas de *Anthonomus eugenii*.**

Compuesto	Proporciones <sup>†</sup> de los compuestos (%)				
	<i>C. annuum</i>		<i>C. frutescens</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>S. americanum</i>
	Pimiento morrón	Chile jalapeño	(Chile chiltepe)	(Chile manzano)	(Hierbamora)
(Z)-3-Hexenol	0.24	4.01	8.29	6.30	2.11
(E)-β-ocimeno	69.94	30.90	13.28	14.65	6.44
(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	1.39	7.40	0.70	3.08	15.42
Metil salicilato	0.77	6.59	11.76	9.53	20.15
β-Elemeno	4.56	1.11	0.80	9.07	11.70
Hexanal	0.05	1.24	0.32	5.20	– <sup>††</sup>
1-Hexanol	0.15	3.76	7.10	13.38	–
Hexil acetato	0.20	2.98	5.42	0.10	–
(Z)-3-hexenil butirato	5.86	1.03	22.56	5.17	–
(Z)-3-Hexenil isovalerato	0.87	0.77	5.49	0.86	–
(Z)-3-Hexenil isobutirato	0.51	–	2.00	0.86	–
Hexil butirato	2.77	–	5.06	2.66	–
(E)-2-Hexenil 2-metilbutirato	0.54	–	1.18	0.21	–
Proporción acumulada (primeros 5 compuestos)	76.89	50.01	34.82	42.63	55.82
Proporción acumulada (primeros 10 compuestos)	84.02	59.78	75.72	67.34	
Proporción acumulada (13 compuestos)	87.84		83.97	71.07	

<sup>†</sup> Se calcularon con relación a la cantidad total de los compuestos del tipo de planta correspondiente. <sup>††</sup> El guion indica que el compuesto de esta fila no se detectó en el tipo de planta de la columna correspondiente.

La abundancia de TMTT es mayor en plantas de chile jalapeño dañadas por la alimentación de adultos de *A. eugenii*, las cuales son más atractivas (que las plantas intactas) para hembras y machos coespecíficos (Addesso *et al.*, 2010). Los compuestos (Z)- $\beta$ -ocimeno (BOClz) y (Z)-3-hexenil acetato (Z3HAC) estimulan la respuesta de *Myloccerinus aurolineatus* (Coleoptera: Curculionidae); el primero atrae a los machos y el segundo a ambos sexos de esta especie (Sun *et al.*, 2010). Similarmente, el butil butirato (BUBU) es componente de una mezcla atrayente de *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Larsson *et al.*, 2003). Un compuesto más, 2-isobutil-3-metoxipirazina (MPIR), es un potente odorante en diversas especies de chile (In-Kyung *et al.*, 2007; Zachariah y Gobinath, 2008; Fernández Trujillo, 2007), aunque no se ha reportado como atrayente de curculiónidos. Son necesarios estudios de comportamiento para determinar la capacidad de atracción de estas y otras sustancias producidas por *Capsicum annum*.

Los compuestos identificados en las yemas florales y frutos de las cuatro especies de plantas analizadas correspondieron a seis grupos funcionales (Cuadro 5). En ambas estructuras vegetales, ésteres e hidrocarburos se presentaron con mayor frecuencia, representando, en conjunto, 70.68, 83.55, 90.84, 92.77 y 98.41 % del total (considerando los de las yemas florales y frutos) de los compuestos de chile manzano, chile chiltepe, chile jalapeño, hierbamora y pimiento morrón, respectivamente. Los ésteres predominaron en las yemas florales de pimiento morrón, y en yemas y frutos de chile chiltepe, mientras que una mayor cantidad de hidrocarburos se presentó en yemas florales de hierbamora y chile jalapeño, así como en frutos de hierbamora y pimiento morrón.

Los ésteres fueron marcadamente más abundantes en las yemas florales de pimiento morrón y chile chiltepe, y en los frutos de este último; en tanto que los hidrocarburos abundaron más en yemas florales de hierbamora, chile jalapeño y chile manzano, y en frutos de hierbamora, pimiento morrón, chile jalapeño, y chile manzano (Cuadro 5). Ésteres e hidrocarburos también son los grupos funcionales más comunes en chile habanero (*C. chinense*) (Pino *et al.*, 2006; Gahunu *et al.*, 2011).

**Cuadro 4. Proporciones de los compuestos volátiles comunes en *Capsicum annuum*, especie hospedera de *Anthonomus eugenii*.**

Compuesto	Proporciones <sup>†</sup> de los compuestos (%)	
	Pimiento morrón	Chile jalapeño
Hexanal	0.05	1.25
(Z)-3-Hexenol	0.24	4.01
1-Hexanol	0.15	3.74
Triciclono	0.30	2.32
Butil butirato	0.07	1.51
(Z)-3-Hexenil acetato	0.50	6.41
Hexil acetato	0.20	2.98
(Z)- $\beta$ -ocimeno	0.72	0.71
(E)- $\beta$ -ocimeno	69.94	30.87
(3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	1.39	7.39
E,E-Cosmeno	0.77	0.85
2-Isobutil-3-metoxipirazina	0.66	1.16
(Z)-3-hexenil butirato	5.86	1.02
Metil salicilato	0.77	6.59
(Z)-3-Hexenil isovalerato	0.87	0.76
$\beta$ -Elemeno	4.56	1.11
$\alpha$ -Santaleno	0.18	0.67
(E)- $\alpha$ -Bergamoteno	3.08	13.63
(E)- $\beta$ -Farneseno	1.11	3.52
(E,E)-4,8,12-Trimetil-1,3,7,11-tridecatetraene	3.21	7.93
Proporción acumulada	94.63	98.44

<sup>†</sup> Se calcularon con relación a la cantidad total de los compuestos del tipo de planta correspondiente.

**Cuadro 5. Número y cantidad relativa de compuestos volátiles de cada grupo funcional identificado en plantas hospederas de *Anthonomus eugenii*.**

Grupo Funcional	Pimiento morrón		Chile jalapeño		Chile chiltepe		Chile manzano		Hierba mora	
	No. <sup>†</sup>	CR <sup>††</sup> (%)	No.	CR (%)	No.	CR (%)	No.	CR (%)	No.	CR (%)
Yemas florales										
Éster	11	54.44	4	6.86	11	64.57	5	23.15	4	25.92
Hidrocarburo	5	43.57	8	93.14	4	27.04	6	59.99	7	59.61
Alcohol	3	1.99	0	–	2	8.39	2	13.78	2	3.99
Aldehído	0	– <sup>‡</sup>	0	–	0	–	1	3.08	0	–
Cetona	0	–	0	–	0	–	0	–	1	10.48
Pirazina	0	–	0	–	0	–	0	–	0	–
Frutos										
Éster	7	3.45	5	28.10	10	70.81	6	13.40	2	9.29
Hidrocarburo	13	95.36	7	53.58	5	4.67	3	44.82	11	90.71
Alcohol	3	0.33	2	13.31	2	23.81	2	29.09	0	–
Aldehído	1	0.06	2	3.06	1	0.71	2	11.55	0	–
Cetona	0	–	0	–	0	–	1	1.14	0	–
Pirazina	1	0.80	1	1.96	0	–	0	–	0	–
Global (yemas florales y frutos)										
Éster	11	28.95	5	17.48	11	67.69	7	18.28	4	17.61
Hidrocarburo	13	69.47	10	73.33	1	15.86	6	52.41	11	75.16
Alcohol	3	1.16	2	6.66	2	16.10	2	21.44	2	2.00
Aldehído	1	0.03	2	1.53	1	0.36	2	7.32	0	–
Cetona	0	–	0	–	0	–	1	0.57	1	5.24
Pirazina	1	0.40	1	0.98	0	–	0	–	0	–

<sup>†</sup> Número de compuestos. <sup>††</sup> Cantidad relativa. <sup>‡</sup> El guión indica que no se detectaron compuestos con este grupo funcional.

Los análisis realizados en el presente estudio mostraron el perfil de compuestos volátiles de cinco especies hospederos del picudo del chile, correspondientes a dos géneros y cuatro especies vegetales. Con ello, fue posible conocer los compuestos que comparten estas especies vegetales, entre los cuáles podrían hallarse los que estimulen al picudo del chile. Varias de las sustancias identificadas han sido sugeridas como posibles atrayentes. Experimentos futuros de comportamiento y/o electroantenografía, permitirán dilucidar el papel de esas moléculas en la interacción química entre *A. eugenii* y sus plantas hospederas.

## 2.6. Conclusiones

Se identificaron 44 compuestos en pimiento morrón (*Capsicum annuum*), chile jalapeño (*Capsicum annuum*), chile chiltepe (*Capsicum frutescens*), chile manzano (*Capsicum pubescens*) y hierbamora (*Solanum americanum*); las yemas florales produjeron 32 y los frutos 37 de ellos. Hidrocarburos y ésteres fueron los grupos funcionales más frecuentes, con 13 y 11 compuestos, respectivamente. Estos mismos sobresalieron por su abundancia, sumando más del 70 % de la masa total de las sustancias identificadas en ambas estructuras vegetales. Los compuestos (Z)-3-hexenol, (E)- $\beta$ -ocimeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, metil salicilato y  $\beta$ -elemeno, estuvieron presentes en los cinco tipos de plantas analizadas. Estos, junto con hexil acetato, (Z)-3-hexenil butirato, (Z)-3-hexenil isovalerato, (Z)-3-hexenil isovalerato, (Z)-3-hexenil isobutirato, hexil butirato y (E)-2-Hexenil 2-metilbutirato, se encontraron en las tres especies del género *Capsicum*. Los compuestos anteriores podrían tener un efecto atrayente sobre *Anthonomus eugenii*.

## 2.7. 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.
- Addesso, K. M., H. J. McAuslane, and H. T. Albom. 2010. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Balasubramanian and Panigrahi. 2011. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess. Technol.* 4: 1-26.

- Bartelt, R. J., B. W. Zikouski, A. A. Cossé, C. D. Steelman and N. Singh. 2009. Male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. *J. Chem. Ecol.* 35: 422-434.
- Berdegue M., M. K. Harris, D. W. Riley and B. Villalón. 1994. Host plant resistance on pepper to the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano. *Southwestern Entomologist* 19: 265-271.
- Bosland, P.W. 1994. Chiles: history, cultivation, and uses. p. 347-366. In: G. Charalambous (ed.), *Spices, herbs, and edible fungi*. Elsevier Publ., New York.
- Bruton B. D., L. D. Chadler and M. E. Miller. 1989. Relationships between pepper weevil and internal mould of sweet pepper. *Plant Disease* 73: 170-173.
- Capinera, J. L. 2008. Pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Insecta: Coleoptera: Curculionidae). Document EENY-278 (IN555). Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Gainesville, FL, USA. 6 p.
- Cardeal, Z. L., M. D. R. Gomes da Silva, and P. J. Marriott. 2006. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Commun. Mass Sp.* 20: 2823-2836.
- Das A., S. H. Lee, T. K. Hyung, S. W. Kim and J. Y. Kim. 2013. Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnology Reports* 7: 9-26.
- Dos Santos-Garruti, de N. O. Frederico-Pinto, V. C. Castro Alves, M. F. Azevedo da Penha, E. de Castro Tobaruela and I. M. da Silva Araújo. 2013. Volatile profile and sensory quality of new varieties of *Capsicum chinense* pepper. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas 33: 102-108.
- Fernández-Trujillo, J. P. 2007. Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones. *Grasas Aceites* 58:252-263.
- In-Kyung, K., A. M. A. El-Aty, S. Ho-Chul, B. L. Hyang, K. in-Seon, and S. Jae-Han. 2007. Analysis of volatile compounds in fresh healthy and diseased peppers (*Capsicum annuum* L.) using solvent free solid injection coupled with gas chromatography-flame ionization detector and confirmation with mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 45: 487-494.

- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 2006. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford. XML on-line corrected versión created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. <http://goldbook.iupac.org/R05360.html>
- Gahungu, A. E. Ruganintwali, E. Karangua, X. Zhang and D. Mukunzi. 2011. Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum chinense*) Scotch Bonnet variety at red stage. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3(3): 211-218.
- Gordon R. and A. M. Armstrong. 1990. Biología del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), en Puerto Rico. *Journal of Agriculture* 74: 69-73.
- Kalinová, B., K. Stránský, J. Harmatha, R. Ctvrticka, and J. Zdárek. 2000. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? *Entomol. Exp. Appl.* 95: 47-52.
- Kamm, J. A and R. G. Buttery. 1984. Root volatile components of red clover: identification and bioassay with the clover root borer (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.* 13:1427-1430.
- Larsson, M. C., M. C. Stensmyr, S. B. Bice, and B. S. Hansson. 2003. Attractiveness of fruit and flower odorants detected by olfactory receptor neurons in the fruit chafer *Pachnoda marginata*. *J. Chem. Ecol.* 29:1253-1268.
- Martel, J. W., A. R. Alford and J. C. Dickens. 2005. Laboratory and greenhouse evaluation of a synthetic host volatile attractant for Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Agric. Forest Entomol.* 7:71-78.
- Patrock, R. J., and D. J. Schuster. 1987. Field survey for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii*, on nightshade. *Proc. Fla. Hortic. Soc.* 100: 217-220.
- Patrock R. J. and D. J. Schuster. 1992. Feeding, oviposition and development of the pepper weevil, (*Anthonomus eugenii* Cano), on selected species of Solanaceae. *Tropical Pest Management* 38: 65-69.

- Prokopy, R. J., P. L. Phelan, S. E. Wright, A. J. Minalga, R. Barger and T. C. Leskey. 2001. Compounds from host fruit odor attractive to adult plum curculios (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 36:122-134.
- Quijano, C. E. and J. A. Pino. 2010. Volatile Compounds of *Capsicum frutescens* L. Cultivars from Colombia. *J. Essent. Oil Res.* 22(6): 503-506.
- Rodríguez-Leyva, E. 2006. Life history of *Triaspis eugenii* Wharton and López-Martínez (Hymenoptera: Braconidae) and evaluation of its potential for biological control of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae).
- Segarra-Carmona A. E. and A. Pantoja. 1988. Secuential sampling plan, yield loss components and economic tresholds for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 72: 375-385.
- Skelton A. C., M. M. Cameron, J. A. Pickett and L. R. Lamotte. 2010. Identification of neryl formate as an airborne aggregation pheromone for the American house dust mite, *Dermatophagoides farinae*, and the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Epidermoptidae). *Journal of Medical Entomology* 47: 798-804.
- Sun, X. L., G. C. Wang, X. M. Cai, S. Jin, Y. Gao and Z. M. Chen. 2010. The tea weevil, *Myllocerinus aurolineatus*, is attracted to volatiles induced by conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 36: 388-395.
- Szendrei, S., E. Malo, L. Stelinski, and C. Rodríguez-Saona. 2009. Response of cranberry weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles. *Environ. Entomol.* 38: 861-869.
- Takabayashi, J., M. Dicke and M. A. Posthumus. 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant mite interactions – variation caused by biotic and abiotic factors. *J. Chem. Ecol.* 20: 1329-1354.
- Toapanta M. A., D. J. Schuster and P. A. Stansly. 2005. Development life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 34: 999-1008.
- Toshoba, T. B., D. I. Velchev, M. A. Subchev, M. Tóth, J. Vuts, J. A. Pickett, and S. Y. Dewhirst. 2010. Electrophysiological responses and field attraction of the grey

- corn weevil, *Tanymecus (Episomecus) dilaticollis* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) to synthetic plant volatiles. *Chemoecology* 20: 199-206.
- Van Tol, R. W. H. M. and J. H. Visser. 1998. Host-plant preference and antennal responses of the black vine weevil (*Otiorrhynchus sulcatus*) to plant volatiles. *Proc. Exp. Appl. Entomol.* 9: 35-40.
- Velázquez-González, J. C., J. Cibrián-Tovar, C. Hidalgo-Moreno, T. R. Vázquez-Rojas. 2011. Validación del método de aireación dinámica para la captura de compuestos volátiles de *Capsicum* spp. *Revista Latinoamericana de Química* 39: 7-16.
- Vrkocova, P., I. Valterova, J. Vrkoc and B. Koutek. 2000. Volatiles released from oak, a host tree for the bark beetle *Scolytus intricatus*. *Biochem Syst. Ecol.* 28: 933-947.
- Wolde-Hawariat, Y., E. Seyoem, B. Jembere, Y. Hillbur and B. S. Hansson. 2005. Behavioral and electrophysiological response of sorghum chafer, *Pachnoda interrupta*, to natural and synthetic plant odors. *ISCE Washington*. 140.
- Yasui, H., T. Akino, M. Fukaya, S. Wakamura and H. Ono. 2008. Sesquiterpene hydrocarbons: kairomones with a releaser effect in the sexual communication of the White-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thompson) (Coleoptera: Cerambycidae) *Chemoecology* 18: 233-242.
- Zachariah, T. J. and P. Gobinath. 2008. Paprika and chilli. *In: Chemistry of spices*. Parthasarathy, V.A., B. Chempakam and T. J. Zachariah (Editores). CABI Publishing. Wallingford, Oxon, GBR. pp: 260-311.

## CAPÍTULO 3. COMPUESTOS VOLÁTILES DE *Capsicum* QUE ATRAEN AL PICUDO DEL CHILE Y AUMENTAN EL EFECTO ATRAYENTE DE SU FEROMONA DE AGREGACIÓN

### 3.1. Resumen

*Anthonomus eugenii* Cano es la plaga de mayor importancia económica del Chile (*Capsicum* spp.) en América, y su manejo integrado requiere técnicas eficientes de monitoreo y control. Las estructuras reproductivas de la planta atraen a los adultos del picudo, por lo que sus compuestos volátiles podrían servir para ese fin. En esta investigación se evaluó la respuesta conductual de los adultos de *A. eugenii* a un compuesto individual y a mezclas binarias, terciarias y cuaternarias de 14 compuestos volátiles sintéticos, identificados con anterioridad en las estructuras reproductivas o planta completa de Chile. También se determinó la efectividad de atracción de la mejor mezcla de volátiles del hospedero en comparación con la feromona de agregación de *A. eugenii* o combinada con ésta. La respuesta del insecto se evaluó mediante experimentos de elección por pares, realizados en un olfatómetro tipo Y. Cada experimento constó de dos tratamientos, los cuales se colocaron en las cámaras laterales del olfatómetro. Las proporciones de insectos que respondieron a cada tratamiento se compararon mediante la prueba binomial. Los resultados mostraron que una mezcla de (Z)- $\beta$ -ocimeno, D-limoneno y 2-isobutil-3-metoxipirazina atrajo a hembras ( $p=0.022$ ) y machos ( $p=0.005$ ) de *A. eugenii*. El (Z)-3-hexenil acetato y el terpinoleno, adicionados individualmente a la combinación anterior, aumentaron la respuesta de hembras ( $p=0.011$ ) y machos ( $p=0.005$ ), respectivamente. La sustitución de (Z)- $\beta$ -ocimeno por su estereoisómero (E)- $\beta$ -ocimeno propició una mayor atracción de los machos ( $p=0.022$ ), en tanto que la eliminación de su isómero estructural D-limoneno, no disminuyó la efectividad de atracción de la mezcla terciaria de compuestos sintéticos. Los machos respondieron en mayor proporción a la mezcla de compuestos volátiles del hospedero ( $p=0.041$ ) y a su combinación con la feromona de agregación de *A. eugenii* ( $p\leq 0.0001$ ), que a la feromona sola; en contraste, las hembras no mostraron diferencia en su elección.

**Palabras clave:** *Anthonomus eugenii*, atrayentes, (E)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina, *Capsicum*, kairomona.

### 3.2. Abstract

*Anthonomus eugenii* Cano is the most economically important pest of peppers (*Capsicum* spp.) in America, and its management requires efficient techniques for monitoring and control. The reproductive structures of the plant attract weevil adults, so their volatile compounds could be used for those purposes. In this study, we assessed the behavioral response of *A. eugenii* adults to a single compound as well as to binary, tertiary and quaternary mixtures of 14 synthetic volatile compounds, previously identified in the reproductive structures or complete plant of chili. We also determined the effectiveness of the best attractant mixture of synthetic volatiles versus the aggregation pheromone of *A. eugenii* or combined with it. The insect response was assessed using pairwise choice experiments, performed in a Y-type olfactometer. Each experiment consisted of two treatments, which were placed in the lateral chambers of the olfactometer. The proportions of insects responding to each treatment were compared using the binomial test. The results showed that a mixture of (Z)- $\beta$ -ocimene, D-limonene and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine attracted both females ( $p=0.022$ ) and males ( $p=0.005$ ) of *A. eugenii*. The compounds (Z)-3-hexenyl acetate and terpinolene, added individually to the above combination, increased the response of females ( $p=0.011$ ) and males ( $p=0.005$ ), respectively. Substituting (Z)- $\beta$ -ocimene by its stereoisomer (E)- $\beta$ -ocimene resulted in increased attraction of males ( $p=0.022$ ), while removing its structural isomer D-limonene, did not diminish the attractiveness of the mixture. Males responded more to the mixture of host-volatile compounds ( $p=0.041$ ) and its combination with the *A. eugenii* aggregation pheromone ( $p\leq 0.0001$ ), than to the pheromone alone. In contrast, females showed no difference in their choice.

**Key words:** *Anthonomus eugenii*, attractants, (E)- $\beta$ -ocimene, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, *Capsicum*, kairomone.

### 3.3. Introducción

El picudo del chile, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), es la plaga del cultivo de chile (*Capsicum* spp.) más importante económicamente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Toapanta *et al.*, 2005). Las larvas ocasionan el daño principal al barrenar el interior de los frutos, lo que provoca la caída de los mismos, disminuye su calidad y facilita su infección por microorganismos (Gordon y Armstrong, 1990). Los adultos también afectan a las plantas al alimentarse de las yemas florales, flores y frutos pequeños, y provocar su abscisión

La detección oportuna del picudo del chile es fundamental para aplicar medidas de control eficaces. En la actualidad, su monitoreo se realiza mediante muestreo visual y con trampas cebadas con una feromona de agregación aislada de los machos (Eller *et al.*, 1994). El primer método es ineficiente, laborioso y poco confiable (Szendrei *et al.*, 2011), mientras que la efectividad del semioquímico varía con la fenología del cultivo (Eller *et al.*, 1994).

En diversas investigaciones (Innocenzi *et al.*, 2001; Tinzara *et al.*, 2007; Szendrei *et al.*, 2011) se reportan atrayentes de curculiónidos, a base de compuestos aislados de las plantas que les sirven de alimento, de feromonas de agregación o de combinaciones de ambos; algunos de ellos se usan con éxito para el monitoreo de especies del género *Anthonomus*. En el caso de *A. eugenii*, no se han explotado los compuestos volátiles de los hospederos, ni su combinación con la feromona del insecto.

Los adultos de *A. eugenii* son atraídos por los olores de plantas, en floración o fructificación, de chile (*Capsicum annuum* L.) (Addesso y McAuslane, 2009; Addesso *et al.*, 2010), hierbamora (*Solanum americanum* Mill.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) (Addesso y McAuslane, 2009). Lo anterior sugiere que los compuestos volátiles de las estructuras reproductivas de tales especies vegetales, sobre todo de la principal hospedera, *C. annuum*, podrían servir como atrayentes del picudo del chile o aumentar la efectividad de su feromona de agregación.

Numerosos compuestos volátiles conforman el aroma del chile (Cardeal *et al.*, 2006; Pino *et al.*, 2006; In-Kyung *et al.*, 2007; Addesso *et al.* 2010). Al menos 14 de ellos (Addesso *et al.*, 2010) son liberadas por plantas de *C. annuum* L. en plena producción de flores y frutos, estructuras vegetales en las que oviposita y se alimenta *A.*

*eugenii*. Algunas de esas sustancias inducen actividad electrofisiológica o conductual en diversos curculiónidos, incluyendo otras especies del género *Anthonomus* (Dickens, 1989; Kalinova *et al.*, 2000; Leskey *et al.*, 2001; Toshoba *et al.*, 2010; Szendrei *et al.*, 2009 y 2011), por lo que podrían funcionar como atrayentes de *A. eugenii*.

La presente investigación tuvo como objetivos: 1) evaluar la atracción de los adultos de *A. eugenii* hacia un compuesto individual, y combinaciones binarias, terciarias y cuaternarias de 14 compuestos volátiles sintéticos; 2) comparar el nivel de atracción de la mejor mezcla de compuestos volátiles sintéticos con el de la feromona de agregación del picudo del chile; 3) determinar el efecto de los isómeros (E)- $\beta$ -ocimeno, (Z)- $\beta$ -ocimeno y D-limoneno en la mezcla atrayente de compuestos sintéticos, y 4) evaluar el potencial atrayente de la combinación de compuestos volátiles sintéticos con la feromona de agregación de *A. eugenii*.

### **3.4. Materiales y métodos**

#### **3.4.1. Insectos**

Los insectos utilizados se obtuvieron de frutos de chile jalapeño, güero y morrón (*C. annuum*) infestados con larvas de *A. eugenii*. Los frutos se recolectaron en Los Mochis, Sinaloa, y Yurécuaro, Michoacán, México, y se trasladaron al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Texcoco, México. Posteriormente, se colocaron en jaulas de acrílico hexagonales (9 L de capacidad), las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $26 \pm 2$  °C) y fotoperíodo (13:11 h luz: oscuridad). Diariamente se retiraron los adultos emergidos y se trasladaron a nuevos recipientes, donde permanecieron hasta su uso, alimentados con frutos de pimiento morrón y agua destilada. Los insectos se separaron por sexo de acuerdo con las características descritas por Eller (1995) y se dejaron 18 h sin alimento ni agua, antes de las pruebas.

#### **3.4.2. Compuestos químicos**

Los siguientes estándares (se indica su pureza) fueron usados: trans- $\beta$ -ocimeno [mezcla de (E)- $\beta$ -ocimeno (89.1 %) y (Z)- $\beta$ -ocimeno (10.2 %)], cis- $\beta$ -ocimeno [mezcla de (Z)- $\beta$ -ocimeno (63.4 %) y D-limoneno (26.6 %)], D-limoneno (98 %), 2-isobutil-3-metoxipirazina (99 %),  $\beta$ -ionona (90 %), tetrametil pirazina (98 %), hexil butirato (98 %), (Z)-3-hexenil acetato (98 %), (Z)-3-hexenol (98 %), terpinoleno (90 %), (Z)-3-hexenil

butirato (98 %), linalool (97 %), 1-hexanol (98 %) y salicilato de metilo (98 %). Estos se adquirieron con la empresa Sigma-Aldrich de México (Toluca, Estado de México, México).

### 3.4.3. Pruebas de atracción

Se evaluó la respuesta conductual de los adultos de *A. eugenii* a 14 compuestos sintéticos, solos o en mezclas (Cuadro 6), los cuales se seleccionaron de una serie de compuestos volátiles identificados previamente en *Capsicum* spp. (In-Kyung *et al.*, 2007; Adesso *et al.*, 2010; Velázquez-González, 2011). Como criterios de elección se consideró su consistencia en el perfil de volátiles de chile, sus antecedentes en la atracción de otros curculiónidos y su disponibilidad. Las proporciones de los compuestos, en las mezclas evaluadas, se determinaron por cuantificación en muestras de pimiento morrón cv California Wonder; los adultos de *A. eugenii* respondieron a los volátiles del pimiento en ensayos de comportamiento previos. La proporción de cada sustancia se calculó con relación al compuesto más abundante (número 1, en el Cuadro 6). Los compuestos 5, 6 y 10 no se encontraron en tales muestras, por lo que sus concentraciones fueron similares a las de estudios reportados por Cardeal *et al.* (2006), Pino *et al.* (2006) y Fernández-Trujillo *et al.* (2007). Las cantidades de los compuestos 2a y 3 estuvieron determinadas por su contenido en los estándares de trans y cis-ocimeno, respectivamente. Las soluciones a evaluar se prepararon diluyendo los compuestos en aceite mineral (Sigma-Aldrich®).

La atracción del insecto hacia los compuestos sintéticos se evaluó mediante cinco series de experimentos de elección por pares (Adesso *et al.*, 2010; Cuadro 6), realizadas en un olfatómetro de vidrio, tipo Y (tubo central y brazos de 12 y 10 cm de longitud, respectivamente, y 2.5 cm de diámetro interno), el cual se operó conforme a las condiciones y metodología descritas por Adesso y McAuslane (2009). En la primera serie se evaluó la preferencia del picudo por cinco compuestos volátiles sintéticos (solos o combinados), con respecto al solvente. En la segunda se contrastaron las dos mezclas más atractivas de la serie 1 y se seleccionó la mejor. Esta última (mezcla terciaria) funcionó como testigo en la tercera serie de pruebas, en la que se evaluó la efectividad de ocho mezclas cuaternarias, resultantes de la suma individual de nuevos compuestos a la mezcla terciaria. La cuarta serie consistió en

determinar el efecto de la mezcla terciaria al sustituir el (Z)- $\beta$ -ocimeno (BOClz) por su estereoisómero (E)- $\beta$ -ocimeno (BOCle), o al prescindir de su isómero estructural D-limoneno (DLIM). En la última serie experimental se evaluó la respuesta de *A. eugenii* a su feromona de agregación (PEW I y PEW II, Trece®) en comparación con la mejor mezcla de compuestos volátiles sintéticos o con la combinación de esta y la feromona. Aunque BOCle es el compuesto más abundante en las yemas florales y frutos de Chile, no estuvo disponible para evaluarlo desde el inicio del estudio, por lo que en los primeros experimentos se utilizó su isómero BOClz.

En cada ensayo se liberó un adulto (10 a 20 d de edad) en la entrada del olfatómetro. Se le permitió elegir, durante un tiempo máximo de 15 min, entre un estímulo y su testigo (series experimentales 1, 3 y 4) o entre dos estímulos (series 2 y 5) (Cuadro 6). Previamente, se colocó un trozo de papel filtro (Whatman No.1; Advantec, Japan) de 2 cm<sup>2</sup>, empapado con 10  $\mu$ L de la solución estímulo o testigo, en cada una de las cámaras laterales del olfatómetro. Los estímulos se seleccionaron al azar entre los contemplados para cada serie experimental. Se consideró que el insecto había hecho una elección cuando recorrió al menos la mitad de la distancia de uno de los brazos del olfatómetro. Cuando algún adulto no respondió, fue excluido del experimento y se sustituyó por otro. Cada día se evaluó la respuesta de 28 o 42 adultos a dos o tres estímulos (14 insectos por estímulo), respectivamente, hasta completar 56 repeticiones por cada sexo y estímulo. Hembras y machos se evaluaron en experimentos separados. Antes de iniciar los ensayos y después de cada serie de 14 repeticiones, el olfatómetro se lavó con jabón libre de fosfatos; se enjuagó con agua destilada, alcohol etílico y acetona, y se mantuvo durante 30 min en un horno, a temperatura de 200 °C. Las cámaras laterales del olfatómetro se intercambiaron cada siete insectos, con la finalidad de eliminar el error de posición.

#### 3.4.4. Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de atracción se analizaron con la prueba para una proporción binomial (Proc FREQ; SAS, 2004), mediante la cual se determinó si la proporción observada de insectos que entraron a cada cámara del olfatómetro fue significativamente diferente a la esperada (0.5) bajo la hipótesis nula.

- 1 Cuadro 6. Compuestos volátiles sintéticos evaluados como atrayentes de *Anthonomus eugenii*, en cinco series de  
 2 experimentos realizados en un olfatómetro tipo Y.

Código <sup>°</sup>	Compuesto	Cant. <sup>□</sup> (μg)	Serie experimental																												
			1					2		3								4			5										
			E1 <sup>△</sup>	E2	E3	E4	E5	T <sup>•</sup>	E1	E2	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	T	E1	E2	E3	E1	E2	T						
1	(E)-β-ocimeno	100.0																								x	x			x	x
2	(Z)-β-ocimeno	100.0		x	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					x					
2a	(Z)-β-ocimeno	11.5																									x	x		x	x
3	D-limoneno	29.5		x	x	x	x			x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x					
4	2-isobutil 3-metoxipirazina	5.0	x <sup>■</sup>		x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x	x	x		x	x	
5	β-ionona	5.0				x																									
6	Tetrametil pirazina	5.0					x																								
7	Hexil butirato	15.0									x																				
8	(Z)-3-hexenil acetato	48.0											x																		
9	(Z)-3-hexenol	29.0												x																	
10	Terpinoleno	25.0													x																
11	3-hexenil butirato	20.0														x															
12	Linalool	1.0															x														
13	1-Hexanol	29.0																			x										
14	Salicilato de metilo	35.0																													
15	Feromona de agregación <sup>▲</sup>																														
16	Solvente (aceite mineral) <sup>°°</sup>							x																							

<sup>°</sup> Número consecutivo asignado al compuesto. <sup>□</sup> Cantidad del compuesto en la mezcla. <sup>△</sup> Estímulo. <sup>•</sup> Testigo. <sup>■</sup> Este símbolo señala que el compuesto de esa hilera se incluyó como parte del estímulo señalado en el encabezado de la columna correspondiente. <sup>▲</sup> Se utilizó tal como viene formulada. <sup>°°</sup> Se colocaron 10 μL en el papel filtro.

### 3.5. Resultados y discusión

De acuerdo con los resultados de la primera serie de experimentos (Figura 1), dos fuentes de olor atrajeron a hembras y machos de *A. eugenii*: el compuesto 2-isobutil-3-metoxipirazina (MPIR) y su mezcla terciaria con BOCiz y DLIM. MPIR es un potente odorante en frutos de diferentes especies de chile (Zachariah y Gobinath, 2008), incluyendo *C. annuum* (Cremer y Eichner, 2000; In-Kyung *et al.*, 2007; Fernández Trujillo, 2007) y *C. chinense* Jacq. (Pino *et al.*, 2006), pese a su baja concentración. La abundancia de este compuesto es mayor en frutos verdes y disminuye significativamente a medida que maduran (Mazidaa *et al.*, 2005). Por su parte, el isómero trans del ocimeno es el compuesto más abundante en plantas de *Capsicum annuum*, en floración o fructificación (Addesso *et al.*, 2010). El presente estudio muestra que ambos compuestos, MPIR y BOCiz, contribuyen para que los adultos de *A. eugenii* localicen a su hospedero.

La combinación cuaternaria que incluía  $\beta$ -ionona (BION), solamente estimuló a las hembras; más aún, BION contrarrestó el efecto atrayente de la mezcla terciaria (al sumarse a la misma), en el caso de los machos (Figura 1A). BION es un compuesto escaso en frutos verdes de chile, pero su abundancia aumenta cuando estos maduran (Pino *et al.*, 2006) o son procesados (Cremer y Eichner, 2000; Fernández-Trujillo, 2007). Por lo tanto, es posible que BION sirva a los machos como señal de que ha disminuido la calidad de los frutos, para el consumo.

Cuando se permitió a los insectos discriminar entre MPIR y la mezcla terciaria, ambos sexos eligieron la segunda (Figura 2).

Los compuestos (Z)-3-hexenil acetato (HEXAC) y terpinoleno (TERP), adicionados individualmente a la mezcla terciaria, propiciaron un aumento en la respuesta de hembras y machos, respectivamente (Figura 3). El primer compuesto, combinado con hexil acetato y la feromona de agregación de *A. musculus* Say (Coleoptera: Curculionidae), también atrae mayor proporción de hembras de esa especie, con respecto a su feromona sola (Szendrei *et al.*, 2011). Tal similitud sugiere que HEXAC contribuye para que las hembras de *A. eugenii* y *A. musculus* localicen a su hospedero, posiblemente en la búsqueda de sitios de

apareamiento u oviposición. Por su parte, TERP se ha identificado en frutos de *C. frutescens* L. (Cardeal *et al.*, 2006). Este compuesto, junto con mirceno, tiene un efecto sinérgico sobre la feromona de *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae) (Borden *et al.*, 2008).

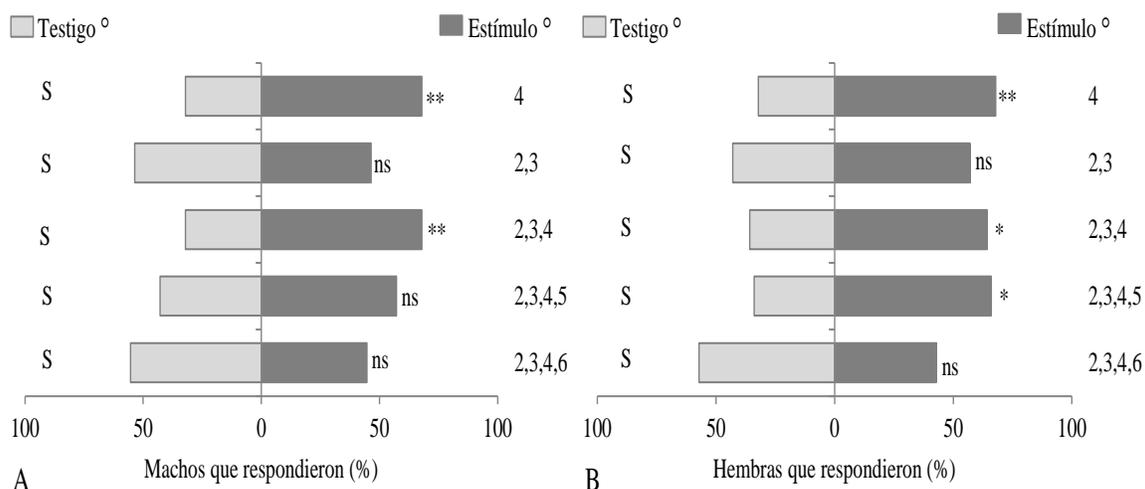


Figura 1. Atracción de *Anthonomus eugenii* hacia compuestos volátiles sintéticos, individuales o combinados. ° 2: (Z)-β-ocimeno; 3: D-limoneno; 4: 2-isobutil-3-metoxipirazina; 5: β-ionona; 6: tetrametil pirazina; S: solvente. ns no significativo; \*p ≤ 0.05; \*\*p ≤ 0.01, entre la barra oscura y la clara.

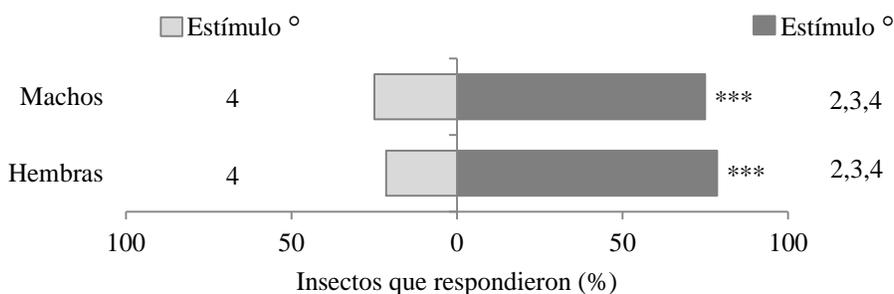


Figura 2. Respuesta de *Anthonomus eugenii* a los dos mejores estímulos de la primera serie de experimentos. ° 2: (Z)-β-ocimeno; 3: D-limoneno; 4: 2-isobutil-3-metoxipirazina. \*\*\*p ≤ 0.001, entre la barra oscura y la clara.

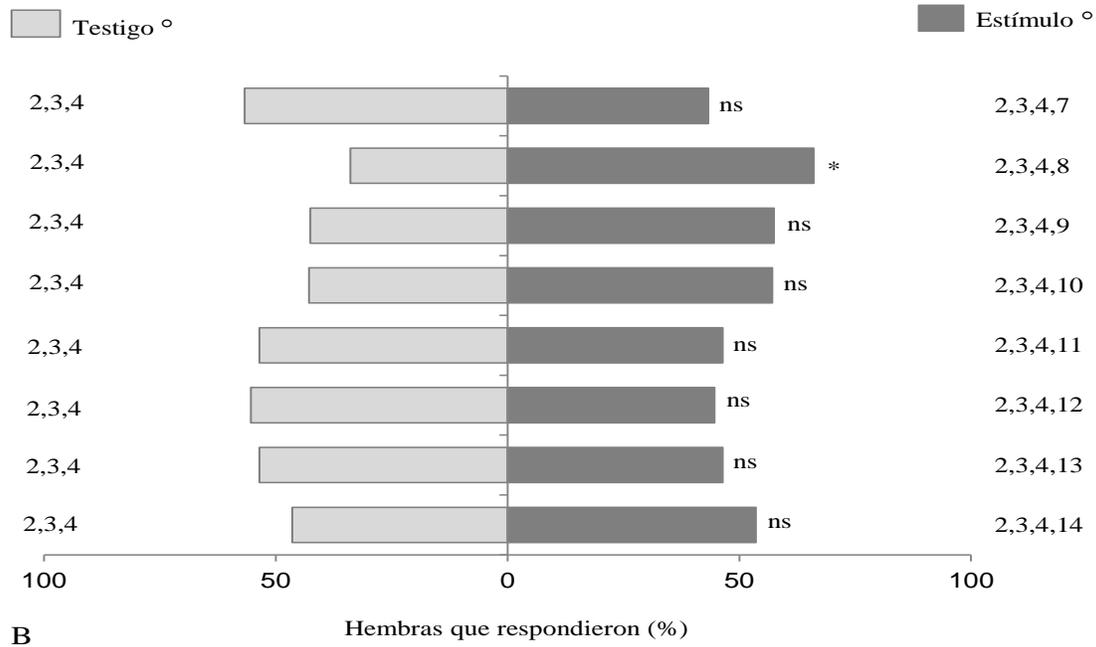
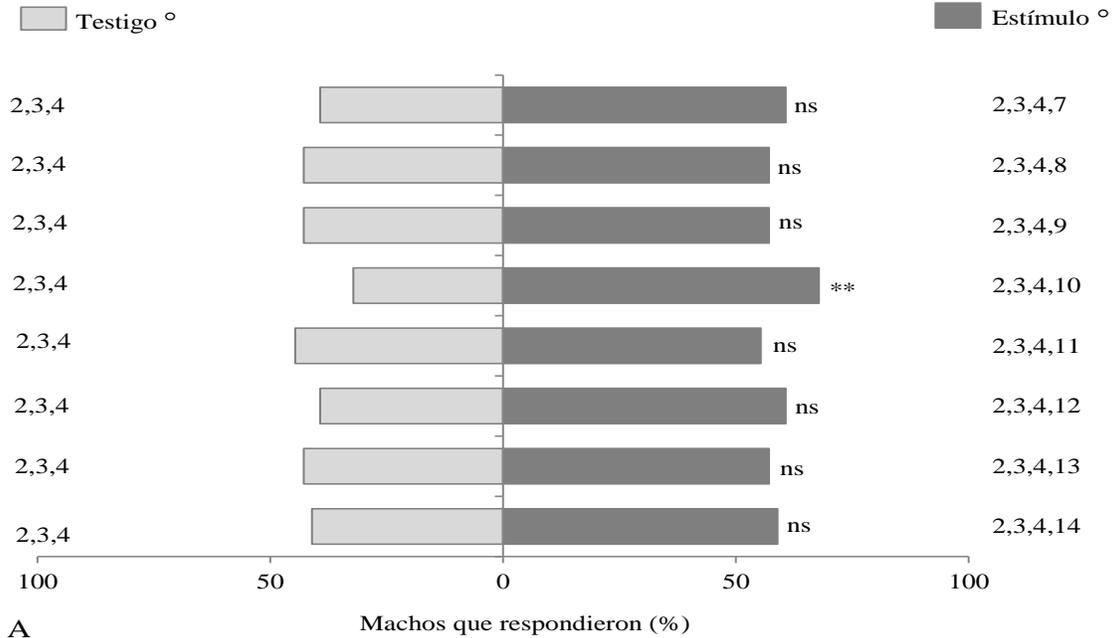


Figura 3. Atracción de *Anthonomus eugenii* hacia mezclas cuaternarias de compuestos volátiles sintéticos. ° 2: (Z)-β-ocimeno; 3: D-limoneno; 4: 2-isobutil-3-metoxipirazina; 7: hexil butirato; 8: (Z)-3-hexenil acetato; 9: (Z)-3-hexenol; 10: terpinoleno; 11: (Z)-3-hexenil butirato; 12: linalool; 13: 1-Hexanol; 14: salicilato de metilo. . ns no significativo; \*p ≤ 0.05; \*\*p ≤ 0.01, entre la barra oscura y la clara.

De acuerdo con los resultados del cuarto experimento, hubo una respuesta diferente de *A. eugenii* a los isómeros BOC<sub>1</sub>z, BOC<sub>1</sub>e y DLIM (Figura 4). Al sustituir BOC<sub>1</sub>z por BOC<sub>1</sub>e en la combinación terciaria, identificada como atrayente (Figura 1), y ofrecer ambas fuentes de olor a *A. eugenii*, más machos del picudo del chile prefirieron la mezcla con BOC<sub>1</sub>e, en tanto que las hembras no mostraron diferencia en la elección (Figura 4). BOC<sub>1</sub>e es el principal compuesto volátil que se libera durante la floración y fructificación de *C. annuum*, y su abundancia se relaciona en forma directamente proporcional con la atracción de *A. eugenii* hacia tal especie vegetal (Addesso *et al.*, 2010). Esto último explica la importancia del BOC<sub>1</sub>e en la mezcla cuaternaria evaluada en el experimento 4. La respuesta de *A. eugenii* a los volátiles de su hospedero, no disminuyó al excluir al otro isómero, DLIM (Figura 4), por lo que se puede prescindir de este compuesto en la mezcla sintética atrayente. La respuesta de *A. eugenii* ante los tres compuestos anteriores asemeja a la de otros curculiónidos, como *Anthonomus grandis* Boheman (Dickens y Prestwich, 1989), *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Díaz-Núñez *et al.*, 2006) y *Aegorhinus superciliosus* Guérin (Mutis *et al.*, 2010), los cuales también cambian su comportamiento en respuesta a diferentes isómeros.

Los datos de la quinta serie experimental (Figura 5) señalan que los compuestos del chile atraen igual número de hembras y mayor cantidad de machos adultos que la feromona de agregación de *A. eugenii*. Estos resultados, y los obtenidos en los experimentos anteriores (Figuras 1, 2, 3 y 4), demuestran que los compuestos volátiles del hospedero tienen potencial para funcionar como atrayentes del picudo del chile. No obstante, es necesario evaluar si la competencia con la feromona de los machos silvestres afectaría su eficacia en campo. El efecto contrario ocurre al monitorear a la plaga mediante trampas con feromona: las capturas disminuyen a medida que hay más flores y frutos (Eller *et al.*, 1994).

El combinar los compuestos volátiles de *Capsicum* y la feromona de agregación de *A. eugenii* tendría más posibilidades de éxito que el uso de un solo semioquímico. Lo anterior es factible en el caso de los machos, cuya respuesta fue mayor hacia la mezcla (Figura 5A). Similarmente, los compuestos de plantas

hospederas aumentan el efecto atrayente de las feromonas de otras especies de *Anthonomus* (Dickens, 1989; Cross *et al.*, 2006; Szendrei *et al.*, 2011) y de diversos curculiónidos (Reddy y Guerrero, 2004; Francke y Dettner, 2005).

A diferencia de los machos, las hembras respondieron igual a la feromona y a su combinación con los compuestos volátiles de chile (Figura 5B). Tal comportamiento podría tener relación con su estatus sexual (Addesso y McAuslane, 2009). Son necesarios experimentos con hembras copuladas y vírgenes para dilucidar la influencia de este factor.

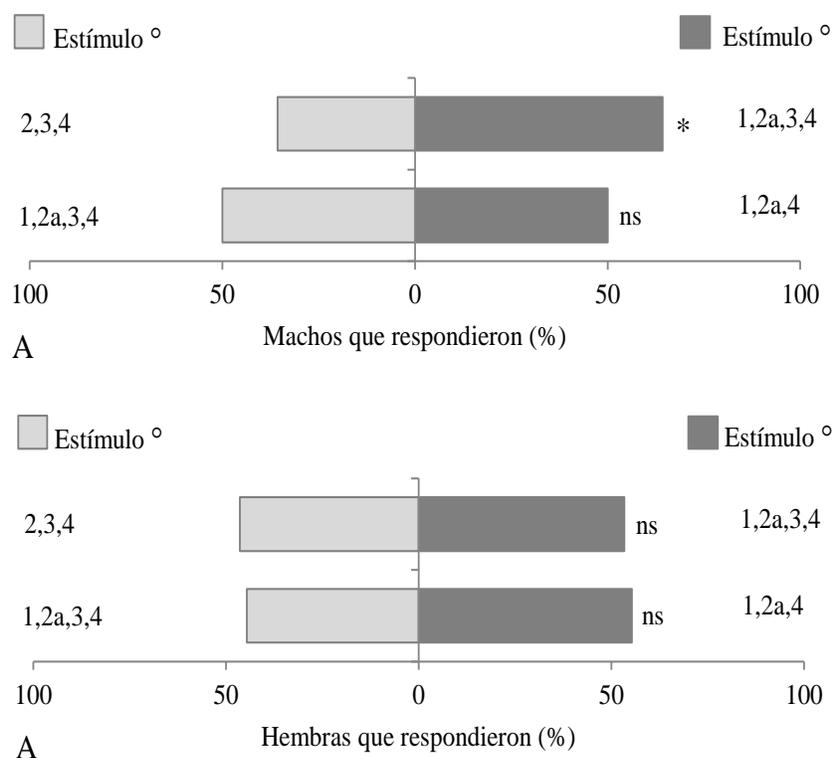


Figura 4. Efecto de isómeros del (Z)- $\beta$ -Ocimeno en la respuesta de *Anthonomus eugenii* a compuestos volátiles de su hospedero. ° 1: (E)- $\beta$ -Ocimeno; 2: (Z)- $\beta$ -Ocimeno (100  $\mu$ g); 2a: (Z)- $\beta$ -Ocimeno (11.5  $\mu$ g); 3: D-limoneno; 4: 2-isobutil-3-metoxipirazina. ns no significativo; \* $p \leq 0.05$ , entre la barra oscura y la clara.

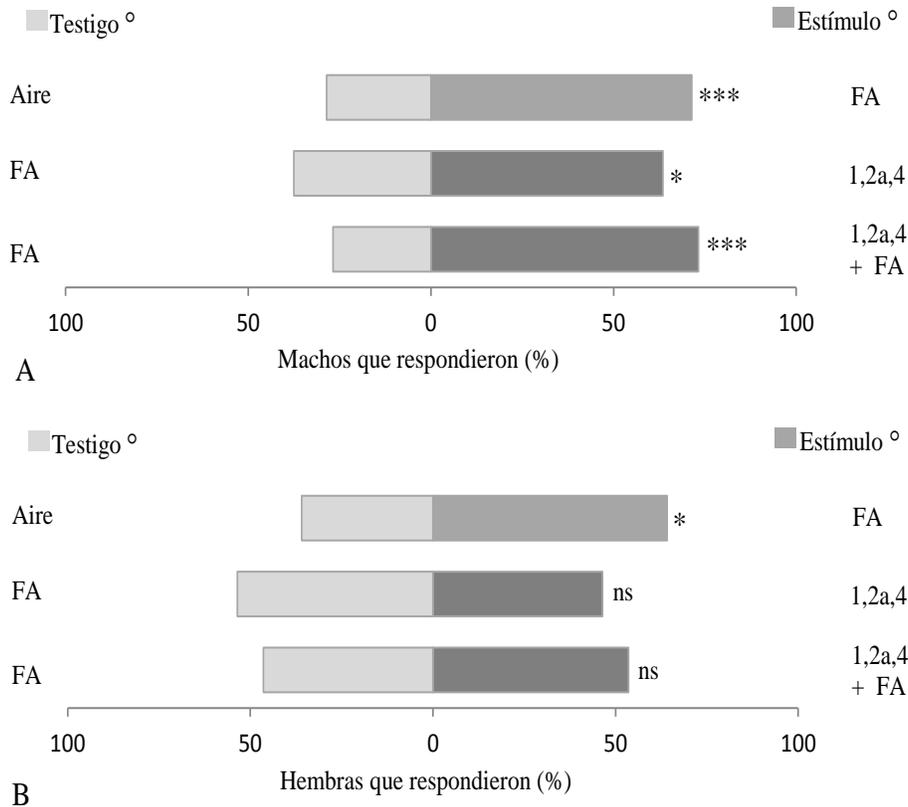


Figura 5. Respuesta de *Anthonomus eugenii* a compuestos volátiles de su hospedero y a su combinación con la feromona de agregación comercial. ° 1: (E)- $\beta$ -ocimeno; 2a: (Z)- $\beta$ -ocimeno; 4: 2-isobutil-3-metoxipirazina; FA: feromona de agregación. ns no significativo; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ , entre la barra oscura y la clara.

Los experimentos llevados a cabo en el presente estudio permitieron discriminar compuestos de *Capsicum*, con base en su potencial atrayente sobre *A. eugenii*. Tres compuestos volátiles sintéticos (BOCIe, BOCIz y MPIR) ejercieron este efecto en hembras y machos del insecto, y otros dos (HEXAC y TERP), en los adultos de un solo sexo. Similarmente, los compuestos volátiles del hospedero y su combinación con la feromona de agregación de *A. eugenii*, atrajeron más machos que la feromona sola. El potencial de las mezclas atrayentes identificadas en este estudio, podría aumentar con la inclusión de otros compuestos volátiles del hospedero que se producen en mayor cantidad durante la alimentación de *A.*

*eugenii* (Addeso *et al.*, 2010). Experimentos de campo mostrarán la efectividad de tales moléculas en el monitoreo o control del picudo del chile.

### 3.6. Conclusiones

La mezcla de (Z)- $\beta$ -ocimeno, D-limoneno y 2-isobutil-3-metoxipirazina atrajo a hembras y machos adultos de *Anthonomus eugenii*. La combinación de estos tres compuestos volátiles con (Z)-3-hexenil acetato y terpinoleno propició un aumento en la respuesta de hembras y machos, respectivamente.

La sustitución de (Z)- $\beta$ -ocimeno por (E)- $\beta$ -ocimeno aumentó la respuesta de los machos, mientras que la eliminación de D-limoneno de la mezcla, no redujo su efectividad atrayente.

La mezcla de tres compuestos volátiles del chile [(E)- $\beta$ -ocimeno, [(Z)- $\beta$ -ocimeno y 2-isobutil-3-metoxipirazina] fue tan atractiva como la feromona de agregación de *A. eugenii*, para hembras y machos de esta especie.

La combinación de (E)- $\beta$ -ocimeno, (Z)- $\beta$ -ocimeno y 2-isobutil-3-metoxipirazina, con la feromona de agregación de *A. eugenii*, atrajo más machos que la feromona sola.

### 3.7. Literatura citada

- Addeso, K. M. and H. J. McAuslane. 2009. Pepper weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38: 216-224.
- Addeso, K. M., H. J. McAuslane, and H. T. Albom. 2010. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Borden, J. H., D. S. Pureswaran, and J. P. Lafontaine. 2008. Synergistic blends of monoterpenes for aggregation pheromone of the mountain pine beetle (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 1266-1275.
- Cardeal, Z. L., M. D. R. Gomes da Silva, and P. J. Marriott. 2006. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Commun. Mass Sp.* 20: 2823-2836.
- Cremer, D. R. and K. Eichner, 2000. Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *J. Agr. Food Chem.* 48: 2454-2460.

- Cross, J. V., H. H. Hensketh, C. N. Jay, D. R. Hall, P. J. Innocenzi, D. I. Farman, and C. M. Burguess. 2006. Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* Herbst (Coleoptera: Curculionidae): Part 1. Development of lure and trap. *Crop Prot.* 25: 144-154.
- Díaz-Núñez, V., G. Sánchez-Martínez y N. E. Guillete. 2006. Respuesta de *Dendroctonus mexicanus* (Hopkins) a dos isómeros ópticos de verbenona. *Agrociencia* 40: 349-354.
- Dickens, J. C. 1989. Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Entomol. Exp. Appl.* 52: 191-203.
- Dickens, J. C. and G. D. Prestwich. 1989. Differential recognition of geometric isomers by the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 15: 529-540.
- Eller, F. J. 1995. A previously unknown sexual character for the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 78: 180-183.
- Eller, F. J., R. J. Bartlet, B. S. Shasha, D. J. Schuster, D. G. Riley, P. A. Stansly, T. F. Mueller, K. D. Shuler, B. Johnson, J. H. Davis, and C. A. Sutherland. 1994. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20:1537-1555.
- Fernández-Trujillo, J. P. 2007. Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones. *Grasas Aceites* 58:252-263.
- Francke, W. and K. Dettner. 2005. Chemical signalling in beetles. *Top. Curr. Chem.* 240: 85-166.
- Gordon, R. y A. M. Armstrong. 1990. Biología del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), en Puerto Rico. *J. Agr. U. Puerto Rico* 74: 69-73.
- In-Kyung, K., A. M. A. El-Aty, S. Ho-Chul, B. L. Hyang, K. in-Seon, and S. Jae-Han. 2007. Analysis of volatile compounds in fresh healthy and diseased peppers (*Capsicum annuum* L.) using solvent free solid injection coupled with gas

- chromatography-flame ionization detector and confirmation with mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 45: 487-494.
- Innocenzi, P. J., D. R. Hall, and J. V. Cross. 2001. Components of male aggregation pheromone of strawberry blossom weevil, *Anthonomus rubi* Herbst. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 27: 1203-1218.
- Kalinová, B., K. Stránský, J. Harmatha, R. Ctvrticka, and J. Zdárek. 2000. Can chemical cues from blossom buds influence cultivar preference in the apple blossom weevil (*Anthonomus pomorum*)? *Entomol. Exp. Appl.* 95: 47-52.
- Leskey, T. C., R. J. Prokopy, S. E. Wright, P. L. Phelan, and L. W. Haynes. 2001. Evaluation of individual attractants for adult plum curculios. *J. Chem. Ecol.* 27: 1-17.
- Mazidaa, M. M., M. M. Shallehb and H. Osman. 2005. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *J. Food Comp. Anal.* 18: 427-437.
- Mutis, A., L. Parra, L. Manosalva, R. Palma, O. Candia, M. Lizama, F. Pardo and A. Quiroz. 2010. Electroantennographic and behavioral responses of adults of raspberry weevil *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) to odors released from females. *Environ. Entomol.* 39: 1276-1282.
- Pino, J., E. Sauri-Duch, and R. Marbot. 2006. Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chem.* 94: 394-398.
- Reddy, G. V. P. and A. Guerrero. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Sci.* 9: 253-261.
- SAS (SAS Institute). 2004. SAS/STAT® 9.1 User's guide. Cary, NC. USA.
- Szendrei, S., A. Averill, H. Alborn, and C. Rodríguez-Saona. 2011. Identification and field activity of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- Szendrei, S., E. Malo, L. Stelinski, and C. Rodríguez-Saona. 2009. Response of cranberry weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles. *Environ. Entomol.* 38: 861-869.

- Tinzaara, W., C. S. Gold, M. Dicke, A. Van Huis, and P. Ragama. 2007. Host plant odours enhance the response of adult banana weevil to the synthetic aggregation pheromone Cosmolure. *Int. J. Pest Manage.* 53: 127-137.
- Toapanta, M. A., D. J. Schuster, and P. A. Stansly. 2005. Development life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 34: 999-1008.
- Toshoba, T. B., D. I. Velchev, M. A. Subchev, M. Tóth, J. Vuts, J. A. Pickett, and S. Y. Dewhirst. 2010. Electrophysiological responses and field attraction of the grey corn weevil, *Tanymecus (Episomecus) dilaticollis* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) to synthetic plant volatiles. *Chemoecology* 20: 199-206.
- Velázquez-González. 2011. Compuestos volátiles que median la interacción entre *Anthonomus eugenii* Cano y *Capsicum annum*. Tesis de Doctorado. Postgrado en Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, México. 59 p.
- Zachariah, T. J. and P. Gobinath. 2008. Paprika and chilli. *In: Chemistry of spices.* Parthasarathy, V.A., B. Chempakam and T. J. Zachariah (Editores). CABI Publishing. Wallingford, Oxon, GBR. pp: 260-311.

## CAPÍTULO 4. LIBERADORES PARA COMPUESTOS VOLÁTILES ATRAYENTES DEL PICUDO DEL CHILE

### 4.1. Resumen

El uso de compuestos volátiles del hospedero podría mejorar el sistema de monitoreo y las tácticas de control del picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Tres sustancias liberadas por *Capsicum* spp., principal hospedero del insecto, han mostrado potencial para atraer a *A. eugenii*: (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y 3-hexen-1-ol acetato. Sin embargo, se carece de un dispositivo adecuado para la liberación de tales moléculas. En esta investigación se realizaron dos experimentos, para estudiar la dinámica de emisión de las tres sustancias señaladas, en distintos emisores. En el primer experimento se compararon las tasas de liberación de los compuestos en cinco tipos de liberadores (septos de caucho, bolsas de polietileno, tubos eppendorf con o sin perforación en la tapa y viales de vidrio) y utilizando dos solventes (hexano o aceite mineral). En el segundo experimento, uno de los dispensadores se eligió para estudiar las tasas de liberación de los compuestos en condiciones de invernadero, con relación a variables ambientales y del propio liberador. Los resultados señalaron a los viales de vidrio con tapa de caucho como los más adecuados para la liberación de los tres compuestos. Las tasas de liberación fueron más altas ( $P \leq 0.001$ ) en dispensadores con hexano. Las variables número de orificios, temperatura, humedad relativa y tiempo de exposición de los emisores en el invernadero, explicaron la mayor parte de la variabilidad de las tasas de liberación.

**Palabras clave:** *Anthonomus eugenii*, 3-hexen-1-ol acetato, 2-isobutil-3-metoxipirazina, liberadores de semioquímicos, tasas de liberación, (Z)- $\beta$ -ocimeno.

## 4.2. Abstract

The use of host-plant volatiles could improve the monitoring system and the tactics to control the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano). Three substances produced by *Capsicum* spp., main host of the insect, have shown potential to attract *A. eugenii* adults: (Z)- $\beta$ -ocimene, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine and 3-hexen-1-ol acetate. We lack of a suitable device for the release of such molecules, however. In this research, two experiments were conducted to study the emission dynamics of the three substances from different dispensers. In the first experiment, the release rates of the compounds on five types of releasers (rubber septa, polyethylene bags, eppendorf tubes with or without holes in the lid and glass vials) and using two solvents (hexane or mineral oil) were compared. In the second experiment, one of the dispensers was chosen to study the release rates of the compounds under greenhouse conditions, in relation to environmental and releaser's variables. The results showed that the glass vials with rubber cap were the most suitable for the release of the three compounds. The release rates were higher ( $P \leq 0.001$ ) in dispensers with hexane. The number of holes, temperature, relative humidity and lifetime of the emitters, were the factors explaining most of the variability in release rates.

**Palabras clave:** *Anthonomus eugenii*, 3-hexen-1-ol acetate, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, release rates, semiochemical dispensers, (Z)- $\beta$ -ocimene.

### 4.3. Introducción

El picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano; Coleoptera: Curculionidae) es una plaga de gran importancia económica en todas las entidades de la República Mexicana en las que se cultiva chile, así como en otras regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Abreu y Cruz, 1985; Andrews *et al.*, 1986; Arcos *et al.*, 1998; Toapanta *et al.*, 2005). Entre las alternativas para el manejo de esta especie se encuentra el uso de semioquímicos, compuestos que, al ser emitidos por un organismo inducen una respuesta conductual o fisiológica en individuos de su propia especie o de alguna otra. Estas sustancias actúan usualmente a concentraciones bajas y pueden dispersarse, con rapidez, a largas distancias (Heuskin *et al.*, 2011), por lo que han adquirido relevancia en el monitoreo y control de plagas agrícolas (Suckling, 2000).

Se ha identificado una serie de sustancias volátiles en *Capsicum* spp. (Addesso *et al.*, 2010; Velázquez-González, 2011; Muñiz-Merino *et al.*, sin publicar) y *Solanum americanum* Mill (Muñiz-Merino *et al.*, sin publicar), principales hospederos del picudo del chile. Algunas de estas tienen potencial para ser utilizadas como atrayentes del insecto. Entre los compuestos más promisorios para utilizarse como mezcla kairomonal o en combinación con una feromona de agregación aislada de los machos de *A. eugenii* (Eller *et al.*, 1994) se encuentran (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y 3-hexen-1-ol acetato (Muñiz-Merino *et al.*, en prensa). Los compuestos anteriores podrían ser empleados para mejorar la eficacia del monitoreo o para diseñar alguna táctica de control de *A. eugenii*, basada en el uso de semioquímicos. Por lo tanto, es necesario contar con un dispositivo adecuado para la liberación de estas moléculas.

Diversos materiales han sido evaluados como dispensadores de semioquímicos. Entre los más comunes, se encuentran los septos de caucho, tubos de polietileno y viales de diversos tipos (Torr *et al.*, 1997; Möttus *et al.*, 1997; Hoffmeyer *et al.*, 2009). Materiales similares podrían ser útiles para la liberación de los compuestos atrayentes del picudo del chile, si permiten que el semioquímico actúe eficazmente.

Un semioquímico es eficaz cuando se libera a la atmósfera en las dosis y dosificaciones que aseguren una concentración a la cual el organismo blanco lo pueda detectar (Heuskin *et al.*, 2011). Tal liberación podría ser afectada por una serie de factores, tales como la velocidad de difusión de los compuestos a través del dispensador (Krüger y Tolmay, 2002), la composición (Golub *et al.*, 1983), tamaño (Hofmeyr y Burger, 1995), forma y grosor del mismo (Heuskin *et al.*, 2011), y las condiciones ambientales predominantes durante su uso (Bradley *et al.*, 1995). En esta investigación, se comparó la emisión de los tres compuestos atrayentes del picudo del chile, en cinco tipos de liberadores y utilizando dos solventes distintos. Posteriormente, se seleccionó uno de los dispensadores y se utilizó para estudiar las tasas de liberación de los tres compuestos volátiles, en condiciones de invernadero. El objetivo general del trabajo fue el de identificar un liberador potencial para la emisión de los compuestos atrayentes del picudo del chile, así como determinar la influencia de la temperatura, humedad relativa y tiempo de exposición del dispositivo, en las tasas de liberación de cada compuesto.

#### **4.4. Materiales y métodos**

##### **4.4.1. Lugar de estudio**

Los experimentos se realizaron en un túnel de viento y en un invernadero, ambos localizados en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo (19° 27' 38" de latitud norte, 98° 54' 11" de longitud oeste y altitud de 2250 m), en Texcoco, Estado de México, México.

##### **4.4.2. Compuestos**

Se estudiaron las tasas de liberación de tres compuestos volátiles (se indica su pureza): (Z)- $\beta$ -ocimeno [mezcla de (Z)- $\beta$ -ocimeno (63.4 %) y D-limoneno (26.6 %)], 2-isobutil-3-metoxipirazina (99 %) y (Z)-3-hexen-1-ol acetato (98 %). Estos se adquirieron con la compañía Sigma-Aldrich de México (Toluca, Estado de México, México). El picudo del chile respondió a una mezcla de estas sustancias en experimentos de comportamiento previos (Muñiz-Merino *et al.*, en prensa).

#### 4.4.3. Liberadores

Se evaluaron cinco tipos de liberadores: viales de vidrio color ámbar, con tapa de caucho (Agilent Technologies®) y capacidad de 2 mL (V); tubos eppendorf de 1.5 mL (Sartdel®), cerrados y con una perforación en la tapa (TP); tubos eppendorf (Sartdel®) cerrados, sin orificio en la tapa (TC); bolsas de polietileno (1000 µm de espesor) de 4 x 5 cm (B) y septos de caucho rojo de 8 mm (Sigma-Aldrich®) (S). A los viales se les hicieron 1, 5, 9 o 13 perforaciones en la tapa, dependiendo del experimento, con un alfiler de 2 mm de diámetro.

#### 4.4.4. Experimento en túnel de viento

Este experimento se diseñó con la finalidad de comparar las tasas de liberación (TL) de (Z)-β-ocimeno (BOClz), 2-isobutil-3-metoxi pirazina (MPIR) y (Z)-3-hexen-1-ol acetato (HEXAC), en los cinco tipos de dispositivos descritos y con el uso de dos solventes; en total resultaron nueve tratamientos (ya que no hubo septos con solución en aceite mineral). En los viales, tubos eppendorf y bolsas de polietileno, se colocó una solución que contenía 4 mg de cada compuesto, diluidos en 1 mL de hexano grado HPLC (J. T. Baker; Toluca, Estado de México, México) o 0.5 mL de aceite mineral; en los septos solo se vertió 1 mL de la solución en hexano. Inmediatamente después, los viales y tubos se cerraron con sus respectivas tapas, las aberturas de las bolsas de polietileno se sellaron con calor y los septos se colocaron en una campana de extracción para evaporarles el solvente; a las tapas de los tratamientos con TP y V se les hicieron uno y cinco orificios, respectivamente. Enseguida, los liberadores se distribuyeron al azar en un túnel de viento de acrílico, colocado dentro de una cámara de madera. El cuarto se mantuvo a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C e iluminado con dos lámparas Phillips® de 59 W. Una corriente continua de aire a velocidad de 4 kph se generó con un extractor, durante el tiempo que duró el estudio (22 días). El experimento constó de tres repeticiones, establecidas en días consecutivos. En los días 1, 8, 15 y 22, los volátiles de cada liberador se colectaron mediante aireación dinámica. Este método permite recuperaciones superiores al 87 % (Velázquez-González *et al.*, 2011). Un liberador se colocó dentro de un frasco cilíndrico de vidrio, con capacidad de 500 mL, a través del cual se hizo pasar aire con un flujo

de 60 mL/min. Este se impulsó desde un tanque de aire comprimido extraseco y se reguló con un flujómetro Gilmont® (Cole Parmer; IL, USA). En el punto de ingreso del aire se colocó un cartucho empacado con 0.1 g de adsorbente Ténax® (Sigma-Aldrich de México; Toluca, Estado de México, México), el cual fungió como filtro. Otros dos cartuchos iguales se colocaron en línea, a la salida del frasco, para la colecta de los compuestos provenientes del dispensador. La captura se realizó durante tres horas. Cuatro o cinco frascos se colocaron a un mismo tiempo, de manera que las capturas se realizaron en dos series; en la primera se muestrearon los cinco liberadores con solución de hexano y en la segunda los cuatro emisores con aceite mineral. Las capturas se realizaron entre las 10 y 17 h del día; la primera de ellas se hizo 15 h después de haber establecido el experimento, y se consideró como el muestreo en el día 1. Los compuestos colectados se eluyeron de cada cartucho con 3 mL de hexano grado HPLC. La solución resultante se concentró a 1 mL, con una corriente suave de nitrógeno y se colocó en un vial de vidrio ámbar (2 mL de capacidad; Agilent-Technologies®). Las muestras así obtenidas se almacenaron a -5 °C hasta su análisis, durante el cual se diluyeron o concentraron cuando así se requirió.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (HP 6890: HP 5973; Agilent, Palo Alto, CA, USA). El equipo se operó en las condiciones descritas por Velázquez-González *et al.* (2011). La cuantificación se realizó por el método del estándar externo, mediante curvas de calibración elaboradas a partir de cinco diluciones de cada compuesto, a concentraciones de 0.5, 1, 10, 50 y 100 ppm. Todas las curvas tuvieron valores de  $R^2$  superiores a 0.99. Los límites de cuantificación, determinados mediante el método de la US EPA (2000), fueron: 0.26, 0.13 y 0.44 ng/ $\mu$ L, para (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxi pirazina y (Z)-3-hexen-1-ol acetato, respectivamente. Las lecturas por debajo del punto más bajo de las curvas de calibración se consideraron no detectables.

#### 4.4.5. Experimento en invernadero

Este experimento tuvo como finalidad analizar las TL de BOCiz, MPIR y HEXAC, en viales ámbar, con relación a la cantidad de orificios en la tapa, tiempo

de exposición de los dispensadores en el invernadero, temperatura y humedad relativa. Constó de 17 tratamientos, que correspondieron a las 13 combinaciones de compuesto y número de orificios (1, 5, 9 y 13) más cuatro testigos (frascos vacíos con 1, 5, 9 o 13 orificios en la tapa). En cada vial se depositaron 300  $\mu$ L de un solo compuesto. Después de cerrar los viales y hacer las perforaciones, se pusieron en una rejilla de acrílico (0.4 cm de altura), separados 5 cm entre sí. La rejilla se colocó en un invernadero, a 1.5 m por debajo de una malla (20 % de sombreo). Al día siguiente (día 1) se realizaron dos pesajes de los liberadores, el primero a las 8 y el segundo a las 18 h; al momento de hacer el primero habían transcurrido 15 h desde el establecimiento del experimento. La TL de cada vial se calculó a partir de la diferencia entre las dos lecturas, después de corregirlas con base en los pesos del testigo correspondiente. El procedimiento se repitió una vez por semana, en el transcurso de 92 días. Durante este tiempo se registró la temperatura y humedad relativa, a intervalos de 30 min. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Las TL del experimento en invernadero se compararon con las tasas de liberación de referencia (TR) de cada compuesto. Las TR se calcularon previamente, mediante cuantificación de muestras obtenidas a partir de la mezcla de BOCiz, MPIR y HEXAC que atrajo a los adultos de *A. eugenii* (ver. Capítulo 2).

#### 4.4.6. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se ejecutaron con el programa SAS v. 9.1 (SAS, 2004). Los datos del experimento en el túnel de viento se sometieron a análisis de varianza para medidas repetidas en el tiempo (Proc Mixed) y, posteriormente, a comparación múltiple de medias (ajustadas mediante el procedimiento de Tukey-Kramer) entre los cinco tipos de liberadores, o entre los dos solventes, en cada fecha de muestreo. Las TL del segundo experimento se sometieron a un análisis de regresión lineal múltiple, para ajustar modelos explicativos. Cuatro variables independientes se incluyeron inicialmente: número de orificios en la tapa del liberador, tiempo de exposición del liberador en el invernadero, temperatura y humedad relativa. Las variables significativas para los

modelos finales se determinaron mediante el procedimiento de selección por pasos (stepwise; proc Reg).

#### **4.5. Resultados y discusión**

##### **4.5.1. Tasas de liberación de cinco tipos de emisores**

Los emisores de semioquímicos se clasifican en tres tipos (Heuskin *et al.*, 2011): de matriz sólida, formulaciones líquidas para pulverizar y formulaciones de tipo reservorio. Dos de los liberadores incluidos en el presente trabajo son de matriz sólida (bolsas de polietileno y septos de caucho) y tres de tipo reservorio (tubos eppendorf con o sin orificio, y viales de vidrio). Estos se evaluaron en el primer experimento.

Los resultados de tal experimento indicaron que en todas las fechas de muestreo hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre las TL de (Z)- $\beta$ -ocimeno (BOClz), 2-isobutil-3-metoxipirazina (MPIR) y 3-hexen-1-ol acetato (HEXAC), en los cinco dispensadores evaluados, cuando se utilizó hexano como solvente. En los liberadores tipo bolsa de polietileno (B) y septo de caucho (S), las TL de los tres compuestos disminuyeron drásticamente del día 1 (D1) al 8 (D8), y llegaron a niveles no detectables a partir del día 15 (D15) (figuras 6,7 y 8). Tal dificultad para mantener TL constantes es una característica común de los dispensadores de matriz sólida (Stipanovic *et al.*, 2004). Los emisores tipo vial (V), tubo eppendorf con una perforación (TP) y tubo eppendorf sin orificios (TC), permanecieron liberando los tres compuestos hasta el día 22 (D22) (figuras 6, 7 y 8). Esto concuerda con lo expuesto por Atterholt *et al.* (1999), quienes afirman que los sistemas de tipo reservorio son los más adecuados para conseguir tasas de liberación estables.

Las TL también variaron ( $P \leq 0.05$ ) entre los liberadores con compuestos diluidos en aceite mineral, durante todas las fechas de muestreo, pero se mantuvieron más estables de una fecha a otra. V, TP y B liberaron BOClz y MPIR en las cuatro fechas, y HEXAC en D1, D8 y D15 (V) o en D1 y D8 (TP y B). TC liberó BOClz solamente en D1, MPIR en todas las fechas y HEXAC en D15 y D22 (figuras 6,7 y 8). Estos resultados señalan nuevamente a los viales como los liberadores más adecuados para las sustancias estudiadas. También muestran

que el aceite mineral permite un mejor control de las TL; al parecer, cuando se utiliza este solvente, las TL dependen más de las sustancias a liberar.

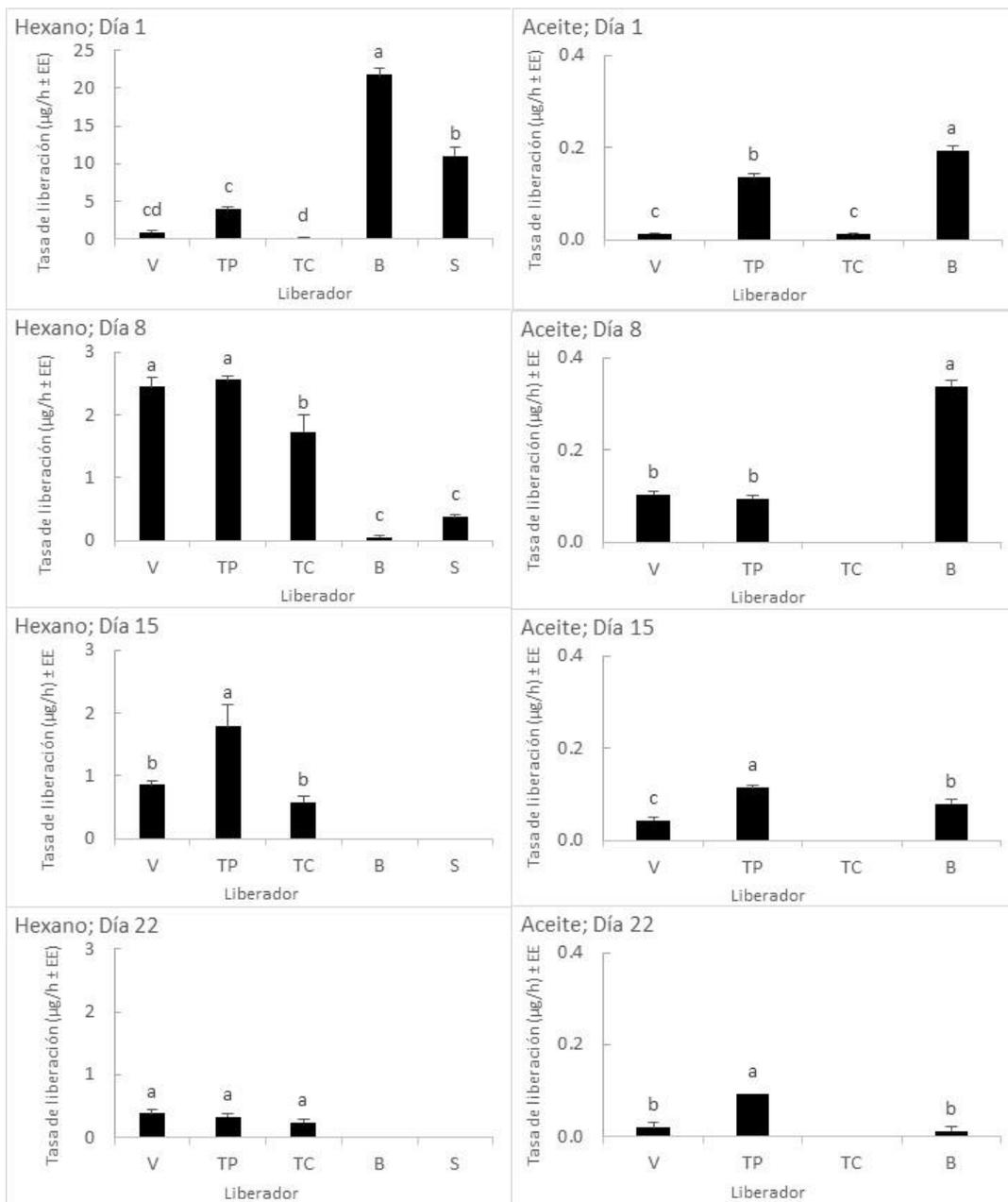


Figura 6. Tasas de liberación de (Z)-β-ocimeno en cinco tipos de emisores, utilizando dos solventes. V: vial; TP: tubo eppendorf con un orificio en la tapa; TC: tubo eppendorf sin orificio; B: bolsa de polietileno; S: septo de caucho. EE: error estándar. Medias con la distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

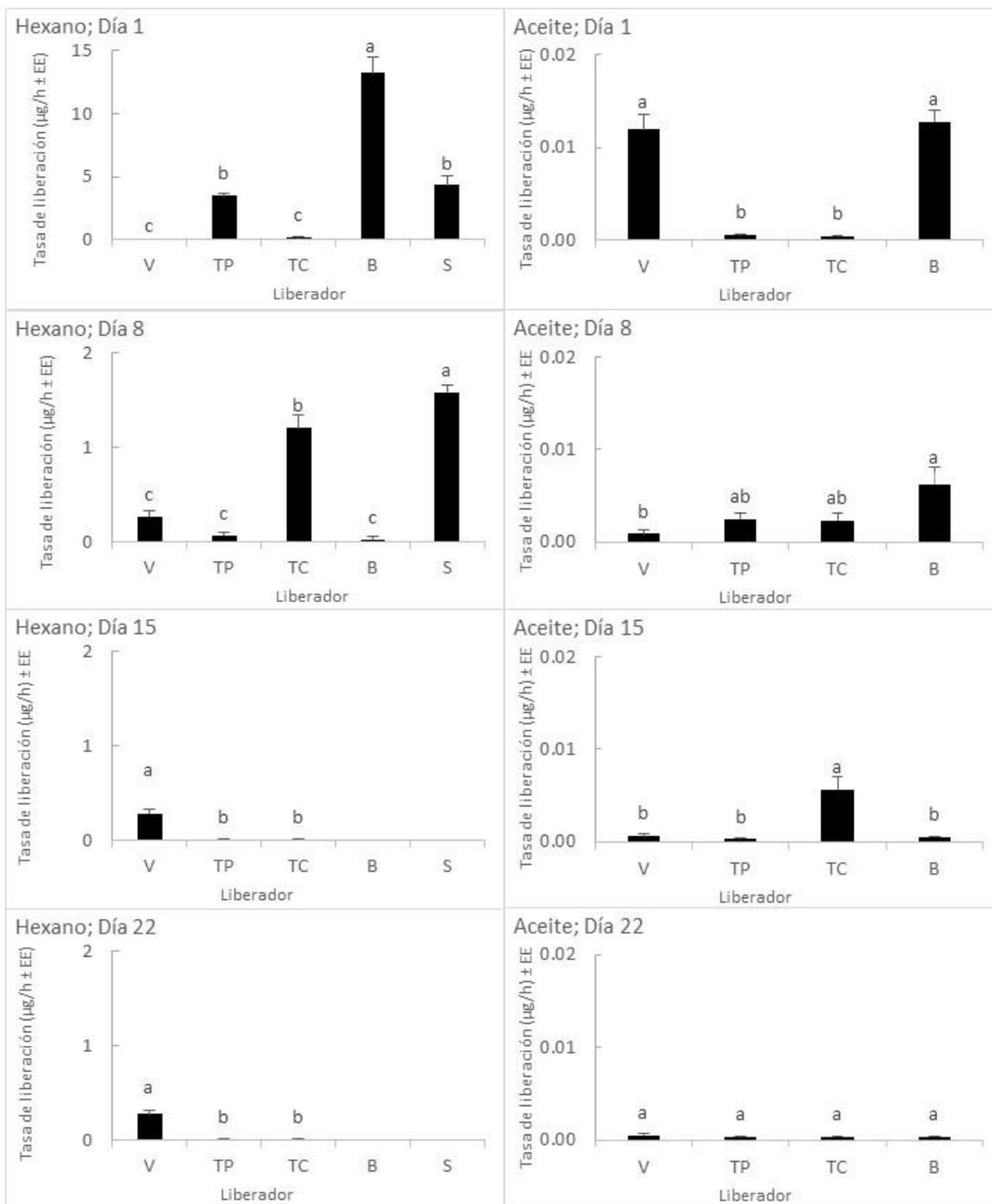


Figura 7. Tasas de liberación de 2-isobutil-3-metoxipirazina en cinco tipos de emisores, utilizando dos solventes. V: vial; TP: tubo eppendorf con un orificio en la tapa; TC: tubo eppendorf sin orificio; B: bolsa de polietileno; S: septo de caucho. EE: error estándar. Medias con la distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

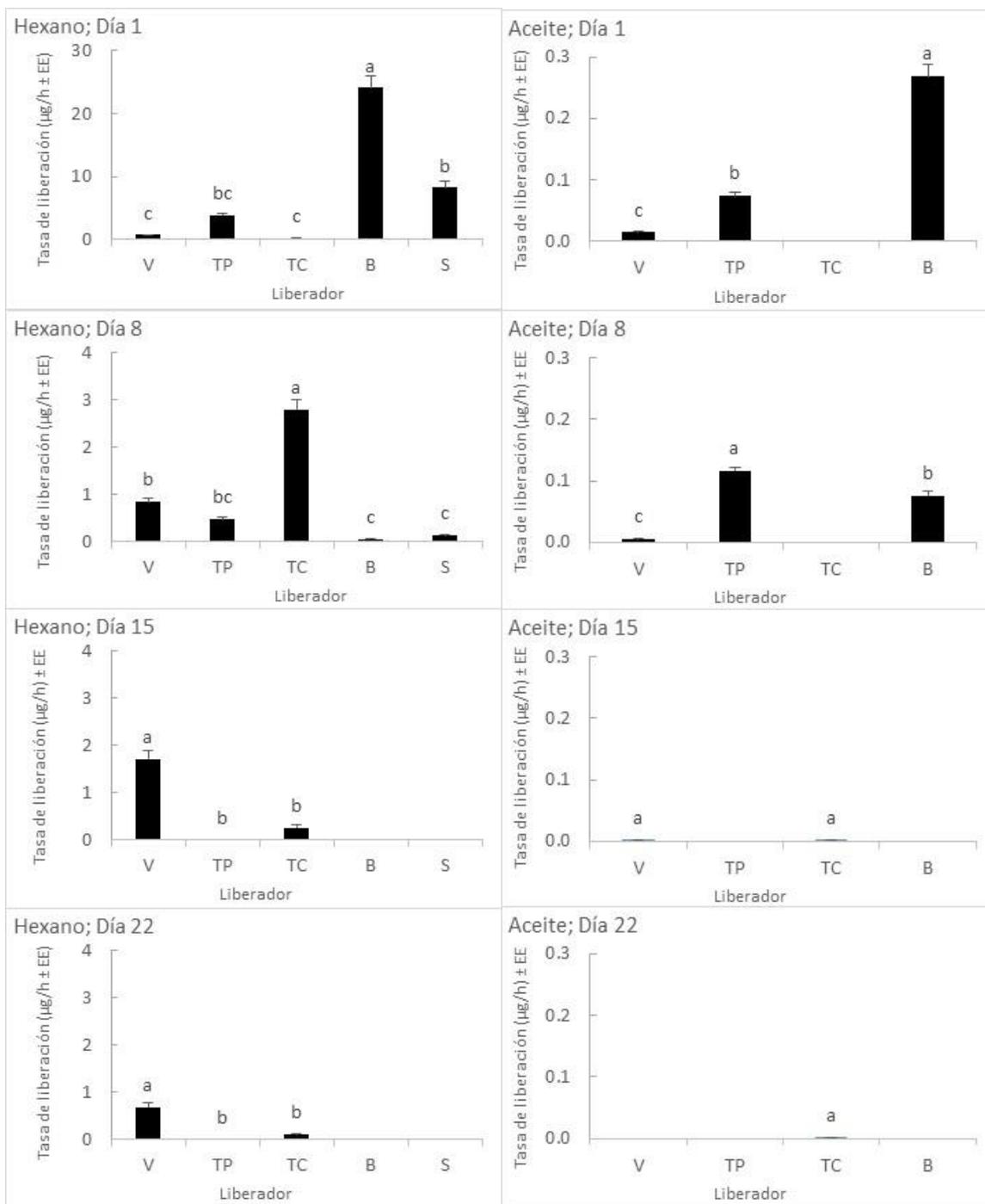


Figura 8. Tasas de liberación de 3-hexen-1-ol-acetato en cinco tipos de emisores, utilizando dos solventes. V: vial; TP: tubo eppendorf con un orificio en la tapa; TC: tubo eppendorf sin orificio; B: bolsa de polietileno; S: septo de caucho. EE: error estándar. Medias con la distinta letra son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Las TL se mantuvieron bajas ( $P \leq 0.0001$ ) en aceite, en comparación con las TL de compuestos en hexano (Figura 9), e incluso alcanzaron niveles no detectables, lo cual indica que un volumen de las sustancias se quedó atrapado en el solvente. Las TL bajas serían favorables para mantener la liberación durante un tiempo prolongado, pero las TL imperceptibles representan un problema. El mantener la emisión a TL detectables posiblemente se conseguiría disminuyendo el volumen de aceite y/o aumentando la concentración del compuesto en el liberador.

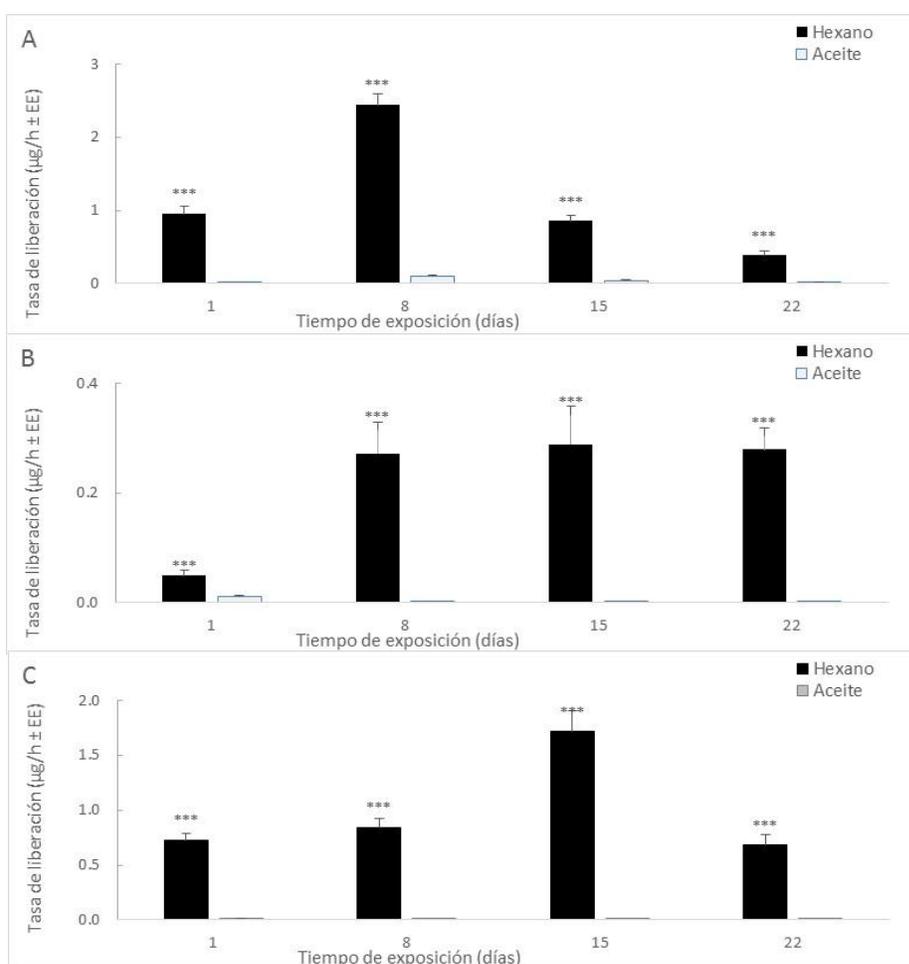


Figura 9. Tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno (A), 2-isobutil-3-metoxipirazina (B) y 3-hexen-1-ol-acetato (C) en emisores tipo vial, con aceite o hexano como solventes. \*\*\*: diferencia significativa a  $P \leq 0.0001$ , entre la barra oscura y la clara de la misma fecha.

#### 4.5.2. Tasas de liberación de emisores tipo vial en invernadero

De acuerdo con Krüger y Tolmay (2002), la liberación de semioquímicos a la atmósfera depende principalmente de la velocidad de difusión de los compuestos a través del dispensador y de la velocidad de evaporación de las moléculas en el aire. La magnitud con que influye el primer factor está determinada por las características del emisor (Hoffmeyr y Burger, 1995; Stipanovic *et al.*, 2004) mientras que la del segundo depende primordialmente de las condiciones ambientales (Alfaro-Cid *et al.*, 2009). En este trabajo, se muestra que la difusión de los compuestos evaluados, en los liberadores tipo vial, se puede controlar variando la cantidad de orificios en la tapa. Los emisores V con 1, 5, 9 o 13 orificios, permanecieron liberando BOC<sub>12</sub>, MPIR y HEXAC por 51 o más días; la duración de este periodo fue proporcional a la cantidad de perforaciones (Figura 9).

Para que un semioquímico sea eficiente en el manejo de plagas, el emisor debe asegurar que la concentración de los compuestos de interés en el aire sea lo suficientemente alta, de manera que los insectos los detecten (Heuskin *et al.*, 2011). Las TL de BOC<sub>12</sub> y HEXAC, determinadas en el presente estudio, coincidieron con las tasas de referencia (TR) o se mantuvieron cercanas a estas a lo largo de los periodos de emisión correspondientes. Lo anterior se consiguió con uno (HEXAC) y cinco (BOC<sub>12</sub>) orificios en la tapa del vial (Figura 10). En el caso de MPIR, todas las TL (independientemente del número de orificios) superaron a la TR (0.47 µg/h). Tasas de liberación de este último compuesto, más cercanas a la TR, podrían lograrse al diluirlo en aceite mineral o utilizando otro tipo de dispensador, como el tubo eppendorf.

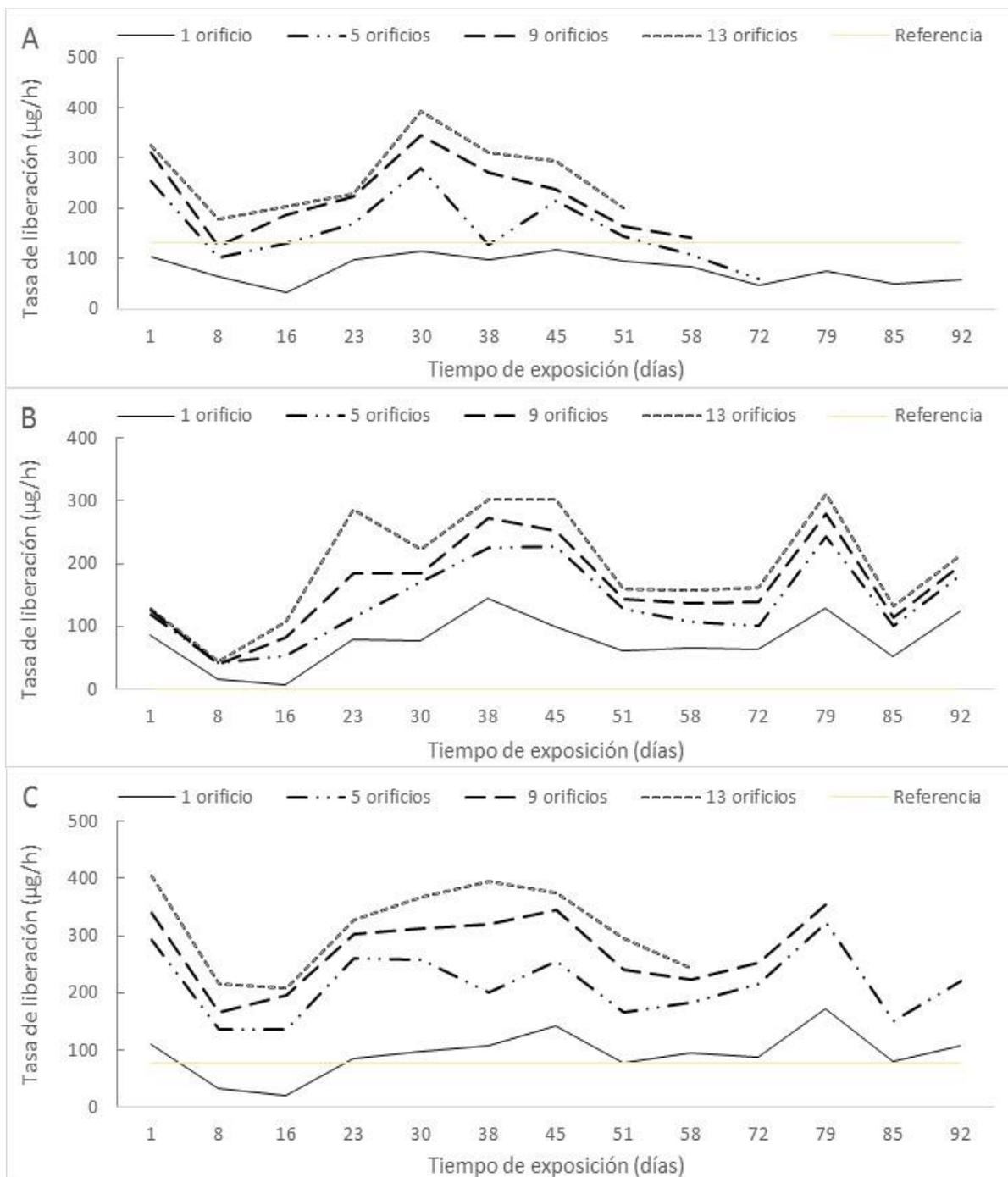


Figura 10. Tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno (A), 2-isobutil-3-metoxi-pirazina (B) y 3-hexen-1-ol-acetato (C) en viales de vidrio con orificios en la tapa. Referencia: tasa de liberación a la que respondieron los insectos en laboratorio.

#### 4.5.3. Influencia de factores ambientales y del emisor en las tasas de liberación

Los modelos de regresión generados para explicar la variación en las TL de los emisores tipo vial, incluyeron al menos dos de las cuatro variables consideradas originalmente (cuadros 7 y 8). La cantidad de orificios en la tapa del liberador fue la variable que más influyó en las TL de BOC1z y HEXAC, las cuales aumentaron en proporción directa con este factor. En tanto, la humedad relativa contribuyó en mayor medida al aumento en las TL de MPIR (Cuadro 8). Variaciones en las TL con relación a las características del dispensador, también han sido observadas en la liberación de otras kairomonas, como 1-octen-3-ol, 4-metilfenol y 3-n-propilfenol, compuestos atrayentes de la mosca tsetse (*Glossina* sp.; Diptera: Glossinidae) (Torr *et al.*, 1997). La humedad relativa también se ha señalado como uno de los factores que controlan la velocidad de evaporación de semioquímicos (Alfaro-Cid *et al.*, 2009).

La temperatura ambiental influyó significativamente en la liberación de los tres compuestos estudiados, propiciando un aumento en sus TL (Cuadro 8). Este es el factor señalado con mayor frecuencia como responsable del aumento en las TL de diversos semioquímicos. Los compuestos reportados incluyen kairomonas (Torr *et al.*, 1997) feromonas (Van der Kraan y Ebberts, 1990.; Atterholt *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2001; Cork *et al.*, 2008) y alomonas (Shem *et al.*, 2009). También se han desarrollado modelos para predecir las TL de sustancias como tetradecenil acetato, un componente de feromonas de lepidópteros (Bradley *et al.*, 1995).

La contribución de la temperatura a la variación global de las TL de los tres compuestos fue menor con respecto a la influencia de otras variables, a juzgar por los coeficientes de determinación parciales de los modelos correspondientes (Cuadro 8). Lo anterior podría deberse a la oscilación de las temperaturas medias durante el tiempo que duró el estudio (30-46 °C). Este factor podría adquirir mayor importancia bajo condiciones de mayor variación de la temperatura.

Otra variable importante en la liberación de compuestos volátiles fue el tiempo de exposición de los liberadores en el invernadero; las TL de BOC1z disminuyeron significativamente con el transcurso del tiempo (cuadros 7 y 8).

Similarmente, las TL de compuestos constituyentes de las feromonas de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) (López *et al.*, 1991) y *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Olethreutidae) (Kehat *et al.*, 1994) decrecen con el tiempo. Tal disminución podría estar relacionada con el volumen residual del compuesto en el dispensador, como ocurre con la feromona de *C. pomonella* (McDonough *et al.*, 1992).

Cuadro 7. Modelos de regresión lineal múltiple generados para tres compuestos volátiles, liberados en viales de vidrio.

Compuesto	Modelo	R <sup>2</sup>	Pr > F
(Z)-β-ocimeno	TL= -98.7192 - 1.1452 (t) + 6.057 (T) + 14.4916 (O)	0.7163	< 0.0001
2-isobutil-3-metoxipirazina	TL= -393.3478 + 7.8731 (T) + 6.4798 (H) + 9.4234 (O)	0.7144	< 0.0001
3-hexen-1-ol acetato	TL= -117.3286 + 5.7484 (T) + 19.2055 (O)	0.7295	< 0.0001

TL: tasa de liberación (µg/h). t: tiempo de exposición del liberador (días). T: temperatura ambiente (°C). O: número de orificios en la tapa del emisor.

Cuadro 8. Contribución de variables en los modelos de regresión generados para tres compuestos volátiles, liberados en viales de vidrio.

Compuesto	Variable	R <sup>2</sup> parcial	Valor de F	Pr > F
(Z)-β-ocimeno	Tiempo de exposición	0.0677	8.59	0.0058
	Temperatura ambiental	0.0610	6.43	0.0156
	Número de orificios	0.5876	54.14	< 0.0001
2-isobutil-3-metoxipirazina	Temperatura ambiental	0.1133	9.31	0.0037
	Humedad relativa	0.3111	52.29	< 0.0001
	Número de orificios	0.2899	20.41	< 0.0001
3-hexen-1-ol acetato	Temperatura ambiental	0.0932	14.82	0.0004
	Número de orificios	0.6363	76.97	< 0.0001

Los modelos de regresión descritos podrían ser útiles en la estimación de la cantidad de orificios necesarios para alcanzar TL predeterminadas de BOC1z, MPIR y HEXAC, cuando se planeé utilizar viales con tapa de caucho como liberadores.

#### **4.6. Conclusiones**

Los liberadores tipo vial con hexano o aceite mineral, mantuvieron las tasas de liberación más estables (con relación a todos los emisores) de (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y 3-hexen-1-ol acetato, en el túnel de viento, durante las cuatro fechas de muestreo. Las tasas de liberación de los tres compuestos fueron más bajas cuando estos se disolvieron en aceite mineral que cuando se disolvieron en hexano.

Los emisores tipo vial con 1, 5, 9 o 13 orificios en la tapa, liberaron (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y 3-hexen-1-ol acetato de forma estable durante 51 o más días, en invernadero. Bajo las mismas condiciones, las tasas de liberación de 3-hexen-1-ol acetato y de (Z)- $\beta$ -ocimeno se mantuvieron iguales o cercanas a las tasas de referencia, en viales con 1 y 5 orificios en la tapa, respectivamente, durante 72 o más días.

Los modelos de regresión generados para los tres compuestos fueron significativos y mostraron buenos ajustes ( $R^2$  superiores a 0.71). La mayor parte de la variabilidad en las tasas de liberación fue explicada por la cantidad de orificios en la tapa de los viales, en el caso de (Z)- $\beta$ -ocimeno y 3-hexen-1-ol acetato, y por la humedad relativa, en el caso de 2-isobutil-3-metoxipirazina. La temperatura fue un factor importante en las tasas de liberación de los tres compuestos, y el tiempo de exposición de los emisores influyó en las tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno.

#### **4.7. Literatura citada**

Abreu, E. and C. Cruz. 1985. The occurrence of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* in Puerto Rico. Journal of the Agricultural University of Puerto Rico 69: 223-224.

- Addesso, K. M., H. J. McAuslane, and H. T. Albom. 2010. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Alfaro-Cid, E., A. I. Esparcia-Alcaráz, P. Moya, B. Femenia-Ferrer, K. Sharman and J. J. merele. 2009. Modeling pheromone dispensers using genetic programming. *In: Giacobini M. et al. (eds). Evo Workshops. LNCS 5484. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. pp. 635-644.*
- Andrews, K. L., A. Rueda, G. Gandini, S. Evans, A. Arango and M. Avedillo. 1986. A supervised control program for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* in Honduras, Central America. *Tropical Pest Management* 32: 1.4.
- Arcos, G., J. Hernández, D. E. Uriza, O. Pozo, y A. Olivera. 1998. Tecnología para producir chile jalapeño en la planicie costera del Golfo de México. INIFAP–PRODUCE. Secretaría de Agricultura, México. Folleto técnico No. 24. 206 p.
- Atterholt, C.A., M. J. Delwiche, R. E. Rice and J. M. Krochta. 1999. Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *J. Controlled Release* 57: 233-247.
- Bradley, S.J., D. M. Sucklin, K. G. McNaughton, C. H. Wearing and G. Karg. 1995. A temperature-dependent model for predicting release rates of pheromone from a polyethylene tubing dispenser. *J. Chem. Ecol.* 21(6): 745-760.
- Cork A., K. de Souza, D. R. Hall, O. T. Jones, E. Casagrande, K. Krishnain y Z. Syed. 2008. Development of a PVC-resin-controlled release formulation for pheromones and use in mating disruption of yellow rice stem borer, *Scirpophaga incertulas*. *Crop Prot.* 27: 248-255.
- Eller, F. J., R. J. Bartlet, B. S. Shasha, D. J. Schuster, D. G. Riley, P. A. Stansly, T. F. Mueller, K. D. Shuler, B. Johnson, J. H. Davis, and C. A. Sutherland. 1994. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20:1537-1555.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2000. Assigning values to non-detected/non-quantified pesticide residues in human health food exposure

- assessments. Guidance Document: Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency. Washington, D. C. 33 p.
- Golub M., J. Weatherston and M. H. Benn. 1983. Measurement of release rates of gossypure from controlled release formulations by mini-airflow method. *J. Chem. Ecol.* 9(3): 323-333.
- Hofmeyr H. and B. V. Burger. 1995. Controlled-release pheromone dispenser for use in traps to monitor flight activity of false codling moth. *J. Chem. Ecol.* 21(3): 355-363.
- Heuskin, S.; F. J. Verheggen; E. Haubruge; J. P. Wathelet; G. Lognay. 2011. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(3): 459-470.
- Johansson B.G., O. Anderbrant, J. Simandl, N. D. Avtzis, C. Salvadori, E. Hedenstrom, H. Edlund and H. E. Hogberg. 2001. Release rates for pine sawfly pheromones from two types of dispensers and phenology of *Neodiprion sertifer*. *J. Chem. Ecol.*, 27(4): 733-745.
- Kehat, M., L. Anshelevich, E. Dunkelblum, P. Fraishtat and S. Greenberg. 1994. Sex pheromone traps for monitoring the codling moth: effect of dispenser type, field aging of dispenser, pheromone dose and type of trap on male captures. *Entomol. Exp. Appl.* 70: 55-62.
- Krüger A. J and A. T. Tolmay. 2002. Prediction of the release characteristics of alcohols from EVA using a model based on Fick's second law of diffusion. *J. Appl. Polym. Sci.* 84: 806-813.
- Lopez J.D., B. A. Leonhardt and T. N. Shaver T.N. 1991. Performance criteria and specifications for laminated plastic sex pheromone dispenser for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Chem. Ecol.* 17(11), 2293-2305.
- McDonough L.M., W. C. Aller W.C. and A. L. Knight. 1992. Performance characteristics of a commercial controlled release dispenser of sex pheromones for control of codling moth (*Cydia pomonella*) by mating disruption. *J. Chem. Ecol.* 18(12): 2177-2189.

- Möttus, E., V. Nõmm, I. H. Williams and I. Liblikas. 1997. Optimization of pheromone dispensers for diamondback moth *Plutella xylostella*. J. Chem. Ecol. 23(9): 2145-2159.
- SAS (SAS Institute). 2004. SAS/STAT® 9.1 User's guide. Cary, NC. USA.
- Shem, P.M., P. M. Shiundu, N. K. Giconyo, A. H. Ali and R. K. Saini. 2009. Release kinetics of a synthetic tsetse allomone derived from waterbuck odour from a Tygon silicon dispenser under laboratory and semi field conditions. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 6(6): 625-636.
- Stipanovic, A.J., P. J. Hennessy, F. X. Webster and Y. Takahashi. 2004. Microparticle dispensers for the controlled release of insect pheromones. J. Agric. Food Chem. 52: 2301-2308.
- Suckling, D. M. 2000. Issues affecting the use of pheromones and other semiochemicals in orchards. Crop. Prot. 19: 677-683.
- Toapanta M. A., D. J. Schuster and P. A. Stansly. 2005. Development life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. Environ. Entomol. 34: 999-1008.
- Torr S.J., D. R. Hall, R. J. Phelps and G. A. Vale. 1997. Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Bull. Entomol. Res. 87: 299-311.
- Van der Kraan C. and A. Ebbers. 1990. Release rates of tetradecen-1-ol acetates from polymeric formulations in relation to temperature and air velocity. J. Chem. Ecol. 16(4): 1041-1058.
- Velázquez-González. 2011. Compuestos volátiles que median la interacción entre *Anthonomus eugenii* Cano y *Capsicum annum*. Tesis de Doctorado. Postgrado en Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, México. 59 p.
- Velázquez-González, J. C., J. Cibrián-Tovar, C. Hidalgo-Moreno y T. R. Vázquez-Rojas. 2011. Validación del método de aireación dinámica para la captura de compuestos volátiles de *Capsicum* spp. Revista Latinoamericana de Química 39: 7-16.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se identificaron 44 compuestos volátiles en las yemas florales y frutos de las cuatro especies hospederas de *Anthonomus eugenii* (*Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *Solanum americanum*) contempladas en la investigación. Estos correspondieron a seis grupos funcionales, predominando hidrocarburos y ésteres, por su frecuencia y abundancia.

Los compuestos (Z)-3-Hexenol, (E)- $\beta$ -ocimeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, metil salicilato,  $\beta$ -elemeno, coincidieron en todas las plantas hospederas analizadas.

Los compuestos (Z)-3-Hexenol, (E)- $\beta$ -ocimeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, metil salicilato,  $\beta$ -elemeno, hexil acetato, (Z)-3-hexenil butirato, (Z)-3-Hexenil isovalerato, (Z)-3-Hexenil isovalerato, (Z)-3-Hexenil isobutirato, hexil butirato y (E)-2-Hexenil 2-metilbutirato estuvieron presentes en las tres especies del género *Capsicum* (*C. annuum*, *C. frutescens* y *C. pubescens*).

Una mezcla sintética terciaria de (Z)- $\beta$ -ocimeno, D-limoneno y 2-isobutil-3-metoxipirazina atrajo a hembras y machos adultos de *Anthonomus eugenii*. La suma de (Z)-3-hexenil acetato o terpinoleno, a la combinación anterior, propició un aumento en la respuesta de hembras y machos, respectivamente.

La sustitución de (Z)- $\beta$ -ocimeno por (E)- $\beta$ -ocimeno, en la mezcla sintética terciaria, aumentó la respuesta de los machos, mientras que la eliminación de D-limoneno, no redujo la efectividad atrayente de la misma.

La mezcla de los compuestos volátiles (E)- $\beta$ -ocimeno, (Z)- $\beta$ -ocimeno y 2-isobutil-3-metoxipirazina, fue tan atractiva como la feromona de agregación de *A. eugenii*, para hembras y machos de esta especie.

La combinación de (E)- $\beta$ -ocimeno, (Z)- $\beta$ -ocimeno y 2-isobutil-3-metoxipirazina, con la feromona de agregación de *A. eugenii*, atrajo más machos que la feromona sola.

Los liberadores tipo vial mantuvieron las tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y 3-hexen-1-ol acetato más estables.

Las tasas de liberación de 3-hexen-1-ol acetato y de (Z)- $\beta$ -ocimeno se mantuvieron iguales o cercanas a las tasas de referencia, en viales con 1 y 5 orificios en la tapa, respectivamente, durante 72 o más días.

La mayor parte de la variabilidad en las tasas de liberación fue explicada por la cantidad de orificios en la tapa de los viales, en el caso de (Z)- $\beta$ -ocimeno y 3-hexen-1-ol acetato, y por la humedad relativa, en el caso de 2-isobutil-3-metoxipirazina. La temperatura fue un factor importante en las tasas de liberación de los tres compuestos, y el tiempo de exposición de los emisores influyó en las tasas de liberación de (Z)- $\beta$ -ocimeno.