



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD - ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FEROMONA SEXUAL DE *Hypsipyla grandella* Zeller

JOSÉ MANUEL PINEDA RÍOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: Aislamiento e identificación de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller realizada por el alumno: José Manuel Pineda Ríos, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

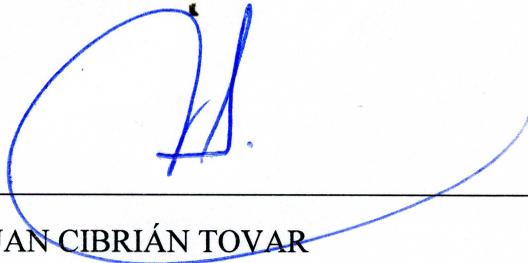
MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

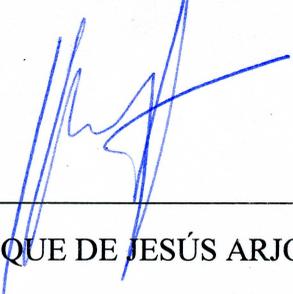
CONSEJERO: _____


DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

ASESOR: _____


DR. DAVID CIBRIÁN TOVAR

ASESOR: _____


DR. ENRIQUE DE JESÚS ARJONA SUÁREZ

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Noviembre de 2014.

RESUMEN GENERAL

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FEROMONA SEXUAL DE

Hypsipyla grandella Zeller

José Manuel Pineda Ríos, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

Hypsipyla grandella es la principal plaga en plantaciones de caoba (*Swietenia macrophylla*) y cedro (*Cedrela odorata*) en América Latina y el Caribe. Las larvas de este insecto al alimentarse causan cambios en la dominancia apical del árbol, que conduce a un desarrollo anormal y producción de ramas secundarias que afectan a la calidad de la madera y el rendimiento. La hembra de esta especie produce una feromona sexual que puede ser usada para monitorear y ayudar en el manejo del barrenador de la caoba. En este trabajo se tuvo como objetivo aislar e identificar los compuestos de su feromona sexual. Para ello se estableció una cría en el laboratorio, de la que se obtuvieron hembras vírgenes de *H. grandella*. El aislamiento de la feromona se llevó a cabo por microextracción en fase sólida (MEFS) en diferentes modalidades, aireación dinámica y extracción en disolvente orgánico. El análisis químico de los compuestos se hizo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-EM). La identidad química de los compuestos de la feromona se estableció con base en la comparación de los tiempos de retención e índices de Kovats y en los espectros de masas de la biblioteca NIST y de estándares auténticos. Se identificaron los compuestos siguientes: Z9-tetradecen-1-ol (Z9-14:OH), Z,E-9,12- tetradecadien-1-ol (Z9E12-14:OH), Z9-tetradecen-1-il acetato (Z9-14:Ac) y Z,E-9,12- tetradecadien-1-il acetato (Z9E12-14:Ac). La MEFS en una de sus modalidades y extracción en disolvente orgánico presentaron ventajas sobre las demás técnicas.

Palabras clave: *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata*, barrenador de la caoba, feromonas.

GENERAL ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE SEX PHEROMONE OF

Hypsipyla grandella Zeller

José Manuel Pineda Ríos, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014

Hypsipyla grandella is the main pest in plantations of mahogany (*Swietenia macrophylla*) and cedar (*Cedrela odorata*) in Latin America and the Caribbean. The insect larvae by feeding causes changes in apical dominance of the tree, leading to abnormal development and production of secondary branches affecting wood quality and performance. The female of this species produces a sex pheromone that can be used to monitor and help manage mahogany. This study aimed to isolate and identify the sex pheromone compounds. In order to obtain virgin females a colony of *H. grandella* was established in laboratory. The isolation of the pheromone was performed by solid- phase microextraction (SPME) in different modalities, dynamic headspace and organic solvent extraction. The chemical analysis of the compounds was done by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The chemical identity of the pheromone compounds was established based on the comparison of retention times and Kovats indices, and comparison of mass spectral fragmentations with those from NIST library and from authentic synthetic standards. The following compounds were identified: Z9-tetradecen-1-ol (Z9-14:OH), Z, E-9,12-tetradecadien-1-ol (Z9E12-14:OH), Z9-tetradecen-1-yl acetate (Z9-14:Ac) and Z,E-9,12-tetradecadien-1-yl acetate (Z9E12-14:Ac). SPME and organic solvent extraction had advantages over the other techniques.

Keywords: *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata*, mahogany shoot borer, pheromones.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero proporcionado durante la realización de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados campus Montecillo**, por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación profesional y alcanzar este logro académico.

A la línea prioritaria de investigación 16 (**LPI-16**) **Innovación tecnológica** y al **Fideicomiso para la investigación científica y desarrollo tecnológico** por el apoyo N°. 167304 para la realización de este trabajo de investigación.

Al **Dr. Juan Cibrián Tovar** por su apoyo como Consejero y Director de tesis, por darme la oportunidad y confianza para realizar este trabajo, que con su experiencia, paciencia y acertadas sugerencias supo guiarme hasta el final de éste.

Al **Dr. David Cibrián Tovar** por la atención brindada, aportaciones y críticas constructivas para el mejoramiento de este trabajo.

Al **Dr. Enrique de Jesús Arjona Suárez** por el tiempo brindado, su apoyo, paciencia, acertadas y detalladas correcciones para enriquecer este trabajo.

A la **Dra. Rosa María López Romero** por todas sus valiosas contribuciones al trabajo, acertadas sugerencias, por su siempre buena disposición y paciencia para el mejor desarrollo de este.

A la **Dra. Celina Llanderal Cazares** por el espacio brindado en su laboratorio cuando lo necesité y por mostrarse siempre dispuesta a apoyarme.

Al **Dr. Jesús Romero Nápoles** por el apoyo brindado para la identificación de la especie.

Al M. C. **Jorge Valdez Carrasco** por el apoyo incondicional para la toma de fotografías de pupas y genitalia del macho de la especie.

Al Sr. **Eduardo Paredes García** por el apoyo brindado durante la realización de colectas en camp

DEDICATORIAS

A mis padres:

Rigoberto Pineda e Ignacia Ríos por todo el cariño y apoyo que de ellos siempre he recibido, por ser siempre mi guía.

A mis hermanos:

Jesús, Aurora, Zeida, Carime, Marideisa, Ma. Adelvit, Nelida y Analut por el apoyo incondicional, su cariño y buenos consejos que de su parte siempre he recibido.

A Evelia, Gabriel, Cesar, Pedro y Gil, que ya son parte de mi familia y de quienes también siempre he recibido apoyo y buen trato.

A mis amigos:

Luis Francisco Salomé y Ricardo Castro por apoyarme para culminar este trabajo, por toda la paciencia y dedicación para la enseñanza que de ellos obtuve.

A Shaira Margalli y Elsy Delgado por su amistad y apoyo incondicional que como compañeras de laboratorio siempre me demostraron.

A todos mis amigos del Colegio de Postgraduados y de la Universidad Autónoma Chapingo que durante mi estancia en la maestría se convirtieron en mi segunda familia.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 <i>Hypsipyra grandella</i>	3
2.1.1 Huevo.....	4
2.1.2 Larva	4
2.1.3 Pupa.....	5
2.1.4 Adulto.....	5
2.1.5 Biología.....	6
2.1.6 Plantas hospederas.....	8
2.1.7 Manejo de <i>H. grandella</i>	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Colecta de insectos en campo	13
3.2 Establecimiento del pie de cría.....	13
3.3 Corroboración de la especie	15
3.4 Extracción de la feromona sexual	16
3.4.1 Microextracción en fase sólida (MEFS).....	16
3.4.2 Aireación dinámica	17
3.4.3 Extracción en disolvente orgánico	17
3.5 Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-EM)	18
3.6 Análisis estadístico	19
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1 Establecimiento del pie de cría.....	20
4.2 Corroboración de la especie	20
4.3 Extracción de la feromona sexual	21

4.3.1 Microextracción en fase sólida	21
4.3.2 Aireación dinámica	25
4.3.3 Extracción en disolvente orgánico	26
4.4 Comparación de las diferentes técnicas de extracción	30
V. CONCLUSIONES.....	33
VI. LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación entre las diferentes técnicas de extracción empleadas para el aislamiento de la feromona sexual de <i>H. grandella</i>	31
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Larva de último instar de <i>H. grandella</i>	13
Figura 2. Segmentos posteriores de pupas de ambos sexos de <i>H. grandella</i>	14
Figura 3. Adulto de <i>H. grandella</i>	14
Figura 4. Huevo fértil de <i>H. grandella</i>	15
Figura 5. Órgano genital masculino de <i>H. grandella</i>	21
Figura 6. Cromatograma de compuestos obtenidos de la superficie interna de viales.	22
Figura 7. Cromatograma de compuestos procedentes del espacio de cabeza de 2 mL de diclorometano y cuatro glándulas... ..	24
Figura 8. Cromatograma de compuestos obtenidos del frotado de glándulas sobre la fibra de MEFS.	25
Figura 10. Cromatograma de compuestos estándares.....	27
Figura 11. Comparación de espectro de iones	28

I. INTRODUCCIÓN

La caoba (*Swietenia macrophylla*) y el cedro (*Cedrela odorata*) son dos especies forestales cuyas maderas tienen un prestigio mundial y están bien cotizadas en el mercado internacional. Ambas especies pertenecen a la familia Meliaceae y tienen su distribución natural en América Latina, las Islas del Caribe y otras partes del mundo, sin embargo su cultivo es difícil debido a los frecuentes ataques de la larva de *Hypsipyla grandella* (Lep. Pyralidae) (Grijpma y Ramalho, 1969). El principal daño es causado por la larva que destruye el meristemo apical, haciendo túneles en los tallos jóvenes. Los rebrotes de las plantas afectadas, dan como resultado numerosas ramas laterales y, consecuentemente, árboles mal formados, de mala calidad para la producción de madera. Los ensayos para establecer en gran escala plantaciones de cedro y caoba han fallado debido a esta plaga (Briceño, 1997).

H. grandella es considerada la principal plaga forestal en América Latina y el Caribe, lo cual se debe a tres factores: 1) Bajo umbral de tolerancia, puesto que con una larva por árbol el daño resulta severo, 2) Especificidad sobre miembros de la subfamilia Swietenioideae de las Meliaceae (13 especies neotropicales), entre las que figuran especies de alto valor económico y 3) Su amplia distribución geográfica, desde Florida (EE.UU.) hasta Argentina, incluyendo las islas del Caribe (Hilje y Cornelius, 2001). La rápida destrucción y deflexión de las meliáceas existentes, junto con los obstáculos encontrados para establecer y mantener exitosamente las especies nativas de meliáceas, hace necesario realizar esfuerzos para hallar métodos de control de esta plaga, los cuales deben ser eficientes, económicos y ecológicamente ejecutables (Briceño, 1997).

Una forma de manejar de esta plaga es a través de la feromona sexual producida por la hembra, la cual puede ser utilizada principalmente en programas de detección y monitoreo

(Macías- Sámano, 2001), trapeo masivo, impregnación atmosférica y atracción-liberación. Existen avances importantes sobre esto (Borek *et al.*, 1991; Effraim, 1997; Hilje *et al.*, 2002; Macías- Sámano *et al.*, 2006), sin embargo aún no se ha podido determinar de manera precisa cuál o cuáles son los compuestos.

1.1 Objetivo

Aislar e identificar los compuestos de la feromona sexual de *H. grandella*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Los daños causados por el taladrador de brotes del género *Hypsipyla* Ragonot representan el mayor obstáculo para el establecimiento y el cultivo de las especies maderables de alto valor pertenecientes a la familia Meliaceae. El daño más grave a los árboles es la elaboración de túneles por las larvas en brotes en desarrollo, esto conduce a la marchitez y muerte del brote terminal, ocasionando esto la producción de brotes laterales, que implica un retraso en el crecimiento, ramificación de forma continua y en gran medida árboles deformes de bajo valor para la producción de madera. La muerte del árbol puede ser el resultado de ataques severos y repetidos (Griffiths, 1996).

De acuerdo con Heinrich (1956) y Bradley (1968), se reconocen 11 especies de *Hypsipyla*, de las cuales cuatro están presentes en América y siete en la región de África / Asia. *Hypsipyla robusta* (Moore) es la más ampliamente distribuida, presentándose en África occidental y oriental, Asia y el Pacífico. *H. grandella* se encuentra a través del Centro y Sur América tropical, en el Caribe y en el extremo sur de Florida (Entwistle, 1967). Las especies restantes son menos conocidas y están más restringidas en su distribución. Las presentes en América son *H. dorsimaculata* (Schaus), *H. fluviatella* Schaus, y *H. ferrealis* (Hampson), y los presentes en la región de África son *H. albipartalis* (Hampson), *H. ereboneura* Meyr., *H. debilis* Caradja, *H. elachistalis* Hampson, *H. rotundiplex* Hampson, y *H. swezeyi* Tams (Griffiths, 1996).

2.1 *Hypsipyla grandella*

H. grandella es una palomilla nocturna cuyo estado larvario es conocido comúnmente como “barrenador del tallo”, “barrenador de brotes” o barrenado de las meliáceas”. Se distribuye

por todo el centro y sur de América tropical, el Caribe y el extremo sur de Florida, EE.UU. En México se distribuye en Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Cibrián *et al.*, 1995; Howard y Mérida, 2004).

H. grandella pertenece al Reino Animalia, Phylum Artrópoda, Clase Insecta, Orden Lepidoptera, Familia Pyralidae, Subfamilia Phycitinae.

2.1.1 Huevo

El huevo, es de forma hemisférica, aplanada en su base. Su superficie presenta pequeñas proyecciones cónicas. En la parte superior y casi en el centro del huevo se encuentra una pequeña cavidad. Recién ovipositado es de color blanco cremoso, para después cambiar a tonos grisáceos o rojizos, sobre todo cuando la larva está a punto de emerger. En promedio mide 1 mm de diámetro (Cibrián *et al.*, 1995).

2.1.2 Larva

Tipo eruciforme, con cabeza bien desarrollada de color café, cuerpo subcilíndrico, alargado, con setas poco obvias, pero con manchas apodemales bien definidas; al madurar pueden ser de color verde claro, verde azulado, pardo violáceo o rosa amarillento. En su madurez alcanzan longitudes que varían de 20 a 25 mm, con anchura de 4 a 5 mm (Cibrián *et al.*, 1995).

Becker (1973), menciona que en el último instar las larvas presentan cabeza de color castaño; hipognata; patas torácicas castaño claro; placa protorácica castaño oscuro; placa anal amarillo pálido, pináculos medianos, poco salientes, castaño oscuro, casi negros; espínulas poco visibles, un poco más oscuras que el color general del cuerpo.

2.1.3 Pupa

Color café oscuro, de tipo obtecta, con una longitud que varía entre 13 y 19 mm, envuelta en un cocón de seda (Cibrián *et al.*, 1995). Superficie con puntuación esparcida con excepción del lado ventral del tórax que es liso, antenas exteriores a las patas medianas, proboscis y patas medianas alcanzan el ápice de las alas; patas posteriores por debajo de la proboscis, a veces un poco visibles en la extremidad. Coxas anteriores parcialmente delimitadas. Larvópodos visibles en el 5° y 6° segmentos, espiráculos desarrollados y salientes, setas pequeñas y poco visibles, cremaster poco saliente con ocho setas expresadas, con extremidad en forma de gancho, dispuestas en arco. En la hembra, el VIII segmento abdominal está dividido en su mitad por la abertura genital (AG), mientras que en el macho ésta aparece desplazada hacia el IX segmento y está acompañada por dos pequeños abultamientos (Vargas *et al.*, 2001).

2.1.4 Adulto

El tamaño de los adultos varía desde 20 hasta 40 mm de expansión alar. La longitud promedio de las alas de las hembras es ligeramente mayor que la de los machos. Las medidas respectivas son 13 a 17 mm en hembras y 12 a 16 mm en machos. Éstos se diferencian de las hembras por tener las antenas ciliadas. La cabeza y el tórax están cubiertos con escamas grises. Las alas anteriores son grisáceas con un brillo violáceo. En el centro del ala existe una mancha blanquecina. Las alas posteriores son de color gris claro y ligeramente transparentes. El abdomen es gris oscuro en su parte dorsal y blanquecino en su parte ventral (Cibrián *et al.*, 1995). Palpos labiales con el primer segmento blanquecino, el segundo gris claro y el tercero gris oscuro (Becker, 1973). En cuanto a la proporción de sexos (hembras: machos), comúnmente es de 1:1 (Ramírez- Sánchez, 1964; Taveras, 1999).

2.1.5 Biología

Las palomillas adultas son nocturnas y viven de siete a ocho días (Holsten, 1976), emergen de su capullo pupal en el crepúsculo, permaneciendo inactivas durante varias horas (Cibrián *et al.*, 1995; Griffiths, 1996). El comportamiento de post-emergencia se inicia con un período de desplazamiento, expansión y secamiento de las alas, aproximadamente de unos 10 min después de la emergencia (antes de las 19 h) (Sliwa y Becker, 1976). Inician su actividad a media noche prolongándose hasta las cinco de la mañana. Durante este período nocturno, mediante sus sensilas olfativas el insecto detecta los compuestos volátiles que emanan de las hojas frescas del árbol hospedante, y también compuestos volátiles que emanan de túneles viejos, resultantes de ataques previos, en áreas ya infestadas. Las hembras vírgenes aún sin copular son capaces de encontrar su árbol hospedante, donde luego atraerán el macho para que ocurra la cópula (Grijpma y Gara, 1970; Holsten y Gara, 1974), éste llega muy posiblemente orientado por la producción del atrayente sexual de la hembra (Gara *et al.*, 1973). El rango de vuelo de las palomillas de *H. grandella* en busca de árboles hospederos adecuados es de 1.5 a 7 m de altura y aparentemente requieren de menos de 48 h para iniciar su actividad sexual. Cinco horas después del período de oscuridad, la hembra sexualmente activa inicia el llamado de cortejo; este llamado se expresa con un doblamiento dorsal del abdomen hacia arriba y entre las alas, a lo cual el macho responde volando hacia la hembra y permaneciendo 10 a 15 cm de ella. Después de un breve cortejo se inicia la cópula que dura más de una hora (Sliwa y Becker, 1976). La hembra solo copula una vez, pero es suficiente para producir un promedio de 320 huevos que presentan un alto grado de mortalidad (Cibrián *et al.* 1995; Griffiths, 2001).

Los huevos son ovipositados durante las primeras horas de la mañana y en diferentes hospederos, de forma individual aunque a veces se encuentran en grupos de 3 a 4. La oviposición

ocurre en cicatrices foliares, superficie de brote nuevos, nervaduras de las hojas o sobre la superficie de los frutos de su hospedero (Howard y Mérida, 2004). Roovers (1971), menciona que el periodo de incubación varía entre 2,5 y 6 días (promedio 4 días) dependiendo de las condiciones de temperatura. Las larvas recién emergidas frecuentemente penetran primero la yema axilar y luego, el estado posterior, se mueve barrenando el retoño terminal no lignificado, la yema axilar o la punta de las ramas. La alimentación continúa generalmente en la médula, consumiendo la corteza, floema y hojas tiernas. El número de estados larvarios puede variar entre 5 y 7 pero, más frecuentemente, han sido observados 6 instares (Hidalgo y Berríos, 1972). Las larvas protegen sus agujeros de entrada y túneles construyendo un tejido, el cual es cubierto con partículas de plantas y excrementos; estas estructuras protectoras son también construidas antes de la pupación. El último instar larvario hila frecuentemente su capullo en el final superior del túnel, donde ellos pupan. El ciclo total de vida es completado en 4 a 7 semanas (promedio 5 semanas) dependiendo de las condiciones climáticas y la disponibilidad de alimento adecuado. La duración promedio de los diferentes estados de *H. grandella* (a 25°C y 60% de humedad relativa) son: huevos: 4 días, larvas: 20 días, pupas: 10 días, y adultos (hasta oviposición): 2 días. (Briceño, 1997).

Aparentemente la palomilla pasa las horas de luz en el dosel de grandes árboles o en malezas (Grijpma y Gara, 1970), y durante la estación lluviosa, concentra su infestación en plantas que exhiben nuevo crecimiento. Durante la estación seca, las plantas hospederas pierden sus hojas, y en este período las hembras ovipositan sobre los tallos defoliados.

2.1.6 Plantas hospederas

La alimentación de *H. grandella* está restringida a plantas de la familia Meliaceae, subfamilia Swietenioideae (Das *et al.*, 1984; Agostinho *et al.*, 1994), sin embargo, la gran mayoría de los trabajos que describen la incidencia de esta plaga, lo hacen principalmente sobre *S. macrophylla* y *C. odorata* como sus hospedantes. Esto quizá se deba a que la mayoría de los informes provienen de plantaciones comerciales y son esas dos las especies más utilizadas. Sin embargo, hay otros hospedantes nativos en América, que no son utilizados comercialmente (Macías, 2001).

La familia Meliaceae se encuentra distribuida en América, África y Asia e incluye cerca de 50 géneros y 1 000 especies. En los neotrópicos se han descrito ocho géneros: *Cabrlea*, *Carapa*, *Cedrela*, *Guarea*, *Ruegea*, *Schmardea*, *Swietenia* y *Trichilia*, siendo *Swietenia* y *Cedrela* los géneros más importantes desde el punto de vista forestal (Navarro, 1999). Ésta se divide en dos grandes subfamilias: Swietenioideae y Melioidae, ambas difieren bioquímicamente, específicamente en la forma estructural de los compuestos limonoides característicos de la Swietenioideae, que son un grupo de tetranortriterpenoides con propiedades antialimentarias o tóxicos contra una amplia gama de especies de invertebrados (Das *et al.*, 1984; Agostinho *et al.*, 1994). La aparente restricción de *Hypsipyla* spp. a los hospedantes de una sola subfamilia que contiene limonoides de un tipo de estructura particular, sugiere posible coevolución entre *Hypsipyla* y la Swietenioideae (Griffiths, 1996).

El cedro (*Cedrela odorata*) y la caoba (*Swietenia macrophylla*) se encuentran distribuidas desde el sur de México hasta Bolivia, y están entre las especies maderables más importantes del trópico americano y del mundo. Desde hace centenares de años, el abastecimiento de la industria forestal tropical de México se ha basado en la extracción selectiva de estas dos especies en bosques naturales (Robbins, 2002). Se exportan en forma de tablas, trozos de cuatro esquinas,

madera aserrada y láminas de chapa, son de buena aceptación mundial en múltiples aspectos, comenzando por la construcción, pero además son muy apreciadas para la manufactura de muebles (Cruz, 2003; Rzedowski y Calderón, 1993). A pesar del gran potencial de las áreas tropicales para el establecimiento de plantaciones forestales de cedro y caoba, uno de los factores principales que limitan su desarrollo es el ataque a sus brotes por el barrenador, *H. grandella*, el cual como su nombre lo indica ataca el meristemo apical y/o los brotes jóvenes, lo que ocasiona la bifurcación y deformación de tallos. De no manejar adecuadamente los rebrotes, en muchos casos el fuste no alcanza dimensiones comerciales. Debido al problema que *Hypsipyla* representa, no existen grandes plantaciones que se encuentren en plena producción en México ni en otras áreas de distribución natural de estas dos especies (Wightman *et al.*, 2005).

2.1.7 Manejo de *H. grandella*

De acuerdo con Newton *et al.* (1993), una amplia gama de enfoques silviculturales se han aplicado a la producción de meliáceas susceptibles a *H. grandella*. La mayoría han resultado en fracaso. Sin embargo, hay ejemplos de ensayos en los que el daño del barrenador ha sido al menos parcialmente controlado por métodos culturales. La mayoría de estos ensayos implican establecimiento de meliáceas con otros árboles o cultivos. El mismo autor señala que a pesar de esta falta de información, el éxito en el control silvicultural se ha atribuido a tres procesos principales: los efectos del sombreado; la baja densidad de especies sensibles y la tasa de crecimiento.

De acuerdo con Briceño (1997), se debe realizar una buena la selección de la semilla, desinfectar y mezclar adecuadamente del sustrato para siembra, seleccionar adecuadamente el suelo para la plantación (buen drenaje y fertilidad). Periódicamente realizar prácticas

silviculturales como: platoneo y fertilización, poda de las ramas más viejas y cubrimiento de las heridas con un cicatrizante, aplicación de fertilizantes foliares y aspersión de un insecticida ovicida tratando de cubrir bien las yemas axilares y apicales.

El combate de *H. grandella* con sustancias químicas ha resultado poco eficaz debido al comportamiento que ésta presenta, ya que la eclosión es más frecuente en las primeras horas de la noche, y las aplicaciones se hacen durante el día. Aunado a esto, el tiempo de exposición al insecticida es relativamente corto, ya que cuando el huevo eclosiona, la larva penetra rápidamente en los tejidos de la planta. Por lo tanto en términos económicos, no es rentable, dado que la persistencia de los insecticidas en condiciones tropicales es baja, y la frecuencia de ataques es muy alta debido al corto ciclo de vida del insecto (Grijpma y Ramalho, 1969; Wilkins *et al.*, 1976).

Briceño (1997) menciona que el control biológico bajo condiciones ideales (alta humedad relativa y altas temperaturas), ofrece ventajas en relación al control químico, sin embargo, las poblaciones del insecto deben estar por debajo del umbral económico y además provee un sistema de control a más largo plazo. Hilje y Cornelius (2001) señalan que se han identificado al menos 11 especies de parasitoides de huevecillos, incluyendo avispidas (familias Braconidae, Ichneumonidae y Trichogrammatidae); como es el braconido *Bracon chontalensis* y moscas (Tachinidae), así como depredadores (avispa grande, chinches, arañas, etc.).

El control mecánico es un método tedioso y caro, pero eliminando unas cuantas pupas del insecto, se evitaría la presencia de un buen número de futuras larvas que estarían barrenando nuevas plantas. Se necesita la capacitación del personal para el reconocimiento de los daños en campo, el cual podría llevar a cabo la eliminación de pupas con el uso de instrumentos punzo-penetrantes (Briceño, 1997).

El manejo etológico se basa en el control de poblaciones plaga mediante el uso de sustancias químicas que modifican su comportamiento, denominándose semioquímico a cualquier sustancia que transmite información entre organismos, estos a su vez se clasifican en feromonas (comunicación intraespecífica) y aleloquímicos (comunicación interespecífica); dentro de estos últimos se encuentran las kairomonas (benefician al receptor), las alomonas (benefician al emisor) y las sinomonas (benefician a ambos) (Blanco, 2004).

En el caso de las feromonas, estas se clasifican de acuerdo al modo de acción o por el tipo de comportamiento que ocasionan, y pueden ser: sexuales, de agregación, de alarma, de rastreo, de distribución espacial, de marcación, etc. Casi todas las especies de palomillas usan las feromonas sexuales para apareamiento en dos estados de comportamiento precopulatorio: la atracción sexual y el comportamiento de cópula (Blanco, 2004).

El uso de la feromona sexual de *H. grandella*, pudiera ser un método eficaz en el manejo de la plaga. Taveras (1999) menciona que los picos poblacionales de *H. grandella* en Turrialba se presentan cada 1881 grados-día y la densidad poblacional dependerá principalmente de la temperatura, la disponibilidad de brotes nuevos y la mortalidad. Por su parte Cibrián *et al.* (1995) mencionan que el uso de trampas de feromonas, ya sea mediante la técnica de confusión sexual o con el trapeo masivo durante las etapas iniciales de la población, podría colaborar a evitar su establecimiento en la plantación. Un dato importante es que este procedimiento solo se necesitaría realizar durante los primeros 5-8 años (según el área geográfica) cuando la plantación es más susceptible al ataque.

En estudios anteriores se han llevado a cabo pruebas de atracción en campo con mezclas de compuestos feromonales obtenidos principalmente con extractos glandulares, sin embargo los resultados no han sido concluyentes. Effraim (1997), realizó estudios de campo en Costa Rica,

encontró que el Z9E12-14:OH 100 µg por septo atrajo a pocos machos. Por su parte, Macías-Sámano *et al.* (2006) quienes identificaron cuatro compuestos de 14 carbonos (dos alcoholes y dos acetatos), realizaron pruebas de campo, pero reportan que únicamente la combinación de los dos acetatos es atractiva al insecto.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de insectos en campo

Se colectaron brotes dañados por *H. grandella* en una plantación de cedro de siete años de edad en condiciones de abandono, ubicada en la población de Las Cruces, municipio de Chontla, Veracruz, en las coordenadas N 21° 14'46 11" W 097° 56' 35.2" a 356 msnm. Los brotes se transportaron a laboratorio, donde se extrajeron los estados inmaduros del insecto.

3.2 Establecimiento del pie de cría

Para su alimentación, las larvas (Fig. 1) de diferentes instares se colocaron de manera individual en recipientes de plástico de 40 mL con tallos y hojas de cedro (*Cedrela odorata*); cada 72 h se revisó el estado de las mismas, reemplazando aquéllas en descomposición por nuevas. Las pupas fueron extraídas de los recipientes al momento de su aparición. Las condiciones de cría fueron $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 10\%$ y fotoperiodo de 12:12 h luz: obscuridad (L: O).



Figura 1. Larva de último instar de *H. grandella*.

El sexo de las pupas se determinó diferenciando hembra y macho a través de la abertura genital (Fig. 2) con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-10®, Japan), posteriormente se colocaron en jaulas separadas, hasta la emergencia del adulto.

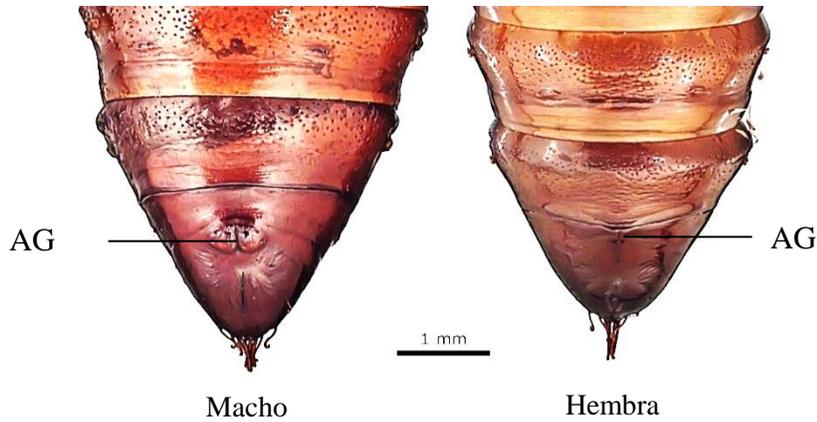


Figura 2. Segmentos posteriores de pupas de ambos sexos de *H. grandella*, resaltando la abertura genital (AG).

Los adultos (Fig. 3) se alimentaron con solución azucarada al 10% colocada en algodón, los destinados al incremento del pie de cría se introdujeron en una jaula de cópula de 35x25x25 cm (largo x ancho x alto), elaborada de metal con una funda de tela tipo tul. Ésta estuvo colocada a 1.65 m de altura y bajo la misma se pusieron plantas de cedro (2 años de edad) para estimular el apareamiento y oviposición.

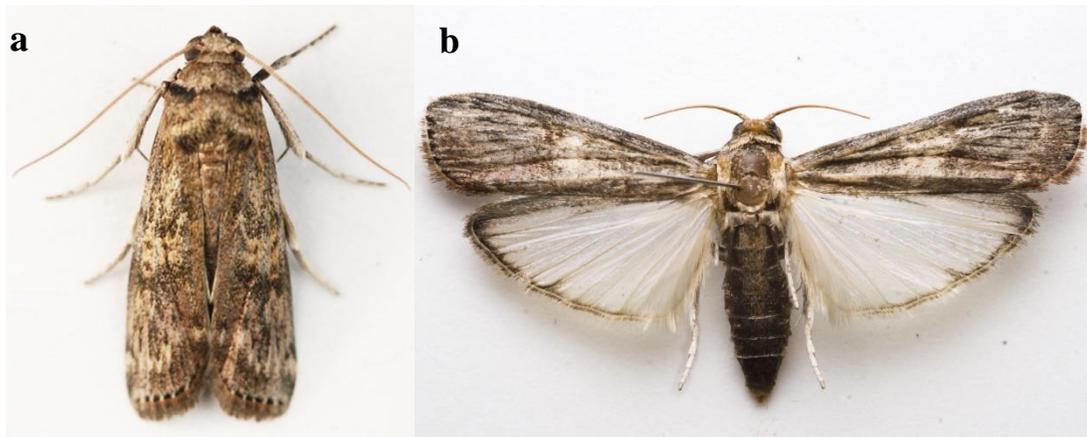


Figura 3. Adulto de *H. grandella*: a) posición de reposo (alas sobrepuestas) b) alas extendidas

Los huevecillos fértiles de coloración rojiza (Fig. 4), fueron desprendidos de las paredes de malla previamente humedecidas con un pincel y se colocaron entre hojas de cedro, que sirvieron como alimento al momento de la emergencia.



Figura 4. Huevo fértil de *H. grandella*.

Se obtuvieron adultos de *H. grandella* del pie de cría para llevar a cabo la corroboración de la especie, ésta se realizó en el laboratorio de Taxonomía de Insectos del Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, con base en las características taxonómicas de la genitalia del macho y a través de los caracteres morfológicos de los adultos de esta especie (Becker, 1973). Los ejemplares identificados fueron depositados en la colección de insectos del programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

3.4 Extracción de la feromona sexual

3.4.1 Microextracción en fase sólida (MEFS)

Se colocaron de manera individual en viales de vidrio de 25 mL, dos hembras de 2 d de emergidas (se hicieron seis repeticiones donde cada hembra representó una repetición). Para el aislamiento de los compuestos se usó una fibra de MEFS de 100 µm polidimetilsiloxano, Supelco®, la cual fue expuesta a estas hembras por 48 h, transcurrido el tiempo fue desorbida en el CG para el análisis de los compuestos. Posteriormente las palomillas fueron retiradas de los viales y estos fueron lavados con 1 mL de diclorometano grado cromatográfico (Merck) cada uno por 3 min. Para eliminar escamas y otros detritos orgánicos los 2 mL resultantes del lavado de los frascos fueron filtrados utilizando una pipeta Pasteur con fibra de vidrio como filtro, y posteriormente concentrado a 20 µl bajo una corriente de nitrógeno; el extracto resultante se almacenó también a -5 °C hasta su análisis. En otra prueba, repitiendo el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvieron los 2 mL de lavado de frascos, los cuales se filtraron, y se agregaron cuatro glándulas sexuales de hembras vírgenes, se dejaron extraer por 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de extracción se colocó la fibra de MEFS por 1 h en el espacio de cabeza y posteriormente fue analizada, los análisis para este caso se hicieron por triplicado.

Por último para las pruebas de MEFS se colocaron en una jaula de tul palomillas hembras vírgenes de 2 y 3 d de emergidas, cuando éstas iniciaron el llamado de cortejo se tomaron de manera individual usando la metodología de Frérot *et al.* (1997), se ejerció una suave presión sobre el abdomen hasta lograr la exposición total de la glándula y aun unida al cuerpo de la palomilla se frotó la glándula de esta misma en la superficie de la fibra, posteriormente con una pinza entomológica del número 5 se extirpó la glándula y nuevamente se volvió a frotar sobre la

superficie de la fibra para ser inmediatamente analizada. Se hicieron seis repeticiones para esta prueba, donde se usaron tres glándulas por repetición.

3.4.2 Aireación dinámica

Se colocaron 18 hembras vírgenes en un recipiente de plástico con capacidad de 3.5 L. Las hembras se encontraban de forma aislada en frascos de plástico tipo tarro de 40 mL, a los cuales se les realizaron aberturas en las partes laterales y en la tapa, que fueron cubiertas con tela de tul. Con una bomba de aire Elite 802 ® se hizo pasar un flujo de aire de 1 L min^{-1} utilizando un cartucho de 150 mg de Tenax® como filtro del aire. Como absorbente de los compuestos volátiles se utilizó un segundo cartucho colocado al final del sistema el cual también contenía 150 mg de Tenax®. El tiempo de captura fue de 12 h, $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $60 \pm 2\%$ de humedad relativa. Los compuestos absorbidos se recuperaron lavando el segundo cartucho con 8 mL de hexano grado cromatográfico, el extracto hexánico se concentró a 50 μL bajo una corriente de nitrógeno, para después ser analizado. Estas pruebas se hicieron por triplicado, siendo el conjunto de 18 hembras analizadas por 12 h una repetición.

3.4.3 Extracción en disolvente orgánico

Se extirparon glándulas de hembras vírgenes de 2 y 3 d de emergidas, y modificando la metodología empleada por Bosson y Gallois (1982) para *Hypsipyla robusta* (Moore) (Lepidoptera: pyralidae), las glándulas fueron colocadas en 200 μL de hexano, se extrajeron por 3 h y posteriormente se retiraron del disolvente. El extracto se concentró a 20 μL bajo una corriente de nitrógeno y se almaceno a $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. Se hicieron tres repeticiones y cada repetición se hizo con el extracto orgánico obtenido de 11 glándulas.

3.5 Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-EM)

Para la separación y detección de los compuestos feromonales se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 6890 Series® acoplado a un espectrómetro de masas HP 5973 en modo de impacto electrónico (70eV). Inyector split-splitless y columna HP-5MS (30 m x 0.250 mm y 0.25 µm de grosor de fase estacionaria), con 5 % de fenil polisilfenileno-siloxano. Como gas acarreador se usó Helio con grado de pureza 99.9 %, a flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del horno comenzó en 40°C y se mantuvo durante 5 min, después la temperatura aumento 10°C min⁻¹ hasta 150°C y se mantuvo nuevamente por 5 min para luego aumentar 10°C min⁻¹ hasta alcanzar 230°C. La temperatura del inyector en modo splitless (0.75 min) fue de 220°C y para la interfase en modo SCAN de 280°C. Para el detector de masas, la temperatura de la fuente de iones fue de 230°C y la del cuadrupolo 150°C. El volumen de inyección fue de 1 µL y el tiempo de desorción de la fibra de MEFS fue de 2 min.

La identificación de los compuestos se realizó mediante búsqueda y comparación de los espectros de masas en la biblioteca NIST V. 2002. La confirmación de los compuestos se realizó con la comparación de los tiempos de retención y los espectros de masa de con los estándares: Z9-14:OH (P6031-96), Z9E12-14:OH (P6051-93), Z9-14:Ac (P6030-95) y Z9E12-14:Ac (P6050-93) obtenidos de Bedoukian Research Inc. Estados Unidos. Para aumentar la robustez del método y la validación de la identidad de los compuestos se hizo una inyección de n-alcanos para calcular los índices de Kovats modificados (*I_k*) para cada compuesto. Los índices de Kovats modificados (*I_k*), fueron calculados con la fórmula de Van de Dool y Kratz.

$$I_k = 100 \cdot C + 100 \frac{(t'_R)_x - (t'_R)_c}{(t'_R)_c + 1 - (t'_R)_c}$$

Donde C es el número de carbonos en el compuesto, $(t'_R)_x$ es el tiempo de retención corregido de los compuestos, el cual se calculó usando un compuesto de bajo tiempo de retención (tolueno), el tiempo de retención de este compuesto se restó al tiempo de retención de los n-alcanos y picos de muestra, $(t'_R)_{c+1}$ es el tiempo de retención corregido del alcano después del pico de interés, y $(t'_R)_c$ es el tiempo de retención corregido del alcano antes del mismo pico (Hübschmann, 2009).

Para determinar la concentración de los componentes feromonales se realizaron curvas de calibración de los estándares de 0.1 a 1 ng μL^{-1} . La concentración de los compuestos encontrados fue reportada en ng por hembra equivalente.

3.6 Análisis estadístico

Tomando los iones mayoritarios de los espectros de la muestra como de la biblioteca NIST, se hizo una prueba de ji-cuadrada de bondad de ajuste para los compuestos: Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac, Z9E12-14:Ac (alfa= 0.05) y z9-14:OH (alfa= 0.1). Así mismo, se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, con un nivel de significancia del 95% para determinar el orden de los compuestos dentro de la mezcla feromonal.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento del pie de cría

La obtención de insectos necesarios para llevar a cabo la extracción de los componentes feromonales mediante las diferentes técnicas, fue una de las principales limitantes en el desarrollo de esta investigación. De manera inicial, la alimentación de las larvas estaría basada en la dieta reportada por Vargas *et al.* (2001), sin embargo no hubo aceptación de ésta por las larvas, presentándose una alta mortalidad por inanición, por lo cual se optó por alimentarlas con tallos y hojas de cedro, sin embargo se tiene la desventaja que debido a que el cedro es un árbol caducifolio, la disponibilidad de las hojas está limitado a solo unos meses del año, además las pupas presentaban un tamaño menor que las encontradas en campo.

Vargas *et al.* (2001), recomiendan mantener un fotoperiodo cercano a 12:12 h (luz: oscuridad), cercano a la realidad en el campo en los trópicos, así como humedad elevada para el desarrollo de *H. grandella*, sin embargo a pesar de recrear un ambiente similar al campo (incluyendo presencia de plantas) el apareamiento y oviposición no se presentan de manera regular, tendiendo altas y bajas en la densidad poblacional, recurriendo constantemente a colectas en campo.

4.2 Corroboración de la especie

En América se encuentran presentes cuatro de las 11 especies de *Hypsipyla* reconocidas a nivel mundial (Heinrich, 1956; Bradley, 1968), y a pesar de que *H. grandella* se alimenta de especies de la subfamilia Swietenioideae, principalmente cedro y caoba, la corroboración de la especie es necesaria, y para esto la disección e identificación morfológica de órganos genitales masculinos es un método suficientemente confiable.

Las características morfológicas de adultos y de órganos genitales del macho (Fig.5), coinciden con la descripción realizada por Becker (1973), lo cual confirma la identidad de la especie como *Hypsipyla grandella*.



Figura 5. Órgano genital masculino de *H. grandella*, a: valva, b: gnathos, c: transtilla, d: anellus.

4.3.1 Microextracción en fase sólida

Los análisis no mostraron la presencia de algún compuesto feromonal, a diferencia de lo reportado por García-Godínez (2002) que a través de esta misma técnica y para esta misma especie, obtuvo el Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac. Por su parte, Kenari *et al.* (2011) encontraron que al colocar la fibra de MEFS en el espacio de cabeza de recipientes contenedores de hembras de *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), es detectado un compuesto. Lo anterior puede sugerir que a pesar de que la MEFS es una técnica muy sensible, usada en diversos tipos de estudios, las hembras de *H. grandella* usadas posiblemente produjeron una concentración muy baja de los compuestos, los cuales pudieron ser absorbidos por la fibra, pero no detectados por el equipo de CG. Lo anterior puede corroborarse debido que al recuperar los compuestos

adheridos a la superficie de viales mediante extracción en disolvente orgánico de los frascos donde estas palomillas se encontraban contenidas, se observó la presencia de los compuestos Z9-14:OH y Z9-14:Ac (Fig. 6).

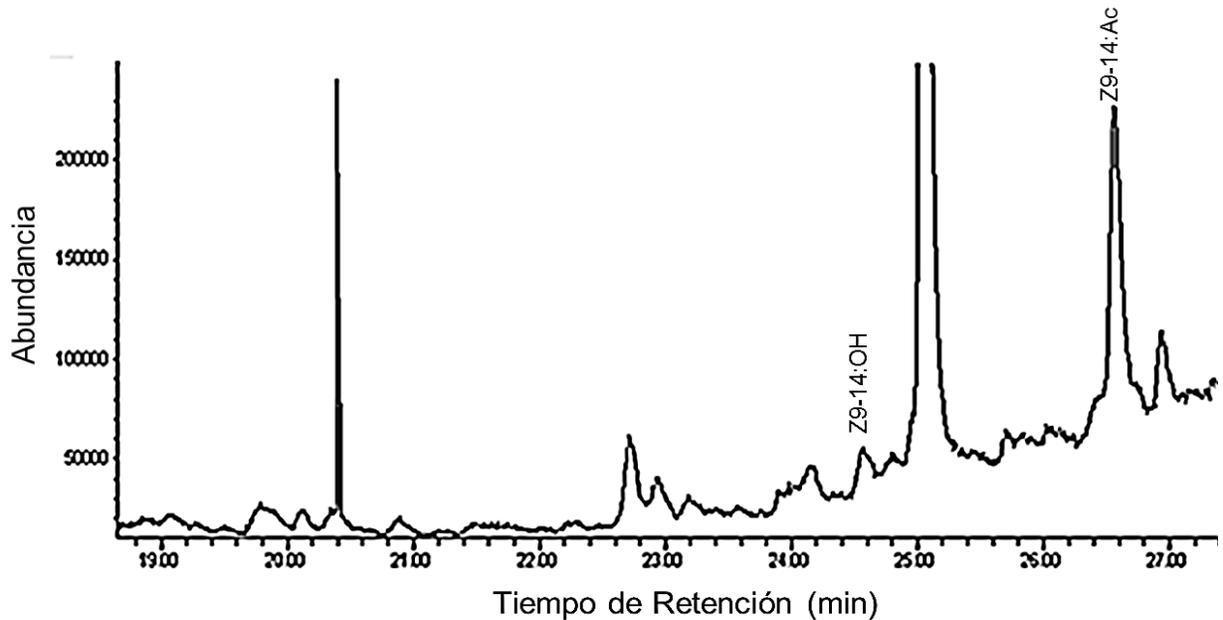


Figura 6. Cromatograma de compuestos obtenidos de la superficie interna de viales.

La presencia de estos dos compuestos puede ser explicada posiblemente por la morfología de la misma palomilla, puesto que al encontrarse la abertura genital muy cercana a la abertura anal, y considerando que la glándula sexual es expulsada por la abertura genital, esta puede rozar el espacio del abdomen que hay entre ambas aberturas y por tanto también la abertura anal puede quedar impregnada de los componentes feromonales provenientes de la misma glándula sexual. Como fue observado en estas pruebas, la palomilla arroja excretas antes, durante y después de su llamado sexual, posiblemente quedando cierta proporción de estos compuestos retenidos en las mismas como fue observado en el caso de *E. ceratoniae* que al poner en contacto la fibra con las papilas anales de esta misma se detectaron tres componentes feromonales (Kenari *et al.*, 2011),

además de que la superficie del vial actuó como una barrera física que aumento la retención de los compuestos, tal como lo menciona Frérot *et al.* (1997), disminuyendo aún más la disponibilidad de los compuestos feromonales en el espacio de cabeza y consecuentemente reduciendo la concentración de compuestos adsorbidos por la fibra de MEFS, haciéndolos no detectables por el equipo de GC-EM como se mencionó anteriormente, aun así los compuestos retenidos son fácilmente recuperados o extraídos con un solvente de la polaridad adecuada. El de diclorometano ayudó a mejorar la extracción, puesto que es un disolvente capaz de extraer compuestos que van de mediana polaridad a no polares, teniendo así una capacidad de extracción más eficiente que el hexano.

A través de la colocación de la fibra de MEFS en el espacio de cabeza del vial contenedor de extracto en diclorometano, se determinó la presencia de los compuestos Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac (Fig. 7), con tiempos de retención que coinciden con los de estándares comerciales . Chu *et al.* (2005) hicieron uso de una técnica de MEFS similar a la mencionada anteriormente (sin uso de solvente, pero con adición de temperatura). Ellos aislaron del espacio de cabeza de frascos contenedores de glándulas, los dos compuestos feromonales de *Eucosma notanthes* Meyrick (Lepidoptera: tortricidae).

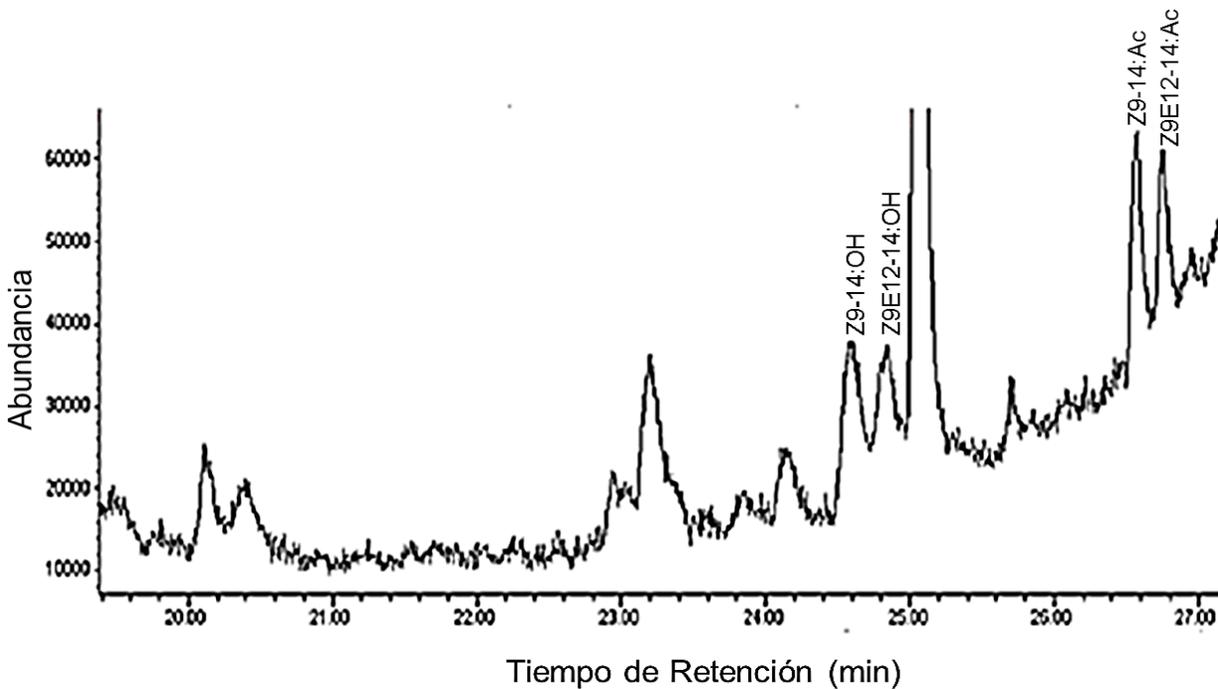


Figura 7. Cromatograma de compuestos procedentes del espacio de cabeza de 2 mL de diclorometano y cuatro glándulas.

El frotado directo de glándulas sobre la superficie de la fibra mostró la presencia del: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac (Fig. 8), que coinciden con los compuestos detectados en la técnica de absorción del espacio de cabeza de extractos de frascos y glándulas, mencionados anteriormente en este estudio. Avand- Faghieh y Frérot (2008) obtuvieron los compuestos feromonales de *Sesamia cretica* Lereher (Lepidoptera: Noctuidae) usando la misma técnica. Esta tendencia también fue observada por Kenari *et al.* (2011), quienes detectaron todos los componentes de la feromona de *E. ceratoniae*, al poner en contacto directo la fibra de MEFS con las papilas anales.

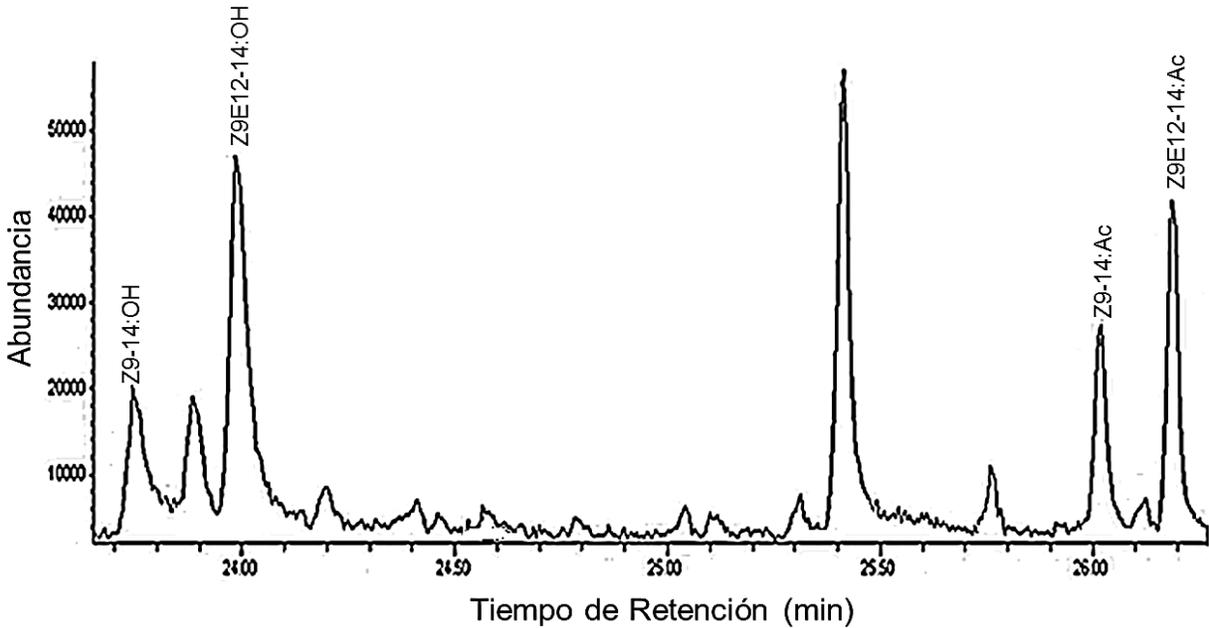


Figura 8. Cromatograma de compuestos obtenidos del frotado de glándulas sobre la fibra de MEFS.

4.3.2 Aireación dinámica

No fue posible capturar compuestos feromonales, a pesar de que se proporcionaron al insecto las condiciones adecuadas para realizar el llamado, lo cual también es reportado por García-Godínez (2002) para *H. grandella*, quien atribuye esto a que posiblemente los insectos no se encontraban en las mejores condiciones fisiológicas pues estaban confinados, además el desprendimiento de escamas provocado por el choque en contra de las paredes de contenedores al volar, pudo influir en la absorción de otros compuestos. Heath *et al.* (2006) también hicieron uso de la misma técnica como un intento más para el aislamiento de los compuestos feromonales de *Cactoblastis cactorum* (Berg) (Lepidoptera: pyralidae), donde a pesar de realizar cambios en las condiciones y tiempo de captura, así como el número de hembras por experimento, no encontraron diferencias al comparar con el testigo.

4.3.3 Extracción en disolvente orgánico

Se observó la presencia de los mismos cuatro compuestos obtenidos mediante el frotado directo de glándulas sobre la fibra de MEFS: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac, con tiempos de retención 23.74, 23.99, 26.01 y 26.19 min respectivamente (Fig.9), corroborándose con los estándares (Fig. 10). Frérot *et al.* (1997) para lepidópteros hicieron una comparación entre ambas técnicas y encontraron que la fibra absorbió una gran cantidad de los compuestos feromonales (120 ng/glándula de Z11-16:Ac), comparado con los extractos glandulares (60 ng/glándula de Z11-16:Ac). Los mismos autores mencionan que los extractos glandulares no son apropiados para medir la producción completa feromonal del contenido de la célula glandular y la superficie glandular. Una gran cantidad de la mezcla feromonal se pierde, posiblemente en la superficie del vial de vidrio. Por su parte, Chu *et al.* (2005) encontraron que la MEFS tiene una mayor eficiencia de extracción que los extractos en solvente y se utiliza una menor cantidad de tiempo para la obtención de los compuestos. Esta conclusión la obtienen al realizar una comparación entre los resultados obtenidos al colocar la fibra de MEFS en un vial con cinco glándulas a temperatura de 170°C por 10 min, y los reportados por Hung *et al.* (2001) quienes obtienen los mismos componentes pero utilizaron 52,820 glándulas de *E. notanthes*.

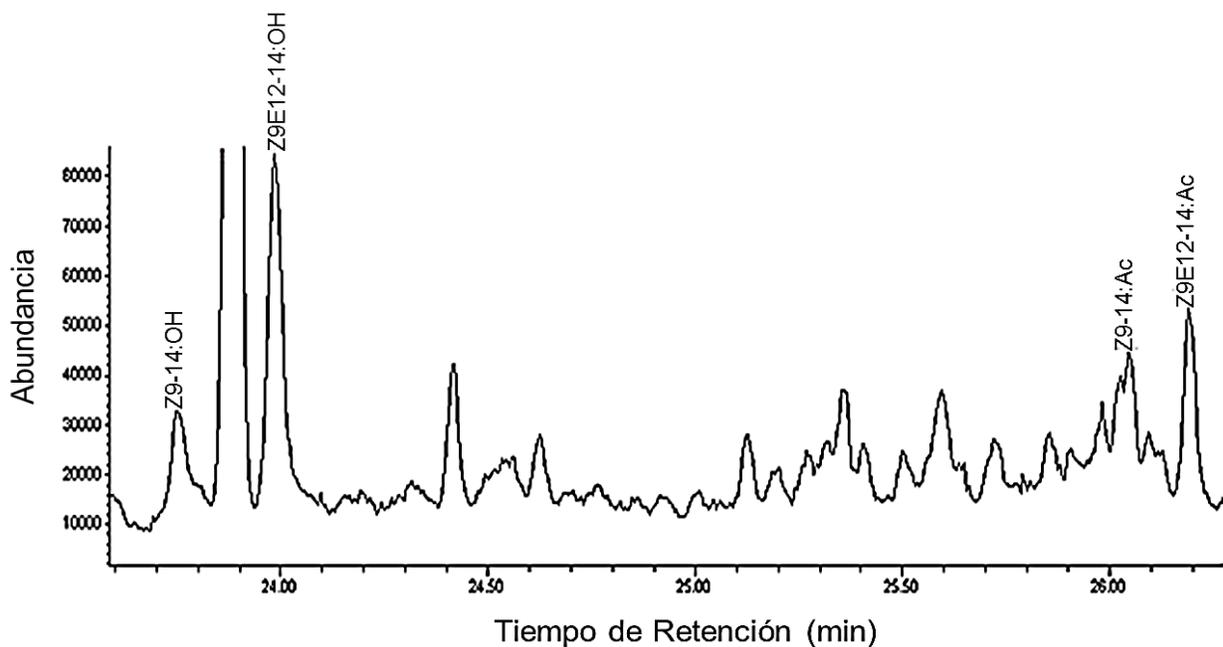


Figura 9. Cromatograma de compuestos obtenidos por extracción de glándulas sexuales en hexano.

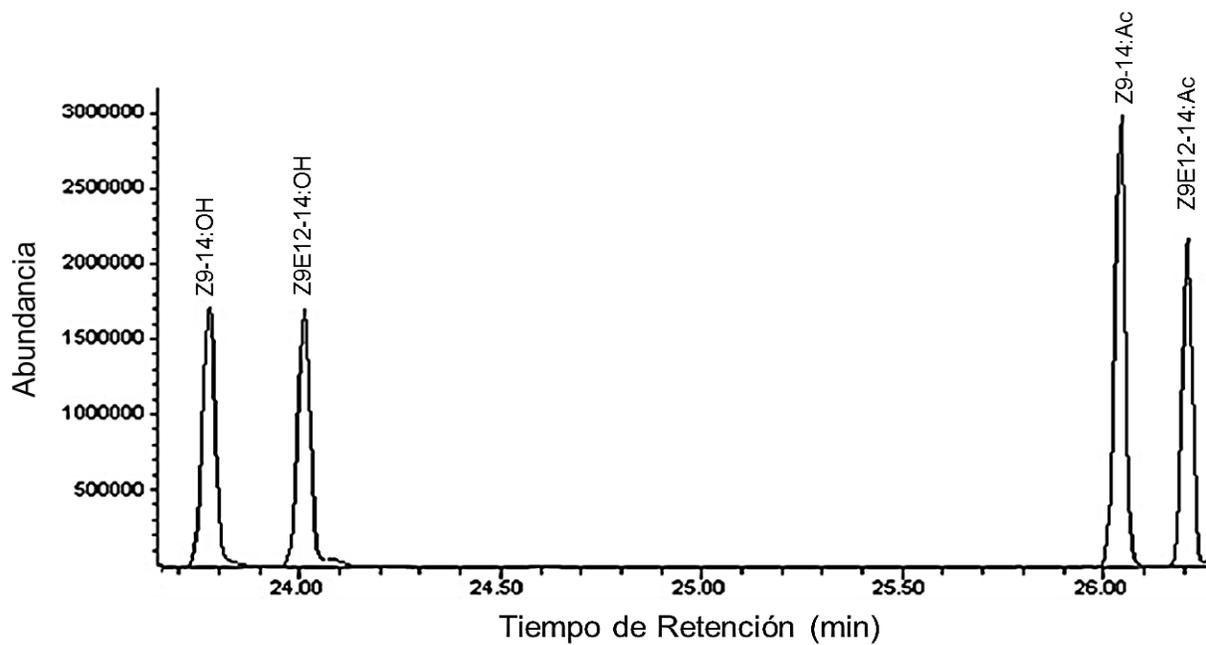


Figura 10. Cromatograma de compuestos estándares: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac.

Se hizo una comparación de los espectros de iones de los compuestos de la muestra con los de la biblioteca NIST V. 2002 (Fig. 11), donde se puede observar la similitud que existe entre los iones mayoritarios, lo cual fue comprobado por la prueba de ji- cuadrada de bondad de ajuste. Para el Z914:OH se presentan como iones mayoritarios el: 41, 55, 67 y 82, para el Z9E12-14:OH: 41 55, 68 y 81, el Z9-14:Ac presenta el: 43, 55, 82 y 96, y el Z9E12-14:Ac :41, 43, 55, 67 y 81.

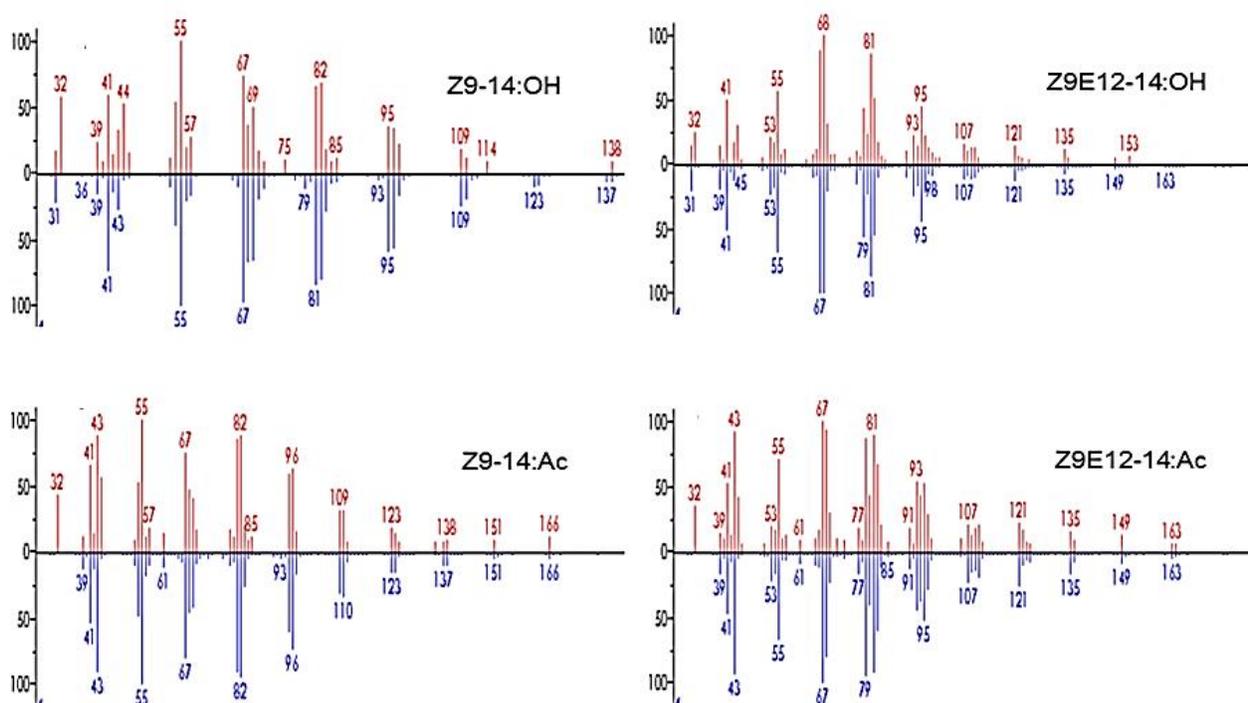


Figura 11. Comparación de Espectros de Iones de Muestra (Rojo) y Biblioteca NIST (Azul).

En este estudio se determinó que son cuatro los componentes de la feromona sexual de *H. grandella* en México, los cuales coinciden con lo encontrado por Hilje *et al.* (2002) quienes obtuvieron de extractos abdominales de hembras vírgenes como compuestos feromonales al Z9E12-14:OH, Z9-14:OH, Z9E12-14:Ac y Z9-14:Ac. Por su parte Effraim (1997) al realizar extractos hexánicos de glándulas sexuales de insectos provenientes de Costa Rica, obtuvo sólo

tres compuestos: Z9-14:OH, Z9E12-14:OH y Z9E12-14:Ac, que también coinciden con los compuestos encontrados en este estudio, difiriendo únicamente en la presencia del Z9-14:Ac, el cual si fue detectado en nuestro estudio. Esto pudo deberse al manejo que se le dio al extracto orgánico que utilizaron en su estudio, puesto que Frérot *et al.* (1997) mencionan que una gran cantidad de la mezcla feromonal se pierde posiblemente en la superficie de vidrio del vial. Lo anterior es comprobado con los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que al analizar el extracto de lavado de frascos se observó que es el Z9-14:Ac el compuesto que se encuentra en mayor proporción de los dos encontrados (cuadro 1). Lo anterior sugiere que este compuesto puede ser retenido físicamente por la superficie interna del vial y que al tomar un microlitro de este extracto no sea suficiente para recuperarlo, y no sea detectado en los análisis cromatográficos. Finalmente también coincide con lo reportado por Macías-Sámano *et al.* (2006), quienes identificaron cuatro compuestos de 14 carbonos (dos alcoholes y dos acetatos) sin mencionar la estructura química.

Por otro lado difiere en gran proporción con lo encontrado por Borek *et al.* (1991) que con insectos procedentes de Cuba identificaron como compuestos volátiles de la glándula sexual al acetato de hexadecanilo (16Ac), acetato de Z3-hexadecenilo (Z3-16:Ac) y un compuesto de 18 carbonos no definido, y sólo coincide con el Z9E12-14:OH.

En cuanto a otra especie de la misma familia, *H. robusta*, Bosson y Gallois (1982) identificaron tres compuestos feromonales de los cuales dos de ellos (Z9-14:Ac y el Z9E12-14:Ac) se encontraron en este trabajo.

4.4 Comparación de las diferentes técnicas de extracción

A excepción de la exposición de la fibra de MEFS y aireación dinámica, todas las técnicas empleadas en este estudio lograron extraer compuestos feromonales de *H. grandella*, sin embargo difirieron en el número de compuestos obtenidos, ya que de la superficie interna de viales únicamente se recuperaron dos, a diferencia de la fibra expuesta en el espacio de cabeza de glándulas en diclorometano, frotado sobre superficie de fibra y extractos hexánicos, que aislaron los cuatro de interés (Cuadro 1). Las diferencias en el número de compuestos anteriormente mencionadas así como las proporciones de cada uno de ellos, pueden ser debidas por un lado a los principios físico-químicos que rigen a cada técnica de aislamiento, tales como la capacidad de extracción de cada una, la cual depende tanto de la polaridad de los compuestos, como del contacto del agente extractante con los compuestos y con las superficies que los retienen, por ejemplo la extracción disolvente orgánico además de extraer compuestos que se encuentran en tejidos glandulares, es capaz de extraer compuestos que son retenidos en excretas y paredes del vial debido a la polaridad del disolvente utilizado, a diferencia de la fibra de MEFS que solo es capaz de adsorber los compuestos que lleguen o sean llevados a ella, como en el caso del frotado directo de glándulas. Por otro lado, las características fisiológicas del insecto, así como el estrés generado por la manipulación y confinamiento, son factores pueden influir en la baja proporción o no producción de compuestos feromonales.

Cuadro 2. Comparación entre las diferentes técnicas de extracción empleadas para el aislamiento de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella*.

Compuesto	TR (min)	IK	Técnica de extracción (ng/hembra equivalente)					
			MEFS				ADI	EDO
			INS	SCV	ECF	FGH		
Z9-14:OH	23.74	1464	--	5.028	0.085	0.103	--	0.622
Z9E12-14:OH	23.99	1476	--	--	0.084	0.279	--	1.869
Z9-14:AC	26.01	1492	--	14.148	0.038	0.033	--	0.313
Z9E12-14:AC	26.19	1404	--	--	0.034	0.061	--	0.417

TR= Tiempo de retención, IK= Índices de Kovats, MEFS= Microextracción en fase sólida, INS= Exposición de fibra a palomilla, SCV= Recuperación de compuestos adheridos a la superficie de viales, ECF= Espacio de cabeza de frasco con extracto de lavado y cuatro glándulas, FGH= Frotado de glándulas sobre superficie de fibra de MEFS, ADI= Aireación dinámica y EDO= Extracción en disolvente orgánico.

Con base en las técnicas donde se obtuvieron los cuatro compuestos de interés y la mayor cantidad (frotado de glándulas y extracción en disolvente orgánico) y de acuerdo con la prueba estadística realizada con significancia del 95%, el orden de importancia de los compuestos en la mezcla feromonal es el siguiente: Z9E12-14:OH > Z9-14:OH > Z9E12-14:Ac > Z9-14:Ac, en proporción: 5.8 : 1.9 : 1.3 : 1.0, respectivamente. Esto difiere de la técnica de exposición de la fibra en espacio de cabeza de frasco con glándulas, que nos da una proporción diferente, lo cual puede dar como resultado la obtención de diferentes mezclas feromonales, y el punto vital es como saber ¿cuál es la mezcla con la proporciones correctas?, ya que como se ha observado en otros estudios que prueban las posibles mezclas feromonales en campo no han tenido los resultados esperados (Efrain, 1997, Hilje *et al.*, 2002, Macías-Sámamo, 2006), en cuanto a atracción y captura de esta palomilla, esto posiblemente debido a lo explicado anteriormente, por

lo cual es recomendable probar diferentes métodos de aislamiento y probar cada una de las mezclas resultantes en campo para observar cual es la mezcla adecuada.

Las técnicas probadas en este estudio, presentan ventajas y desventajas unas con respecto a las otras, por ejemplo la exposición de la fibra de MEFS a palomillas, Aireación dinámica y la recuperación de compuestos adheridos a la superficie de viales, son técnicas no destructivas, en las que el material biológico puede ser reutilizado, ya sea para el incremento del pie de cría o probar otras técnicas, sin embargo, en este estudio tuvieron la desventaja de que no se obtuvieron compuestos o solo algunos de ellos, que pudieran ser explicadas por las características de cada técnica o por las de la palomilla anteriormente mencionadas. Por el contrario, la obtención de compuestos del espacio de cabeza, el frotado de glándulas sobre la fibra de MEFS y extractos hexánicos, son técnicas destructivas debido a la extirpación de glándulas y al desgaste de la fase de absorción de la fibra, ocasionado por el frotado de glándulas o por los vapores de solvente en el caso del diclorometano, que disminuyen la vida útil de esta, además en el frotado de glándulas, las impurezas, principalmente escamas y restos de cutícula, interfieren negativamente en el análisis y la capacidad de absorción de la fibra, aunque la obtención de los cuatro compuestos feromonales de *H. grandella* fue posible mediante las tres técnicas.

El frotado de glándulas sobre la superficie de la fibra presenta ventajas principalmente debido a la baja cantidad de glándulas utilizadas y la inmediata obtención de compuestos de interés, debido a que estos van directo a la fase de absorción de la fibra. Sin embargo de acuerdo con los resultados obtenidos, con la extracción en disolvente orgánico, además de obtener los cuatro compuestos de interés, se obtuvo también mayor cantidad de compuesto/ hembra equivalente.

En este estudio se determinó una posible mezcla feromonal de *H. grandella*, sin embargo requiere continuarse con pruebas de electroantenografía, bioensayos de laboratorio y pruebas de atracción en campo para tener una herramienta más robusta para el manejo del barrenador de las meliáceas.

V. CONCLUSIONES

Los componentes de la feromona de *H. grandella* son el Z9-14:OH, Z9E12-14:OH, Z9-14:Ac y Z9E12-14:Ac. El orden de importancia de los compuestos dentro de la mezcla feromonal es: Z9E12-14:OH > Z9-14:OH > Z9E12-14:Ac > Z9-14:Ac, en proporciones 5.8: 1.9: 1.3 : 1.0 respectivamente.

El frotado directo de glándulas sobre la superficie e la fibra de MEFS y la extracción en disolvente orgánico presentan ventajas sobre las demás técnicas.

VI. LITERATURA CITADA

- Agostinho, S. M., F. Das M., F. Da Silva G., B. Fernandes J., C. Vieira P., L. Pinheiro A. y F. Vilela E. 1994. Limonoids from *Toona Ciliata* and speculations on their chemosystematic and ecological significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 323-328.
- Avand-Faghih, A. y B. Frérot. 2007. Identification of the sex pheromone of *Sesamia cretica* Lederer . *J. Chem. Ecol.* 34: 103-106.
- Becker, V. O. 1973. Microlepidópteros asociados con *Carapa*, *Cedrela* y *Swietenia* en Costa Rica. Tesis Magister agriculturae. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba (Costa Rica). 108 p.
- Blanco, M. H. 2004. Las Feromonas y sus usos en el manejo integrado de plagas. *Manejo integrado de plagas y agroecología* 71: 112-118.
- Borek, V., B. Kalinova, I. Valterova, R. Hochmut, y J. Vrkoc, 1991. Sex-pheromone gland volatiles from *Hypsipyla grandella* females (Lepidoptera, pyralidae, phycitinae). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 88: 181-186.
- Bosson, A. G. y Gallois, M. 1982. Analyse de la secretion pheromonale emise par les femelles vierges de la mineuse des pousses de L'acajou: *Hypsipyla robusta* (Moore)(Lepidoptera, pyralidae, phycitinae). *C.R. Acad. Sci. Ser. 3.* 294: 819-822.
- Bradley, J. D. 1968. Descriptions of two new genera and species of Phycitinae associated with *Hypsipyla robusta* (Moore) on meliaceae in Nigeria (Lepidoptera, Pyralidae). *Bull. Entomol. Res.* 57 : 605-613.
- Briceño, V. A. 1997. Aproximación hacia un manejo integrado del barrenador de las meliaceas, *Hypsipyla grandella* (Zeller). *Rev. For. Venez.* 41: 23-28.

- Chu, Tzu-Yun, Chau-Chin Hung, Chung-yuan Hsu. 2005. Solid-phase microextraction for the investigation of sex pheromone of *Eucosma notanthes* Meyrick. *Talanta*: 743-749.
- Cibrián, T. D., J. Méndez M., R. Campos B., H. Yates I. y J. Flores L. 1995. Insectos forestales de México/Forest Insects of México. Universidad Autónoma Chapingo. SARH Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre México. USDA Forest Service, Natural Resources Canada. Comisión Forestal de América del Norte, FAO. Pub. N. 6. 453 p.
- Cruz, F. M. 2003. La caoba, una alternativa para áreas deforestadas de la Huasteca Potosina. Folleto para productores N° 4. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental Huichihuayan. 24 p.
- Das , M. F., F. Silva G., R. Gottlieb O. y L. Dreyer D. 1984. Evolution of limuloids in the Meliaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 12: 299-310.
- Effraim, N. 1997. Biology, economic impact and potential for semiochemical-based control of mahogany shootborer, *Hypsiphyla robusta* (Moore) (Lepidoptera: pyralidae), african rhinoceros beetle, *Oryctes monoceros* (Oliver) (Coleoptera: scarabaeidae) and maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae). Master of pest Management Thesis. Submitted to the Department of Biological Sciences, Simon Fraser University. 111 p.
- Entwistle, P. F. 1967. The current situation on shoot, fruit and collar borers of the Meliaceae. Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford. 15 p.
- Frérot , B., C. Malosse y A. Cain. 1997. Solid-phase microextraction (SPME): a new tool in pheromone identification in lepidoptera. *J. High Res. Chromatog.* 20: 340-342.

- Gara, R. I., G. Allan G., M. Wilkins R. y L. Whitmore J. 1973. Flight and host selection behaviour of the mahogany shoot borer, *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lep: Phycitidae). *Z. Angew. Entomol.* 72: 259-266.
- García-Godínez M. L. 2002. Estudio morfológico y químico de la glándula productora de feromona sexual de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Tesis de licenciaturagrad. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Químicas. 65 p.
- Griffiths, M. W. 1996. The biology and ecology of *Hypsipyla* shoot borers. In: R.B. Floyd y C. Hauxwell (Eds.). *Hypsipyla* shoot borers in Meliaceae. Australian Centre For International Agricultural Research Canberra. Aciar. Pp:74-80.
- Grijpma, P. y R. Gara, 1970. Studies on the shoot borer *Hypsipyla grandella* (Zeller).I. Host selection behaviour. *Turrialba*, 20: 233-240.
- Grijpma, P. y R. Ramalho. 1969. *Toona* spp., posibles alternativas para el problema del barrenador *Hypsipyla grandella* de las meliaceas en America latina. *Turrialba* 19: 531-547.
- Heath, R. R., E. Teal P., D. Epsky N., D. Dueben B., D. Hight S., S. Bloem, E. Carpenter J., J. Weissling T., E. Kendra P. y J. Cibrian-Tovar. 2006. Pheromone-based attractant for males of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: pyralidae). *Environ. Entomol.* 35: 1469-1476.
- Heinrich, C. 1956. American moths of the subfamily phycitinae. Washington, Smithsonian Institution (Ed.) Bulletin (United States National Museum). 207 p.
- Hidalgo, S. O. y F. Berrios. 1972. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lep. Phycitidae). XI growth of larvae reared on synthetic diet. *Turrialba* 22: 431-434.

- Hilje , L. y J. Cornelius. 2001. ¿ Es Inmanejable *Hypsipyla Grandella* Como Plaga Forestal? Manejo Integrado De Plagas 61: 1-4.
- Hilje, L., C. Oehlschlager, y J. Macías, 2002. Desarrollo comercial de la feromona sexual de *Hypsipyla grandella*: Informe Final. CATIE.
- Holsten, E. 1976. Life cycle of *Hypsipyla grandella* (Zeller). In: Whitmore, J. L. (Ed.) Studies of the shootborer, *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep. Pyralidae. Misc. Publ. No. 1. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Holsten, E. y R. Gara. 1974. Attraction and ovipositional response of *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera:Phyticidae) in Costa Rica. Z. Angew. Entomol. 75: 645-653.
- Howard, F. W. y A. Merida, M. 2007. El taladrador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* (Zeller)(Insecta: Lepidoptera: pyralidae: phycitinae). The Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 8 p.
- Hübschmann, Hans-Joachim. 2009. Handbook of GC/MS, Fundamentals and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co (Ed.) .Second edition. Ed. KGaA, Weinheim.
- Hung, C., J. Hwang, M. Hung, Y. Yen, C.C. Hou R. 2001. Isolation, identification and field tests of the Sex pheromone of the carambola fruit borer, *Eucosma notanthes*. J. Chem. Ecol. 27 (9): 1855- 1866.
- Kenari, S. F., A. Faghieh A., S. Imani y M. Tabrizian. 2011. Comparison of two different extraction techniques by SPME, in study of female specific volatile components of the iranian populations of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera.: Pyralidae). Ann. Biol. Res. 2: 258-262.

- Macías-Sámano, J., M. Arguedas, J. Zanuncio, y L. Hilje. 2006. Plagas Forestales Neotropicales: La feromona de *Hypsipyla*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 19: 102-103.
- Macías-Sámano, J. E. 2001. Interacciones químicas entre *Hypsipyla grandella* y sus plantas hospedantes. Manejo Integrado de Plagas 60 : 15-21.
- Navarro, C. 1999. Diagnóstico de la caoba (*Swietenia macrophylla* King) en Mesoamérica. Cct-PROARCA/CAPAS. 25 p.
- Newton, A. C., P. Baker, S. Ramnarine, F. Mesen J. y R. B. Leakey R. 1993. The mahogany shoot borer: prospects for control. Forest. Ecol. Manag. 57: 301-328.
- Ramírez-Sánchez, J. 1964. Investigación preliminar sobre biología, ecología y control de *Hypsipyla grandella* (Zeller). Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación 16: 54-77.
- Robbins, C. S. 2000. Mahogany matters: The Us Market for big-leafed mahogany and its implications for the conservation of the species, Washington, D.C., Usa, Traffic North America. 58 p.
- Roovers, M. 1971. Observaciones sobre el ciclo de vida de *Hypsipyla grandella* Zeller en Barinitas, Venezuela. Boletín del Instituto Forestal Latinoamericano de Investigación y Capacitación 38: 1-46.
- Rzedowski, J. y G. Calderón. 1993. Meliaceae. In: Rzedowski, J. y G. Calderón (Eds.) Flora del Bajío y de regiones adyacentes 11: 1- 22.
- Sliwa, D. y O. Becker V. 1976. Observations on emergence and mating of adult in captivity. In: Whitmore, J. L. (Ed.) Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep., Pyralidae. . Misc. Publ. No. 1. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

- Taveras, R. 1999. Aspectos bioecológicos y caracterización del daño de *Hypsipyla grandella* (Zeller) en caoba. Tesis Magister Scientiae. Programa de educación para el desarrollo y la conservación CATIE. Turrialba, Costa Rica. 102 p.
- Vargas, C., P. Shannon, R. Taveras, F. Soto y L. Hilje. 2001. Un nuevo método para la cría masiva de *Hypsipyla grandella*. Manejo Integrado de Plagas 62: 1-4.
- Wightman, K., B. Rodríguez, S. Ward y J. Cornelius. 2005. Domesticación de cedro y caoba en la península de Yucatán, México. Experiencias en el mejoramiento del germoplasma forestal. Recursos naturales y ambiente 44: 119-128.
- Wilkins, R. M., G. Allan G. y R. Gara. 1976. Protection of spanish cedar with controlled release insecticides. In: Whitmore, J., L. (Ed.) Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella*. Lep., Pyralidae. . Misc. Publ. No. 1. CATIE, Turrialba, Costa Rica.