



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**ATRACCIÓN DE ADULTOS DEL
PICUDO DEL CHILE (*Anthonomus
eugenii* Cano) CON MEZCLAS DE
COMPUESTOS VOLÁTILES
SINTÉTICOS**

ADRIANA BAUTISTA SAN JUAN

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

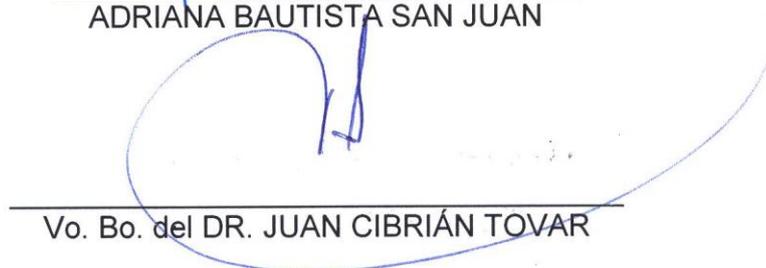
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE
LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **ADRIANA BAUTISTA SAN JUAN**, Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **ATRACCIÓN DE ADULTOS DEL PICUDO DEL CHILE (*Anthonomus eugenii* CANO) CON MEZCLAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES SINTÉTICOS** Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, enero de 2019.



ADRIANA BAUTISTA SAN JUAN



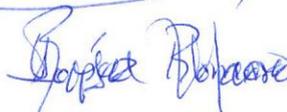
Vo. Bo. del DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

La presente tesis titulada: **Atracción de adultos del picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) con mezclas de compuestos volátiles sintéticos**_realizada por la alumna: **Adriana Bautista San Juan** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A) 
DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

ASESOR (A) 
DRA. ROSA MARÍA LÓPEZ ROMERO

ASESOR (A) 
DR. NÉSTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

ASESOR (A) 
DRA. NADIA SALOMÉ GÓMEZ DOMÍNGUEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2019.

ATRACCIÓN DE ADULTOS DEL PICUDO DEL CHILE (*Anthonomus eugenii* CANO) CON MEZCLAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES SINTÉTICOS

Adriana Bautista San Juan, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019.

RESUMEN

Durante la etapa productiva del cultivo de *Capsicum* spp., se emiten compuestos orgánicos volátiles (COVs) atractivos para el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Este insecto se alimenta principalmente de los botones florales y frutos, en consecuencia ocasiona pérdidas parciales o totales en el cultivo. El objetivo de esta investigación fue determinar una mezcla sintética con capacidad de atracción para adultos de *A. eugenii* basada en análisis preliminares de los COVs de botones florales (BF), flores (FL) y frutos (FR) de *C. annuum* var. Poblano. Para ello, órganos frescos, extractos por aireación dinámica y mezclas sintéticas fueron evaluados mediante bioensayos de olfatometría en un dispositivo tipo “Y”. Los adultos de *A. eugenii* utilizados en los bioensayos fueron de 10 a 20 días de edad. La evaluación de los tratamientos de BF, FL y FR de órganos frescos y sus extractos por AD indicaron que las hembras y machos responden positivamente a ellos. De las mezclas sintéticas el tratamiento 10 (mezcla 3) fue el único al que respondieron ambos sexos con el 68.75% en machos y 63.75% en hembras. Esta mezcla estuvo compuesta de (Z)- β -ocimeno (92.6%), (Z)-3-hexenil acetato (2.6%), 2-isobutil-3-metoxipirazina (3.2%) y terpinoleno (1.6%). Estos compuestos serán una buena base para desarrollar un atrayente sintético en combinación con la feromona de agregación del picudo para la captura de adultos de *A. eugenii*.

Palabras clave: Picudo del chile, *Capsicum* spp., semioquímicos, kairomonas.

ATTRACTION OF ADULTS OF THE PEPPER WEEVIL (*Anthonomus eugenii* CANO) WITH MIXTURES OF SYNTHETIC VOLATILE COMPOUNDS

Adriana Bautista San Juan, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019.

ABSTRACT

During the productive stage of *Capsicum annuum* var. Poblano crops, volatile organic compounds (VOCs) are emitted; these are attractive for the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano). This insect feeds mainly on flower buds and fruits, consequently causing partial or total losses of the crop. The objective of this study was to determine a synthetic mixture with attraction capacity for adults of *A. eugenii* based on preliminary analysis of the VOCs of flower buds (FB), flowers (FL) and fruits (FR) of *C. annuum* var. Poblano. Subsequently, the fresh organs, extracts by dynamic aeration, and synthetic mixtures were evaluated by olfactometry by a type "Y" device in bioassays. The adults of *A. eugenii* used in the bioassays were 10 to 20 days old. The evaluation of BF, FL, and FR treatments of fresh organs and their extracts by AD indicated that females and males respond positively to them. Of the synthetic mixtures, treatment 10 (mixture 3) was the only one to which both sexes responded, with 68.75% in males and 63.75% in females. This mixture was composed of (Z) - β -ocimene (92.6%), (Z) -3-hexenyl acetate (2.6%), 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (3.2%), and terpinolene (1.6%). These compounds will be a good basis for developing a synthetic attractant for the capture of adults of *A. eugenii*.

Key words: pepper weevil, *Capsicum* spp., Semiochemicals, kairomones.

AGRADECIMIENTOS

La autora de este estudio agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para realizar sus estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por abrirme sus puertas para hacer mis estudios de maestría.

Al Dr. Juan Cibrián Tovar por todas sus enseñanzas, por su disponibilidad de tiempo y por su apoyo como director y consejero.

A la Dra. Rosa Ma. López Romero por su tiempo, paciencia y observaciones para obtener resultados del primer capítulo.

Al resto del consejo particular: Dr. Néstor Bautista Martínez y Dra. Nadia S. Gómez Domínguez, por todas sus observaciones y sugerencias en la investigación y para la mejora de este documento.

A la Junta Local de Sanidad Vegetal del Altiplano Centro de San Luis Potosí (JLSVAC-SLP) y a los productores de Villa de Arista por su apoyo en la obtención de material biológico.

A los amigos y compañeros de laboratorio de ecología química de insectos por su apoyo recibido.

A todos los compañeros, amigos y personas que me apoyaron directa e indirectamente en esta etapa.

DEDICATORIA

A Dios Padre y sus ángeles por darme salud y vida para continuar en este camino.

A mis padres: Yolanda San Juan y Eulogio Bautista por su gran apoyo emocional y económico. Por ser unos papás increíbles que me motivan y enseñan día a día a no rendirme a pesar de las tormentas.

A mis hermanas y hermanos: Rubén, Enrique, Elisa, Federico y Erika por su gran apoyo en todo momento.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Hipótesis	3
Objetivos	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
LITERATURA CITADA	7
CAPÍTULO I. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN ÓRGANOS DE <i>Capsicum annuum</i> VAR. POBLANO	12
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1.1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
1.2.1. Establecimiento del cultivo.....	16
1.2.2. Extracción de COVs en órganos de <i>C. annuum</i> var. Poblano	16
1.2.2.1. Microextracción en fase sólida	16
1.2.2.2. Aireación dinámica.....	17
1.2.4. Condiciones de análisis.....	18
1.2.5. Estándares	19
1.2.6. Curva de calibración	19
1.2.7. Análisis estadístico	19
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
1.3.1. Extracción de COVs en órganos de <i>C. annuum</i> var. Poblano por MEFS y AD	20
1.3.2. Cuantificación de COVs de los órganos de <i>C. annuum</i> var. Poblano.....	24
1.4. CONCLUSIONES.....	32
1.5. LITERATURA CONSULTADA	33
CAPÍTULO II. ATRACCIÓN DE ADULTOS DE <i>Anthonomus eugenii</i> CON MEZCLAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES SINTÉTICOS	39
RESUMEN	39
ABSTRACT	40
2.1. INTRODUCCIÓN.....	41

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.2.1. Colecta y cría de <i>Anthonomus eugenii</i>	43
2.2.2. Sexado de <i>Anthonomus eugenii</i>	43
2.2.3. Pruebas de atracción en adultos de <i>A. eugenii</i>	44
2.2.3. Análisis estadístico	45
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
2.3.1. Respuesta comportamental de machos de <i>A. eugenii</i>	46
2.3.2. Respuesta comportamental de hembras de <i>A. eugenii</i>	48
2.4. CONCLUSIONES.....	51
2.5. LITERATURA CONSULTADA.....	52
CONCLUSIONES GENERALES.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) rostrum y antena de <i>A. eugenii</i> , B) vista dorsal de la antena de una hembra (♀) y un macho (♂) de <i>A. eugenii</i> .	5
Figura 2. Extracción de COVs de los órganos de chile por microextracción en fase sólida.	17
Figura 3. Extracción de COVs de los órganos de chile por aireación dinámica.	18
Figura 4. Cromatogramas de muestras por A) MEFS y B) AD de botón floral de <i>C. annuum</i> var. Poblano. Condiciones de análisis en 1.2.4.	20
Figura 5. Cromatogramas de muestras por A) MEFS y B) AD de flores de <i>C. annuum</i> var. Poblano. Condiciones de análisis en 1.2.4.	21
Figura 6. Cromatogramas de muestras por A) MEFS y B) AD de frutos de <i>C. annuum</i> var. Poblano. Condiciones de análisis en 1.2.4.	22
Figura 7. Cromatogramas de estándares: A) (Z)-3-hexenil acetato: 4.82 µg/g, B) (E)-β-ocimeno (1), (Z)-β-ocimeno: 49.57 µg/g (2), C) terpinoleno: 0.94 µg/g y D) 2-isobutil-3-metoxipirazina: 1.8 µg/g.	24
Figura 8. Espectro de masas de (Z)-3-hexenil acetato en A) muestra y B) estándar.	25
Figura 9. Espectro de masas de (E)-β-ocimeno en A) muestra y B) estándar.	25
Figura 10. Espectro de masas de (Z)-β-ocimeno en A) muestra y B) estándar.	26
Figura 11. Espectro de masas de terpinoleno en A) muestra y B) estándar.	26
Figura 12. Espectro de masas de 2-isobutil-3-metoxipirazina en A) muestra y B) estándar.	27
Figura 13. Curvas de calibración de los estándares. Condiciones de análisis en 1.2.4.	27
Figura 14. Comparación de la concentración de (Z)-β-ocimeno de los órganos de <i>C. annuum</i> var. Poblano. Barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas (F=15.52, P=0.0012), (n=4).	28
Figura 15. Comparación de la concentración de (Z)-3-hexenil acetato en órganos de <i>C. annuum</i> var. Poblano. Barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas (F=15.52, P=0.0012), (n=4).	29
Figura 16. Mucrón metatibial de hembras (♀, izquierda) y machos (♂, derecha) de <i>A. eugenii</i> .	43
Figura 17. Respuesta de atracción de machos de <i>A. eugenii</i> a los tratamientos.	47
Figura 18. Respuesta de atracción de hembras de <i>A. eugenii</i> a los tratamientos.	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. COVs reportados en diferentes variedades de <i>C. annuum</i>	15
Cuadro 2. Comparación de abundancias de los COVs identificados en los órganos de <i>C. annuum</i> var. Poblano.	23
Cuadro 3. Distribución de tratamientos para evaluar la atracción de <i>A. eugenii</i>	44

INTRODUCCIÓN GENERAL

El chile (*Capsicum* spp.) es una de las siete hortalizas cultivadas y demandadas por la población mexicana y el mundo (Caro-Encalada *et al.*, 2014; Latournerie-Moreno *et al.*, 2015). Su importancia radica en la diversidad de especies cultivadas, las cuales son: el *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* Ruiz y Pav., *Capsicum frutescens* L. y *Capsicum baccatum* L. (SIAP, 2018). Debido a su amplia superficie sembrada en el año 2017 generó divisas de \$29,125,313,015.00 MDP, posicionando a México como el segundo país en la producción de chiles a nivel mundial (SIAP, 2018). Sin embargo, también es afectado por plagas de importancia económica como el picudo del chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) (García-Nevárez *et al.*, 2012).

El picudo del chile se distribuye desde el sur de los E.U.A. hasta Centroamérica (EPPO, 2018), para su control se aplican agroquímicos pero el uso excesivo de insecticidas como malatión y clorpirifos etílico, entre otros, generan resistencia a los mismos (Avendaño-Meza *et al.*, 2015). Otro método de control amigable con el ambiente es el biológico, mediante el uso de parasitoides como: *Catolaccus hunteri* (Crawford), *Triaspis eugenii* (Wharto), entre otros (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2012).

Por otra parte, los semioquímicos son compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por organismos vivos que actúan como señales químicas para la comunicación de los mismos, y representan funciones específicas para el receptor (Raffa *et al.*, 2007; Leonhardt *et al.*, 2016). Por ejemplo, las kairomonas junto con las feromonas de la palomilla *Cydia pomonella*, una plaga importante de la manzana, se utilizan para el manejo de esta especie (Cattaneo *et al.*, 2017). El uso de la feromona y los volátiles como el tejido de la penca del agave para el monitoreo y control del picudo *Scyphophorus acupunctatus* (Gyllenhal) (Ruiz-Montiel *et al.*,

2017), entre otros. Son algunos casos de éxito para el control de varias plagas (Gregg *et al.*, 2018). Bartelt (1999), indica que en curculiónidos su atracción es debido a la feromona de agregación aunada a los volátiles que desprenden sus hospederas.

En el caso del picudo del chile, los adultos, tanto hembras como machos localizan a su hospedera mediante los olores que liberan los botones florales (BF), las flores (FL) y los frutos en desarrollo (FR) (Patrock *et al.*, 1992; Adesso y McAuslane, 2009). La feromona de agregación de este insecto fue dilucidada desde 1994 (Eller *et al.*, 1994). Actualmente se utiliza en los campos de producción de chiles con resultados variables que dependen del tiempo en que se utilicen. Por ejemplo, cuando no hay cultivo la feromona es muy eficiente y en la etapa de floración disminuye su atracción (Gastélum-Luque *et al.*, 2010).

Por lo tanto, buscar una alternativa para el manejo del picudo del chile puede ser a través del uso de los volátiles que emiten las plantas del chile. Trabajos anteriores indican que sustancias como el β -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina, entre otros, pueden ser candidatos adecuados para la atracción del *A. eugenii* (Velázquez-González *et al.*, 2011^b; Muñiz-Merino *et al.*, 2014).

Sin embargo, se desconoce las proporciones de los COVs que liberan las plantas de *Capsicum* spp., y poder evaluarlos como atrayentes para el picudo del chile. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue cuantificar los COVs, elaborar mezclas sintéticas para su evaluación y determinar al menos una con capacidad de atracción para los adultos de *Anthonomus eugenii* Cano.

Hipótesis

Las mezclas sintéticas a evaluar, al menos una, provocará una respuesta de atracción en los adultos de *Anthonomus eugenii* Cano.

Objetivos

Cuantificar los compuestos orgánicos volátiles de los órganos de botones florales, flores y frutos en desarrollo de *Capsicum annuum* var. Poblano.

Evaluar mezclas sintéticas y determinar al menos una con capacidad de atracción para los adultos de *Anthonomus eugenii* Cano.

REVISIÓN DE LITERATURA

El picudo del chile y su planta hospedera *Capsicum* spp.

La atracción de machos y hembras del picudo del chile (*Anthonomus eugenii*) hacia su planta hospedera *Capsicum* spp., se debe a la acción de la feromona de agregación de los machos y su orientación con los compuestos orgánicos volátiles (COVs) que son emitidos durante la floración y desarrollo de frutos en el cultivo; posteriormente, los insectos causan daños al alimentarse en los órganos (Hogehout y Bos, 2011; Muñiz-Merino *et al.* 2014, Waage y Hedin, 2018). Lo anterior confiere a las hembras de *A. eugenii* tener una reproducción óptima, ovipositando en el interior de botones florales y frutos en desarrollo (Toapanta *et al.*, 2005; Porter *et al.*, 2007). Cuando el huevo eclosiona, las larvas por el mayor tiempo que se encuentran en el interior de los órganos, se alimentan de estos para su desarrollo. El daño en los frutos es más notorio debido a que se alimentan de las semillas y placenta de este hasta que toman un color amarillo; una vez que emergen como adultos perforan los órganos (Gordon y Armstrong, 1990; Patrock y Schuster, 1992). La planta en respuesta a los daños de herbivoría inicia con la abscisión de sus órganos (Stiling *et al.*, 1991; Seal y Martin, 2016). Olsson y Butenko (2018) mencionan que la abscisión ocurre a través de la progresión celular en ciertas etapas de la planta para desprenderse y renovar órganos viejos o dañados por señales ambientales o endógenas.

Por lo tanto, si no se detecta y controla a tiempo el picudo del chile en los cultivos de *Capsicum* spp., pueden ocasionar pérdidas de hasta un 30 a 90% en la producción (Torres-Ruiz y Rodríguez-Leyva, 2012; López-López *et al.*, 2016).

Los semioquímicos en la comunicación de *Anthonomus eugenii*

Los semioquímicos son compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos por plantas e insectos y representan un papel importante en la interacción de estos, estimulados por diferentes factores que alteran el entorno del organismo (Reddy y Guerrero, 2004). Las interacciones químicas que perciben los insectos son las feromonas y compuestos aleloquímicos, ambos actúan de forma intraespecíficos o interespecíficos (Boullis *et al.*, 2016). Los COVs de las plantas ayudan a los insectos a localizar su planta hospedera, a través de órganos quimiosensoriales y quimiorreceptores presentes en el cuerpo del insecto como las antenas (Schiestl, 2010; Ali *et al.*, 2015; Dickens y Payne, 2018).

Las antenas son estructuras externas cubiertas por diferentes formas y tamaños de sénsulos con funciones específicas para cada especie de insecto (Boland *et al.*, 1999), tal como se observa en la Figura 1, de la antena del picudo del chile, las cuales se desconocen.

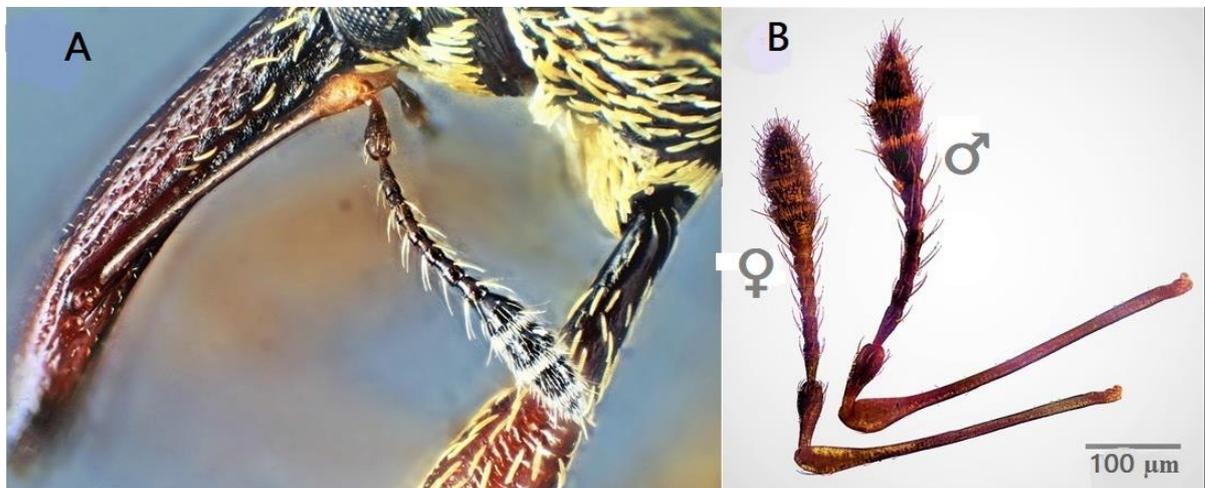


Figura 1. A) rostrum y antena de *A. eugenii*, B) vista dorsal de la antena de una hembra (♀) y un macho (♂) de *A. eugenii*.

Una descripción morfológica de los tipos de sénsulos en una antena de los insectos se menciona: en el himenóptero *Jaliscoa hunteri* (Crawford) (Gómez-Domínguez *et al.*, 2018); en lepidóptero *Talponia batesi* (Heinrich) (Castrejón-Gómez y Valdez-Carrasco, 2008); en coleópteros el picudo de la soya (*Rhyssomatus nigerrimus* Fahraeus) (Delgado-García *et al.*, 2016) y el picudo de la uva (*Naupactus xanthographus* Germar) (Vera y Bergmann, 2018), entre otros. Estos sénsulos facilitan al insecto localizar alimento, pareja y señales de peligro.

Los sénsulos presentan canales poros por el cual pasan las moléculas de olores, unidas a neuronas receptoras olfativas encargadas de recibir y procesar las señales químicas (Dethier y Chadwick, 1948, Schneider, 1964; Wilson *et al.*, 1993). En el procesamiento de las señales deben participar proteínas como: las proteínas de unión de olores (OBPs), encargadas de llevar las moléculas de olores muy hidrofóbicos y que son degradadas por una enzima de olores (ODEs); proteínas quimiosensoriales (CSPs) y sus aminoácidos: receptores olfativos (ORs), receptores ionotrópicos (IRs), receptores gustativos (GRs), entre otros (Satir y Gilula, 1973; Antony *et al.*, 2016), abreviadas por sus siglas en inglés.

Con lo anterior de una forma general permite entender cómo se lleva a cabo la recepción de olores y el proceso de comunicación entre el picudo del chile junto con su planta hospedera *Capsicum* spp.

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.
- Ali, S., M. Diakite, S. Ali, and M. Wang. 2015. Understanding insect behaviors and olfactory signal transduction. *Enliven: J Genet Mol. Cell Biol.* 2: 1-10.
- Ali, S., M. Diakite, S. Ali, and M. Wang. 2015. Understanding insect behaviors and olfactory signal transduction. *Enliven: J. Genet. Mol. Cell. Biol.* 2: 1-10.
- Antony, B., A. Soffan, J. Jakše, M. M. Abdelazim, S. A. Aldosari, A. S. Aldawood, and A. Pain. 2016. Identification of the genes involved in odorant reception and detection in the palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*, an important quarantine pest, by antennal transcriptome analysis. *BMC Genomics.* 17: 1-22.
- Avendaño-Meza, F., S. Parra-Terraza, J. L. Corrales-Madrid y P. Sánchez-Peña. 2015. Resistencia a insecticidas en tres poblaciones de picudo del chile (*Anthonomus eugeni* Cano) en el estado de Sinaloa, México. *Fitosanidad.* 19: 193-199.
- Bartelt, R. J. 1999. Weevils. Edited by H. Hardie and A. K. Minks. *Pheromones of Non-Lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants* (pp. 91-112). CABI Publishing. New York, NY 10016, USA.
- Boland, W., T. Krumm, T. Koch, J. Piel, and A. Jux. 1999. Induced biosynthesis of insect semiochemicals in plants. In D. J. Chadwick, and J. A. Goode (Eds.), *Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence* (pp. 110-131). Chichester: Wiley.
- Boullis, A., C. Detrain, F. Francis, and F. J. Verheggen. 2016. Will climate change affect insect pheromonal communication?. *Curr. Opin. Insect Sci.* 17: 87-91.
- Cattaneo, A. M., F. Gonzalez, J. M. Bengtsson, E. A. Corey, E. Jacquín-Joly, N. Montagné, U. Salvagnin, W. B. Walker, P. Witzgall, G. Anfora, and Y. V. Bobkov. 2017. Candidate

- pheromone receptors of codling moth *Cydia pomonella* respond to pheromones and kairomones. *Sci. Rep.* 7: 1-16.
- Caro-Encalada, M., C. Leyva-Morales y J. Ríos-Santana. 2014. Competitividad mundial de la producción de chile verde de México. *Rev. Econ.* 31: 95-128.
- Castrejón-Gómez, V. R. and J. Valdez-Carrasco. 2008. Morphological characteristics of antennal sensilla in *Talponia batesi* (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 101: 181-188.
- Delgado-García, E. M., J. Cibrián-Tovar, J. M. González-Camacho, J. Valdez-Carrasco, A. P. Terán-Vargas, and A. Azuara-Domínguez. 2016. Caracterización Morfológica de las Sensilas Antenales de *Rhyssomatus nigerrimus* (Coleoptera: Curculionidae). *Southwest. Entomol.* 41: 225-240.
- Dethier, V. G., and L. E. Chadwick, 1948. Chemoreception in insects. *Physiological.* 28: 220-254.
- Dickens, J. C., and T.L. Payne. 2018. Chemical messengers and insect behavior. In *Handbook of Natural Pesticides: Methods* by N. Bhushan Mandava (pp. 201-230). CRC Press.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2018. EPPO Global Database, *Anthonomus eugenii*. Fecha de consulta: septiembre 09, 2018. Tomado de: <https://gd.eppo.int/taxon/ANTHEU/distribution>.
- 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.* 20:1537-1555.
- Gastélum-Luque, R., M. López-Meza, T. P. Godoy-Angulo y P. Humbert. 2010. 1.5. El picudo o barrenillo del chile: estrategias de manejo. 1-15.

- Gordon, R., and A. M. Armstrong. 1990. Biología del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii*, Cano (Coleoptera: Curculionidae), en Puerto Rico. J. Agr. U. Puerto Rico. 59: 69-73.
- Gómez-Domínguez, N. S., J. R. Lomeli-Flores, E. Rodríguez-Leyva, J. M. Valdez-Carrasco, J. S. Bernal, and R. Arzuffi. 2018. Sense organs in antennae of *Jaliscoa hunteri* (Hymenoptera Pteromalidae). B. Insectol. 71: 103-111.
- Gregg, P. C., A. P. Del Socorro, and P. J. Landolt. 2018. Advances in attract-and-kill for agricultural pests: beyond pheromones. Annu. Rev. Entomol. 63: 453-470.
- Hogenhout, S. A., and J. I. Bos. 2011. Effector proteins that modulate plant–insect interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 14: 422-428.
- Latournerie-Moreno, L., J. S. López-Vázquez, G. Castañón-Nájera, J. O. Mijangos-Cortéz, G. Espadas-Villamil, A. Pérez-Gutiérrez y E. Ruiz-Sánchez. 2015. Evaluación agronómica de germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agroproductividad, 8: 24-29.
- Leonhardt, S. D., F. Menzel, V. Nehring, and T. Schmitt. 2016. Ecology and evolution of communication in social insects. Cell. 164: 1277-1287.
- López-López, P., R. Rodríguez-Hernández y E. Bravo-Mosqueda. 2016. Impacto económico del chile Huacle (*Capsicum annuum* L.) en el estado de Oaxaca. Revista Mexicana de Agronegocios, 38: 317-328.
- Muñiz-Merino, M.; J. Cibrián-Tovar, C. Hidalgo-Moreno, N. Bautista-Martínez, H. Vaquera-Huerta y C. Aldama-Aguilera. 2014. Compuestos volátiles atraen al picudo (*Anthonomus eugenii* Cano) del chile (*Capsicum* spp.) y presentan sinergia con su feromona de agregación. Agrociencia 48: 819-832.
- Patrock, R. J., and D. J. Schuster. 1992. Feeding, oviposition and development of the pepper weevil, (*Anthonomus eugenii* Cano), on selected species of Solanaceae. Pest Manag. Sci. 38: 65-69.

- Porter P., B. E. Lewis, R. Scanlon, and L. Murray. 2007. Pepper weevil infestation of Cv. early jalapeno peppers of different size classes. *Southwest. Entomol.* 32:1-6.
- Olsson, V., and Butenko, M.A., 2018. Abscission in plants. *Current Biology*, 28: R338-R339.
- Raffa, K. F., K. R. Hobson, S. LaFontaine, and B. H. Aukema. 2007. Can chemical communication be cryptic? Adaptations by herbivores to natural enemies exploiting prey semiochemistry. *Oecologia*, 153: 1009-1019.
- Reddy, G. V. P., and A. Guerrero. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Sci.* 9: 953-261.
- Rodríguez-Leyva, E., J. R. Lomeli-Flores, J. M. Valdez-Carrasco, R. W. Jones, and P. A. Stansly. 2012. New Records of species and locations of parasitoids of the pepper weevil in Mexico. *Southwest. Entomol.* 37: 73-83.
- Ruiz-Montiel, C., C. I. Ramón-Domínguez, L. Domínguez-Reyes, R. Ainsa-Zarate y M. R. Mendoza-López. 2017. Efecto de la trampa y atrayente sobre *Scyphophorus acupunctatus* en Agave. *Southwest. Entomol.* 42: 237-247.
- Satir, P., and N. B. Gilula. 1973. The fine structure of membranes and intercellular communication in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 18: 143-166.
- Schiestl, F. P. 2010. The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecol. Lett.* 13: 643-656.
- Schneider, D. 1964. Insect antennae. *Annu. Rev. Entomol.* 9: 103-122.
- Seal, D. R., and C. G. Martin. 2016. Pepper Weevil (Coleoptera: Curculionidae) preferences for specific pepper cultivars, plant parts, fruit colors, fruit sizes, and timing. *Insects*, 7: 9.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. Fecha de consulta: noviembre, 2017. Sitio web: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp

- Stiling, P., D. Simberloff, and B. V. Brodbeck. 1991. Variation in rates of leaf abscission between plants may affect the distribution patterns of sessile insects. *Oecologia*, 88: 367-370.
- Toapanta, M. A., D. J. Schuster y P. A. Stansly. 2005. Development and life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 34: 999-1008.
- Torres-Ruiz, A. y E. Rodríguez-Leyva. 2012. Guía para el manejo integrado de plagas del pimiento bajo invernadero, con énfasis en el picudo del chile. Koppert. 1-48 p.
- Waage, S. K., and P. A. Hedin. 2018. Plant stimulants and attractants (kairomones). In *Handbook of Natural Pesticides*. 161-180.
- Wilson, L. M., C. S. Henry, J. B. Johnson, and J. P. Mccaffrey. 1993. Sound production in *Phrydiuchus tau* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 621-630.
- Vera, W. and J. Bergmann. 2018. Distribution and ultrastructure of the antennal sensilla of the grape weevil *Naupactus xanthographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Microsc. Res. Tech.* 81: 590-598.
- Velázquez-González, J. C., Cibrián-Tovar, J., Hidalgo-Moreno, C., y Vásquez-Rojas, T. R. 2011. Compuestos volátiles que median la interacción entre *Anthonomus eugenii* Cano y *Capsicum annum* L. Tesis de doctorado. Pp. 21-46.

CAPÍTULO I. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN ÓRGANOS DE *Capsicum annuum* VAR. POBLANO

RESUMEN

Las kairomonas son semioquímicos emitidas por las plantas y representan un papel importante en la comunicación entre ellas e insectos herbívoros. Estos compuestos orgánicos volátiles (COVs) actúan como señales para insectos polinizadores y herbívoros. El picudo del chile (*Anthonomus eugenii*) es uno de los insectos plaga que se guía a través de los COVs de las flores y frutos de su planta hospedera *Capsicum* spp. El objetivo de este apartado fue cuantificar los COVs de botones florales (BF), flores (FL) y frutos (FR) en desarrollo de *Capsicum annuum* var. Poblano. Se realizó la adsorción de los COVs de los órganos por la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS) y aireación dinámica (AD), analizados y cuantificados en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC-EM). La concentración máxima de los COVs cuantificados en los órganos del chile var. Poblano fueron: (Z)- β -ocimeno con 283.84 $\mu\text{g/g}$ en FR, (Z)-3-hexenil acetato con 4.5 $\mu\text{g/g}$ en BF, terpinoleno con 0.87 $\mu\text{g/g}$ en FL y 2-isobutil-3-metoxipirazina con 0.44 $\mu\text{g/g}$ en frutos. Estos COVs serán una base para desarrollar un atrayente sintético para la captura de adultos de *A. eugenii*.

Palabras clave: kairomonas, atrayentes, *Anthonomus eugenii*.

**QUANTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN ORGANS OF
Capsicum annuum VAR. POBLANO**

ABSTRACT

Kairomones are semiochemicals emitted by plants and represent an important role in the communication between them and herbivorous insects. These volatile organic compounds (VOCs) act as signals for pollinators and herbivores. The pepper weevil (*Anthonomus eugenii*) is one of the pest insects that is guided through the VOCs of the flowers and fruits of its host plant *Capsicum* spp. The objective of this section was to quantify the VOCs of flower buds (FB), flowers (FL), and fruits (FR) in development of *Capsicum annuum* var. Poblano. Adsorption of organ VOCs by solid phase microextraction (SPME) and dynamic aeration (DA) technique was performed, analyzed and quantified in a gas chromatograph coupled to a mass selected detector (GC-MS). The maximum concentration of the VOCs quantified in the chili organs var. Poblano were: (Z)- β -ocimene with 283.84 $\mu\text{g/g}$ in FR, (Z)-3-hexenyl-acetate with 4.5 $\mu\text{g/g}$ in BF, terpinolene with 0.87 $\mu\text{g/g}$ in FL, and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine with 0.44 $\mu\text{g/g}$ in fruits. These VOCs could be a basis for developing a synthetic attractant for the capture of *A. eugenii* adults.

Key words: kairomones, attractants, *Anthonomus eugenii*.

1.1. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo vegetativo y productivo de las plantas se liberan compuestos orgánicos volátiles (COVs) con funciones aleloquímicas que actúan como atrayentes o repelentes en dos especies diferentes (Bruce y Pickett, 2011; Ye *et al.*, 2018). Sin embargo, las plantas pueden ser focos de atracción para insectos herbívoros, parasitoides y polinizadores (Lucas-Barbosa, 2016; Latif *et al.*, 2017). Si las señales químicas de los COVs efectúan una acción positiva para el emisor son considerados alomonas (James, 2003; Aljbory y Chen, 2018), si la señal es favorable para el receptor se atribuye como kairomonas (Wood, 1982).

Lo anterior se observa en las plantas de *Capsicum* spp., y su herbívoro el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), como principal plaga de este cultivo. Este insecto se alimenta principalmente de los órganos de botones florales, flores y frutos en desarrollo de la planta de chile.

Por lo que, durante la etapa productiva de las plantas de *Capsicum* spp., se emiten COVs atractivos para el picudo del chile. Algunos de los COVs identificados en diferentes variedades de chiles se mencionan en el Cuadro 1 y tienen capacidad de atracción para el picudo del chile (Muñiz-Merino *et al.*, 2014).

Por lo que, usar las kairomonas de forma sintética similares a los que desprenden los órganos de las plantas de chile para su evaluación con adultos de *A. eugenii* facilitaría su monitoreo y control. Además, se desconoce las proporciones de los COVs que se emiten en los órganos de botones florales, flores y frutos en desarrollo de *Capsicum* spp.

Cuadro 1. COVs reportados en diferentes variedades de *C. annuum*.

Variedad	Compuestos	Técnica de extracción	Referencia
Kulai	2,3-butanediona, (E)-2-hexenal, hexanal, linalool, 3-carene y 2-isobutil-3-metoxipirazina.	MEFS*	Mazida <i>et al.</i> , 2005.
Jalapeño	(3E,7E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-ridecatetraeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, (Z)-3-hexen-1-il acetato, (E)- β -ocimeno y linalool (frutos). (Z)- β -ocimeno, (3E,7E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno, (3E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (flores). (E,E)- α -farneseno, (E)- α -bergamoteno, β -elemeno, metil salicilato, (E,E) -nerolidol y (Z)-3-hexen-1-ol (durante la alimentación de <i>A. eugenii</i> en las flores).	Aireación	Adesso <i>et al.</i> , 2011.
Habanero	Metil salicilato, (E)-b-ocimeno, linalool, α -pineno, α -terpineol, limoneno, 2-isobutil-3-metoxipiracina.	MEFS*	Cuevas-Glory <i>et al.</i> , 2015.

*Microextracción en fase sólida

Por lo que, el objetivo de este apartado fue cuantificar los compuestos orgánicos volátiles de los órganos de botones florales, flores y frutos en desarrollo de *Capsicum annuum* var. Poblano.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Establecimiento del cultivo

Se adquirieron plántulas de *Capsicum annuum* var. Poblano con 30 días de germinadas, provenientes de Cuapiaxtla de Madero, Puebla, México. Estas fueron establecidas en una parcela de 250 m² en los campos experimentales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El material se utilizó para la obtención de COVs de botones florales, flores y frutos así como para la alimentación de la cría de *A. eugenii*. El manejo del cultivo fue sin la aplicación de agroquímicos.

1.2.2. Extracción de COVs en órganos de *C. annuum* var. Poblano

En la extracción de los COVs de botones florales (BF), flores (FL) y frutos en desarrollo (FR) de *Capsicum annuum* var. Poblano, se empleó la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS) de Junior *et al.* (2015) y aireación dinámica (AD) de Velázquez-González *et al.* (2011), con algunas modificaciones.

1.2.2.1. Microextracción en fase sólida

La fibra de MEFS utilizada fue 100 µm de polidimetilsiloxano (PDMS/57300-U), Supelco (Bellefonte, PA, USA) (Figura 2). Para la adsorción de los COVs de cada muestra, la fibra se expuso al espacio de cabeza del vial de 500 mL KIMAX® durante 40 min a 24 ±1 °C. Se empleó 25 g de cada muestra (n=4).

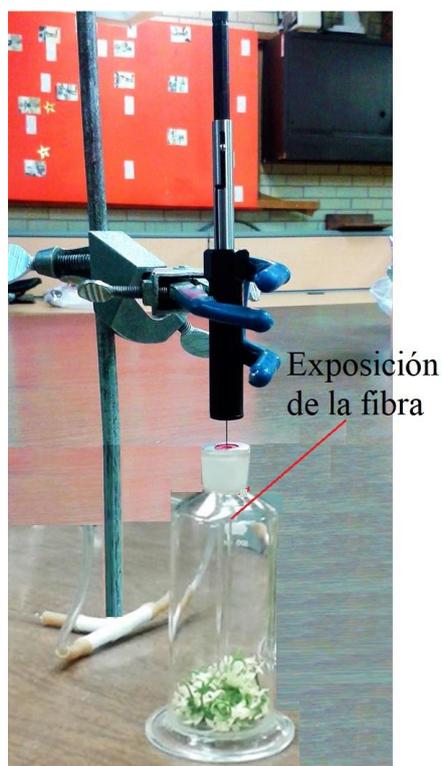


Figura 2. Extracción de COVs de los órganos de chile por microextracción en fase sólida.

1.2.2.2. Aireación dinámica

Se utilizaron frascos tipo Drechsler de 500 mL con tapa esmerilada (29/42), provisto de dos tubos de salidas (PIREX®, USA). A un tubo se adaptó una manguera de plástico (Nalgene® 180 PVC; 3/16" ID) y esta se conectó a una bomba (ELITE 802®) que suministró aire y a un flujómetro (Hamilton®) que reguló el mismo a 60 mL/min. El sistema anterior se conectó a matraces Kitasatos de 500 mL (KIMAX®) que contenían 250 mL de agua destilada para suministrar aire húmedo. En medio de las mangueras conectadas en dirección a los frascos se colocó una pipeta Pasteur de 150 mm (BRAND®, Germany) empacada con 70 mg de Tenax® TA (malla 60/80) (Sigma Aldrich®) y 90 mg de fibra de vidrio. Al otro tubo se conectó otra manguera con otra pipeta empacada como salida de aire para la adsorción de los COVs (Figura 3). Los ensayos se realizaron con 25 g de cada órgano durante 6 h (n=4). Finalmente, la pipeta se retiró y se eluyó con 1 mL de hexano HPLC (J. T. Baker®) y se refrigeraron a -15 °C hasta su análisis.



Figura 3. Extracción de COVs de los órganos de chile por aireación dinámica.

1.2.4. Condiciones de análisis

Las muestras obtenidas por MEFS y AD fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (7890A) acoplado a un detector selectivo de masas (5975C) (Agilent Technologies®) (CG-EM). La separación de los COVs se realizó en una columna HP-5ms (30 m × 0.25 mm; 0.50 μm) con un flujo de helio de 1 mL/min. El análisis para muestras de MEFS y AD se realizó en modo splitless (2 min) con dos rampas de temperatura. Método uno: 50°C hasta 250°C a 5°C/min. Método dos: 50°C por 2 min hasta 75°C a 5°C/min, luego hasta 90°C a 2°C/min y finalmente hasta 250°C a 5°C/min. Los compuestos se monitorearon en modo SCAN (m/z 40-350).

La identificación preliminar de los COVs se realizó mediante la búsqueda y-comparación de los espectros de masas con la biblioteca NIST V. 2002. La confirmación de los compuestos se realizó con los tiempos de retención y con los espectros de masas de estándares.

1.2.5. Estándares

Los estándares utilizados fueron: β -ocimeno CRM40748 (2000 $\mu\text{g/mL}$) (95.4%), 2-isobutil-3-metoxipirazina (99%), (Z)-3-hexenil acetato ($\geq 98\%$), terpinoleno ($\geq 94\%$), se adquirieron con Sigma Aldrich®. La preparación de estos para la curva de calibración se realizó peso/peso en la balanza analítica Mettler Toledo (NewClasicMS, 0.01 mg).

1.2.6. Curva de calibración

La cuantificación de los analitos de las muestras obtenidas por AD se realizó por el método de estándar externo. Se prepararon soluciones Stock de los estándares diluidos en hexano HPLC (J.K. Baker), de estas se prepararon las curvas de calibración. Las concentraciones fueron: (Z)- β -ocimeno de 19.25 $\mu\text{g/g}$ a 259.13 $\mu\text{g/g}$, (Z)-3-hexenil acetato de 0.77 $\mu\text{g/g}$ a 8.07 $\mu\text{g/g}$ y terpinoleno de 0.094 $\mu\text{g/g}$ a 1.969 $\mu\text{g/g}$. Para el 2-isobutil-3-metoxipirazina se preparó una solución de 0.148 $\mu\text{g/g}$ y su cuantificación se realizó mediante factores de respuesta. Todas las soluciones fueron diluidas también en hexano HPLC (J.K. Baker).

1.2.7. Análisis estadístico

El análisis de datos de los compuestos orgánicos volátiles de botones florales, flores y frutos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza y una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Se utilizó el programa SAS 9.0 Institute Inc., 2002.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Extracción de COVs en órganos de *C. annuum* var. Poblano por MEFS y AD

Los análisis de los COVs de botones florales, flores y frutos de *C. annuum* var. Poblano se observan en los cromatogramas siguientes. En la figura 4 se muestra la comparación de los resultados obtenidos de los COVs de botones florales extraídos por MEFS y por AD. Se observó que la técnica de AD es más eficiente (ocho compuestos) que la MEFS (cinco), ya que además se obtuvo mayor área.

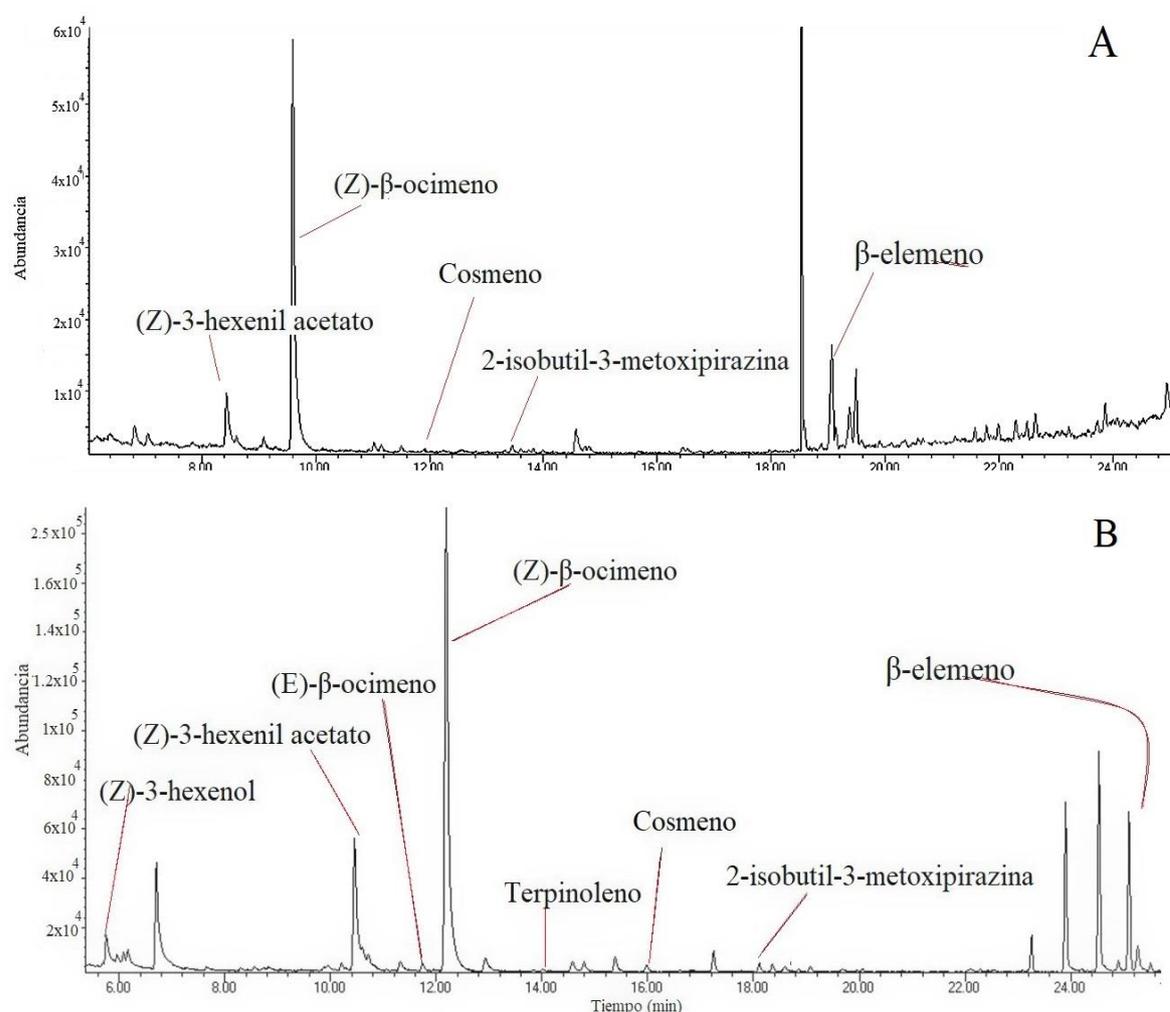


Figura 4. Cromatogramas de muestras por A) MEFS y B) AD de botón floral de *C. annuum* var. Poblano. Condiciones de análisis en 1.2.4.

En cuanto al análisis de los COVs de muestras de flores se observó que por AD se encontraron ocho compuestos y tres por MEFS, aunque con mayor área (Figura 5).

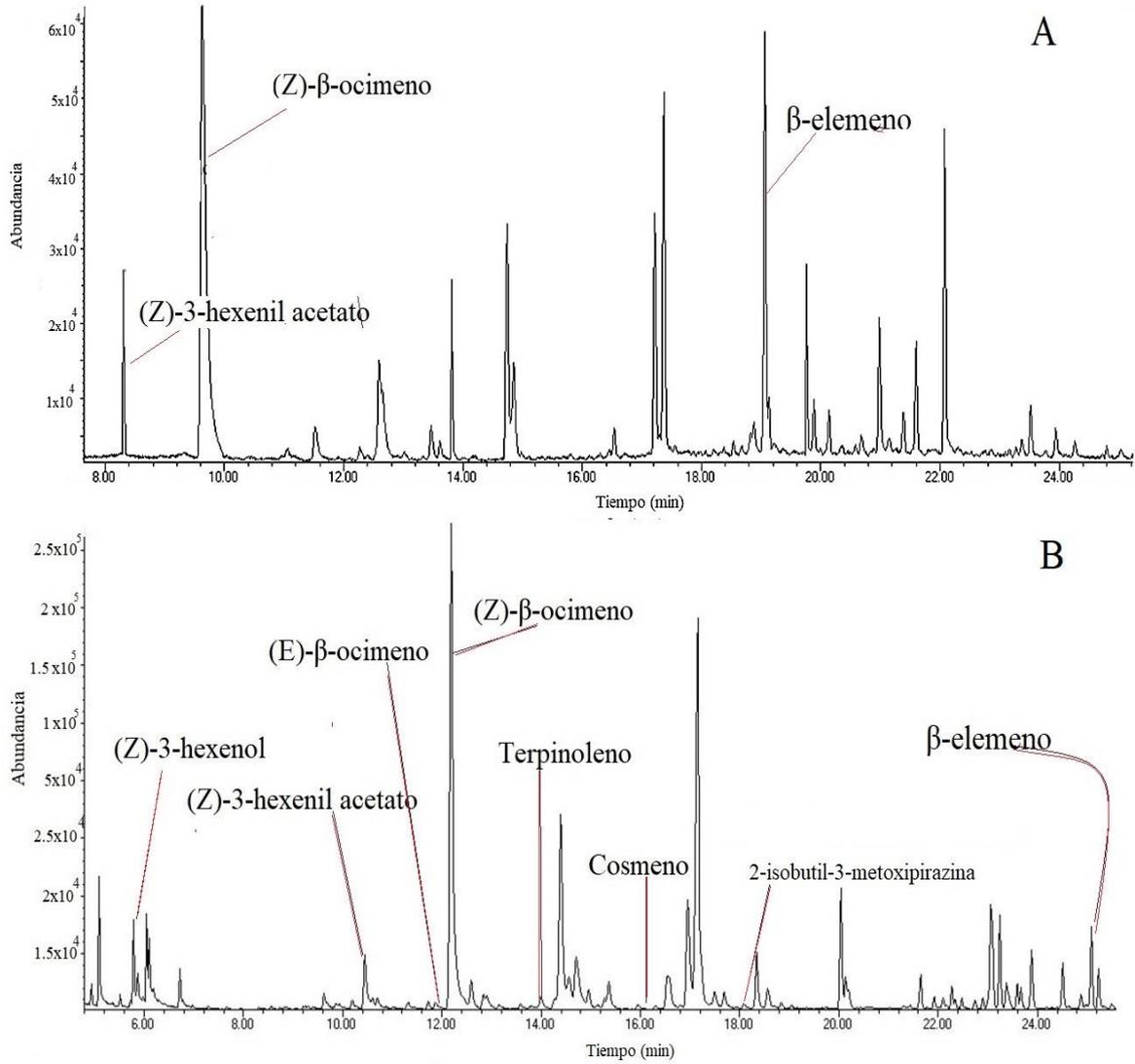


Figura 5. Cromatogramas de muestras por A) MEFS y B) AD de flores de *C. annuum* var. Poblano. Condiciones de análisis en 1.2.4.

La resultados mostrados en la Figura 6 muestran la similitud con la Figura 4, ya que se obtuvieron el mismo número de compuestos.

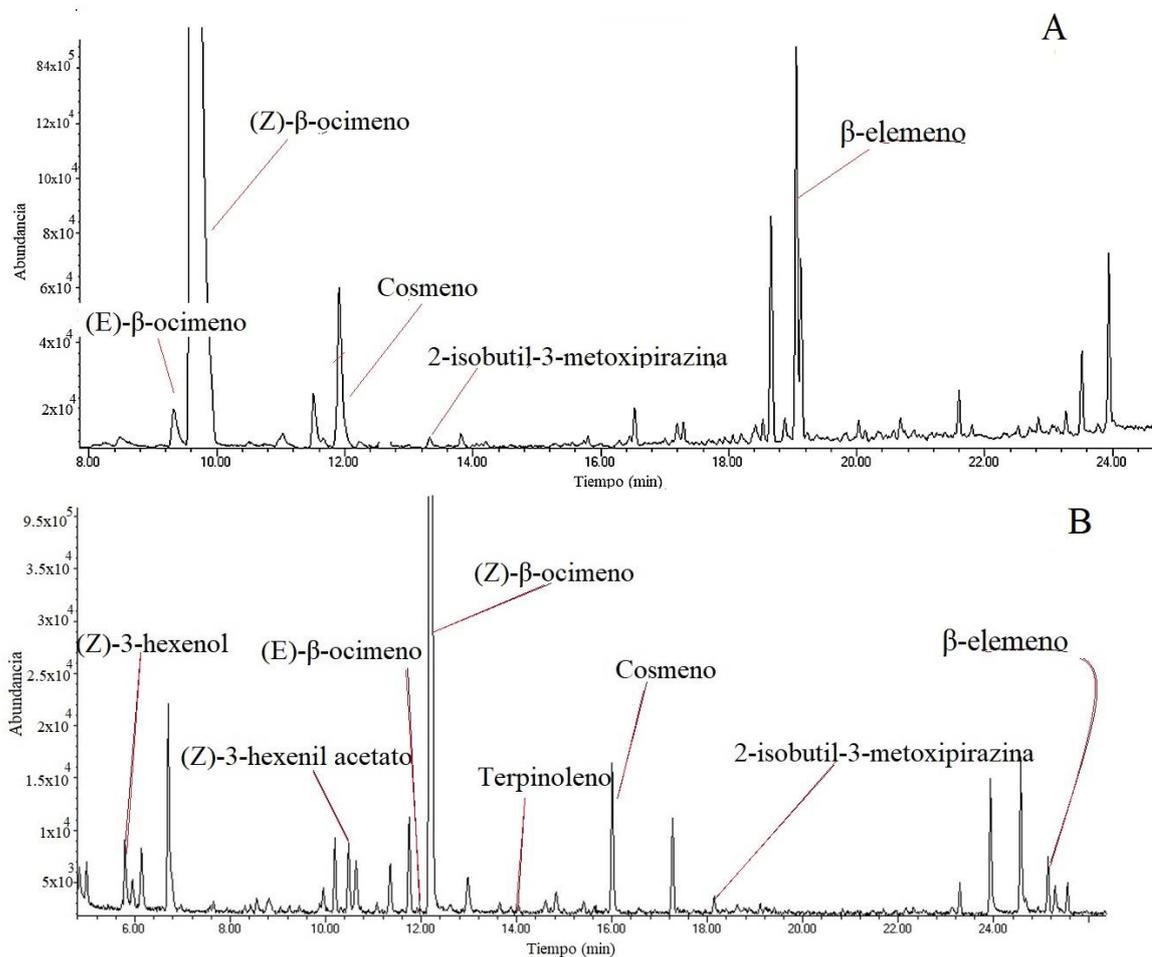


Figura 6. Cromatogramas de muestras por A) MEFS y B) AD de frutos de *C. annuum* var. Poblano. Condiciones de análisis en 1.2.4.

Los resultados anteriores se resumen en el Cuadro 2. Los compuestos en esta investigación también fueron reportados en frutos de chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) (Sosa-Moguel *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2018) y en frutos de especies de pimientos (Silvis *et al.*, 2019). Sin embargo, el número de compuestos que reportan son mayores. Lo anterior se explica porque estos autores maceraron el material y realizaron extracción con disolventes, por lo tanto, habría mayor número de compuestos debido a una mayor superficie de

exposición. A diferencia del ensayo realizado en este estudio cuyo propósito fue simular la emisión de los volátiles en campo cuando estos son percibidos por los picudos del chile.

Cuadro 2. Comparación de abundancias de los COVs identificados en los órganos de *C. annuum* var. Poblano.

Compuestos	t_R (min)	Método uno			t_R (min)	Método dos		
		MEFS				AD		
		BF	FL	FR		BF	FL	FR
(Z)-3-hexenol*	4.82	-	-	-	5.80	+	+	+
(Z)-3-hexenil acetato**	8.49	+	+	-	10.49	+	+	+
(E)- β -ocimeno**	9.32	-	-	+	11.76	+	+	+
(Z)- β -ocimeno**	9.62	++	++	+++	12.21	++	++	+++
Terpinoleno**	11.45	-	-	-	14.01	+	+	+
Cosmeno*	11.94	+	-	++	16.02	+	+	+
2-isobutil-3-metoxipirazina**	13.3	+	-	+	18.15	+	+	+
β -elemeno*	19.06	++	+	++	25.12	++	++	+

*Identificación con base en el espectro de masas del NIST 2002. **Identificación con base en el espectro de masas y en el tiempo de retención de estándares. t_R , tiempo de retención; BF, botón floral; FL, flor; FR, fruto. Abundancia en áreas: + Poco ($<1 \times 10^6$); ++ Abundante ($\geq 1 \times 10^6$ o $5 \times 10^6 <$); +++ Muy abundante ($\geq 5 \times 10^6$); - No detectado.

De los resultados anteriores se concluye que la mejor técnica de extracción fue AD. Por lo tanto, se procedió a realizar la cuantificación de los COVs en cada uno de los órganos estudiados: botones florales, flores y frutos.

1.3.2. Cuantificación de COVs de los órganos de *C. annuum* var. Poblano

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas de los estándares empleados para determinar la concentración de cada uno de los analitos en las muestras.

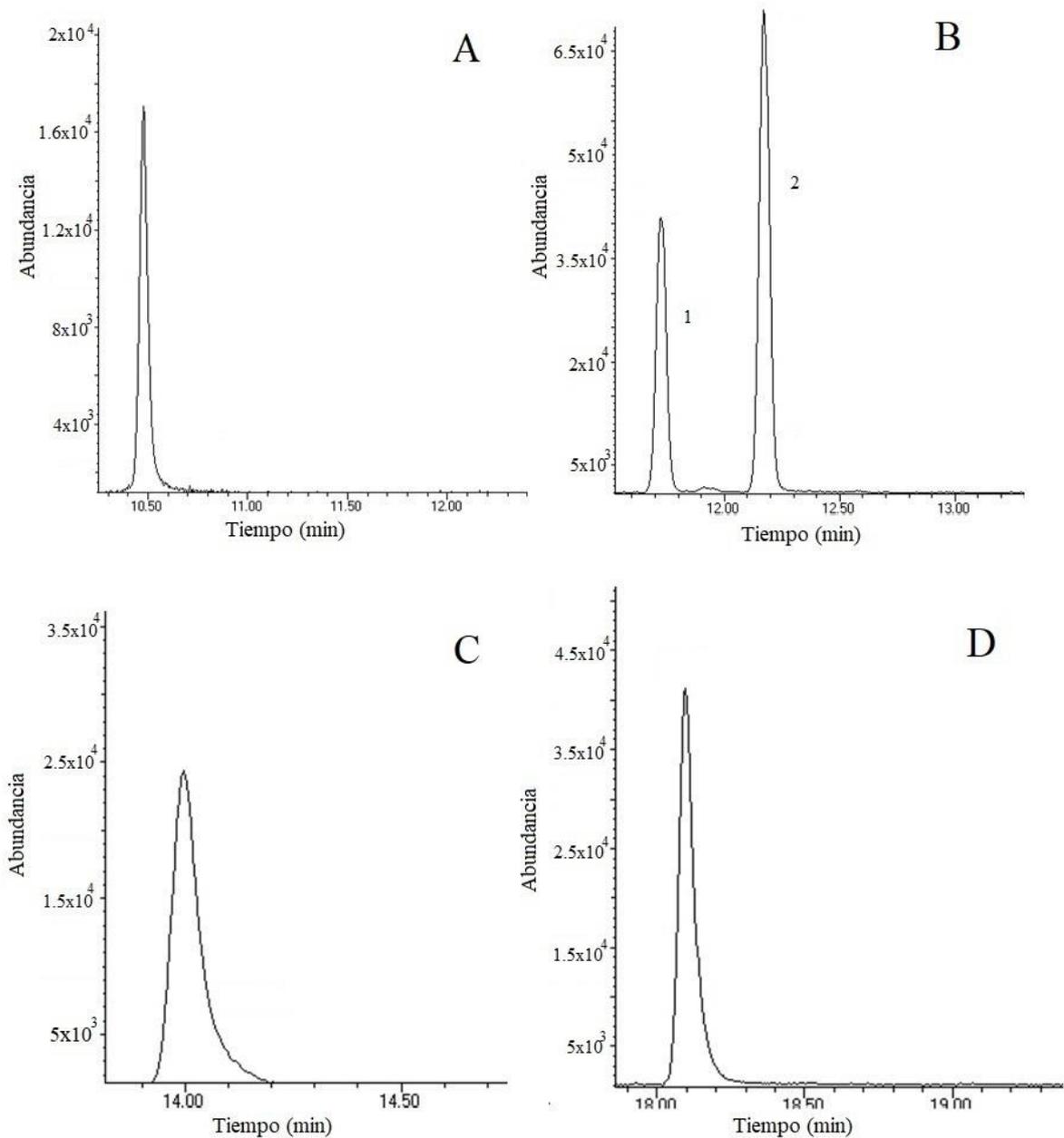


Figura 7. Cromatogramas de estándares: A) (*Z*)-3-hexenil acetato: 4.82 $\mu\text{g/g}$, B) (*E*)- β -ocimeno (1), (*Z*)- β -ocimeno: 49.57 $\mu\text{g/g}$ (2), C) terpinoleno: 0.94 $\mu\text{g/g}$ y D) 2-isobutil-3-metoxipirazina: 1.8 $\mu\text{g/g}$.

En las Figuras 8 a 12 se muestran la comparación de los espectros de masas de los compuestos encontrados en las muestras de *C. annuum* Var. Poblano y de sus estándares.

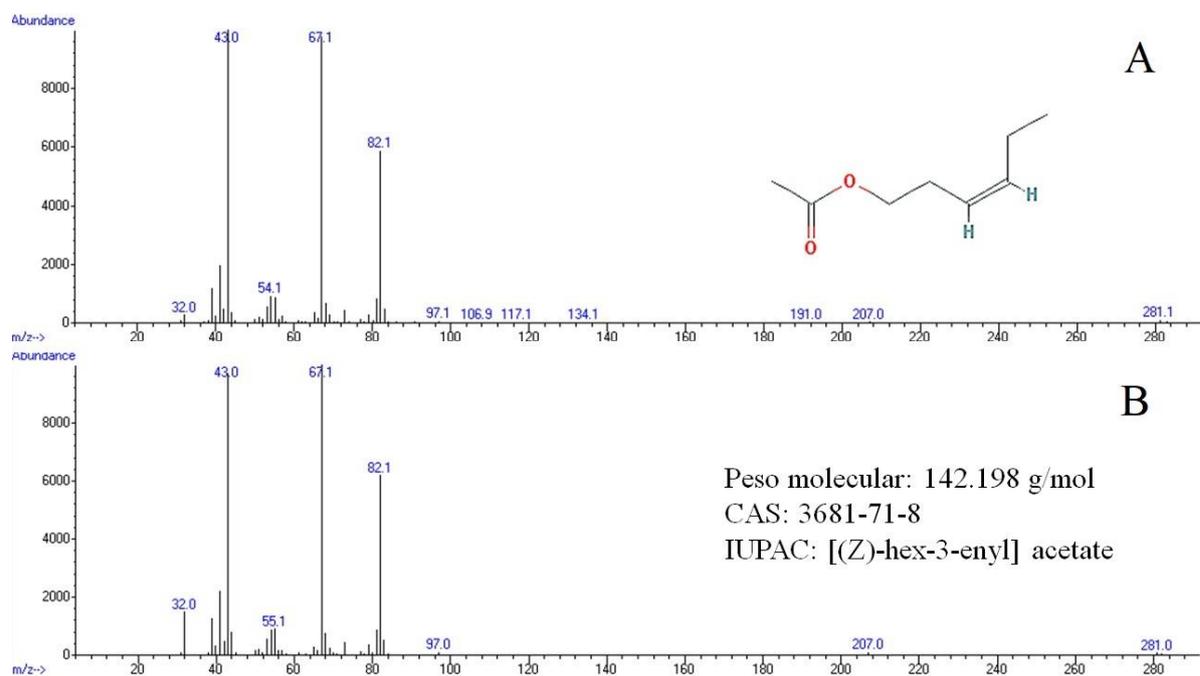


Figura 8. Espectro de masas de (Z)-3-hexenil acetato en A) muestra y B) estándar.

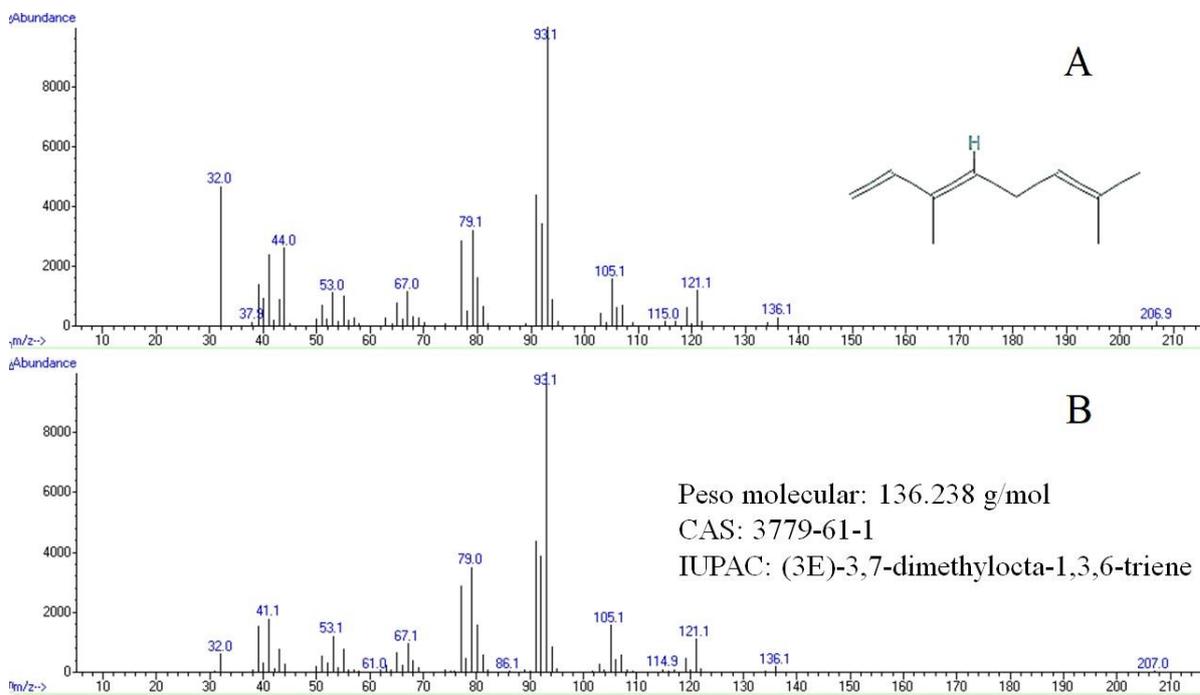


Figura 9. Espectro de masas de (E)-β-ocimeno en A) muestra y B) estándar.

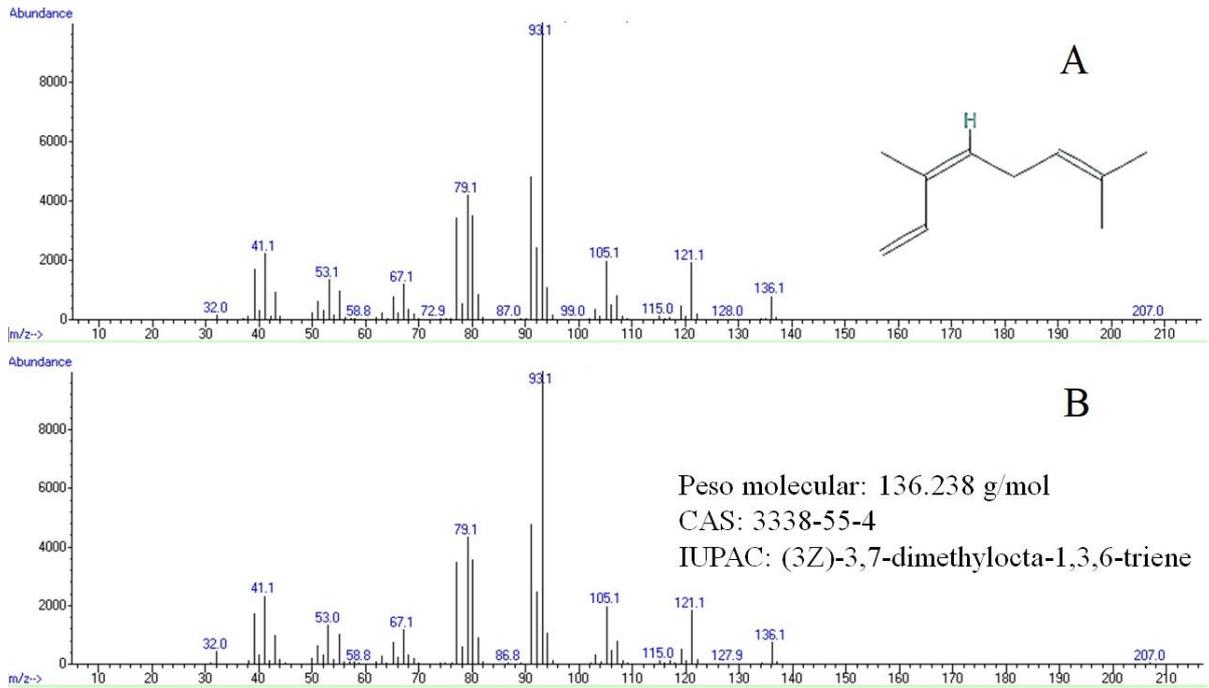


Figura 10. Espectro de masas de (Z)- β -ocimeno en A) muestra y B) estándar.

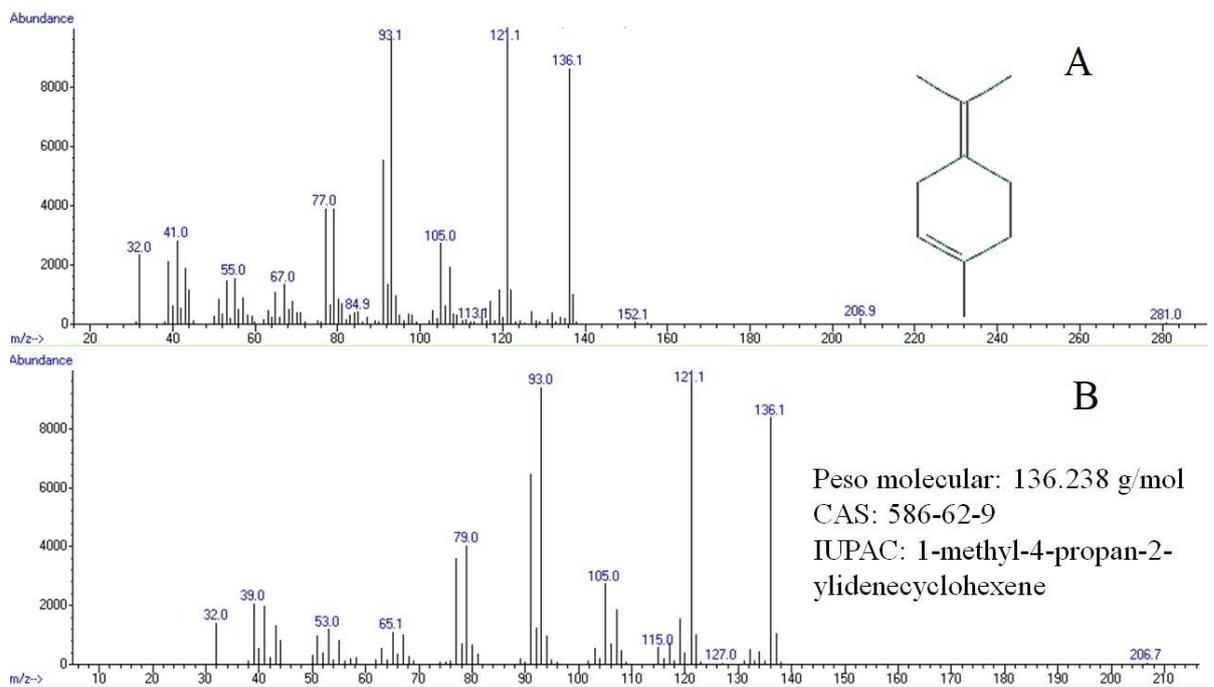


Figura 11. Espectro de masas de terpinoleno en A) muestra y B) estándar.

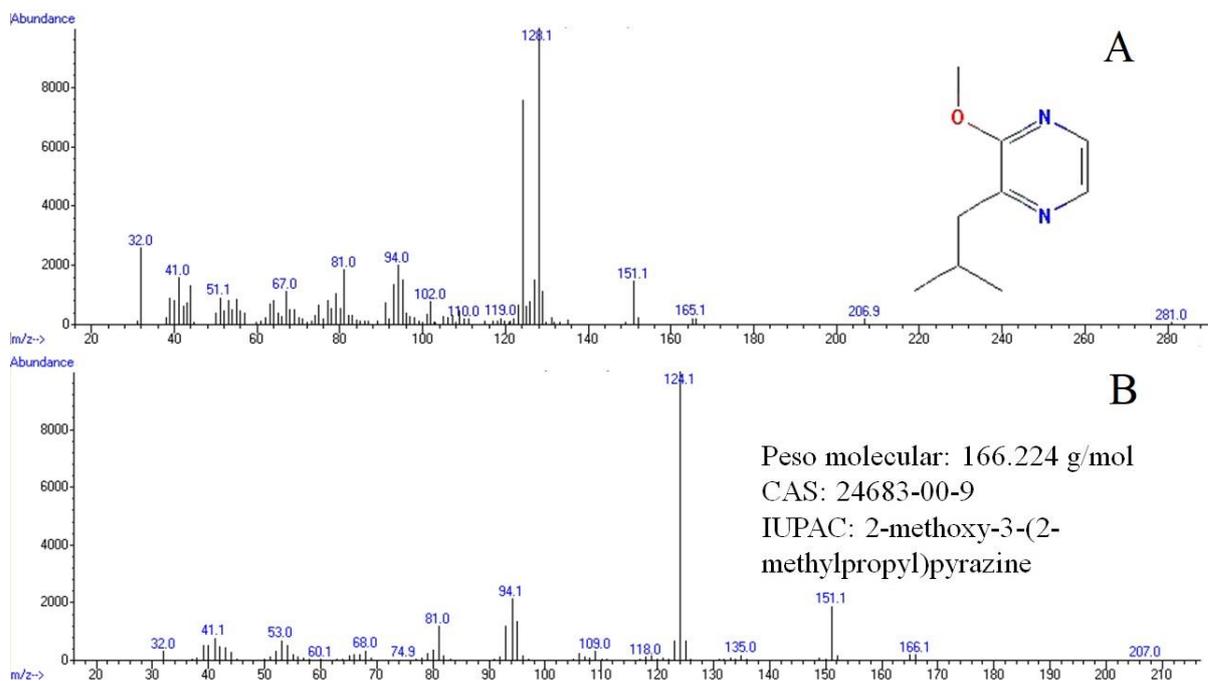


Figura 12. Espectro de masas de 2-isobutil-3-metoxipirazina en A) muestra y B) estándar.

Los COVs corroborados con sus respectivos estándares fueron cuantificados mediante curvas de calibración (Figura 13).

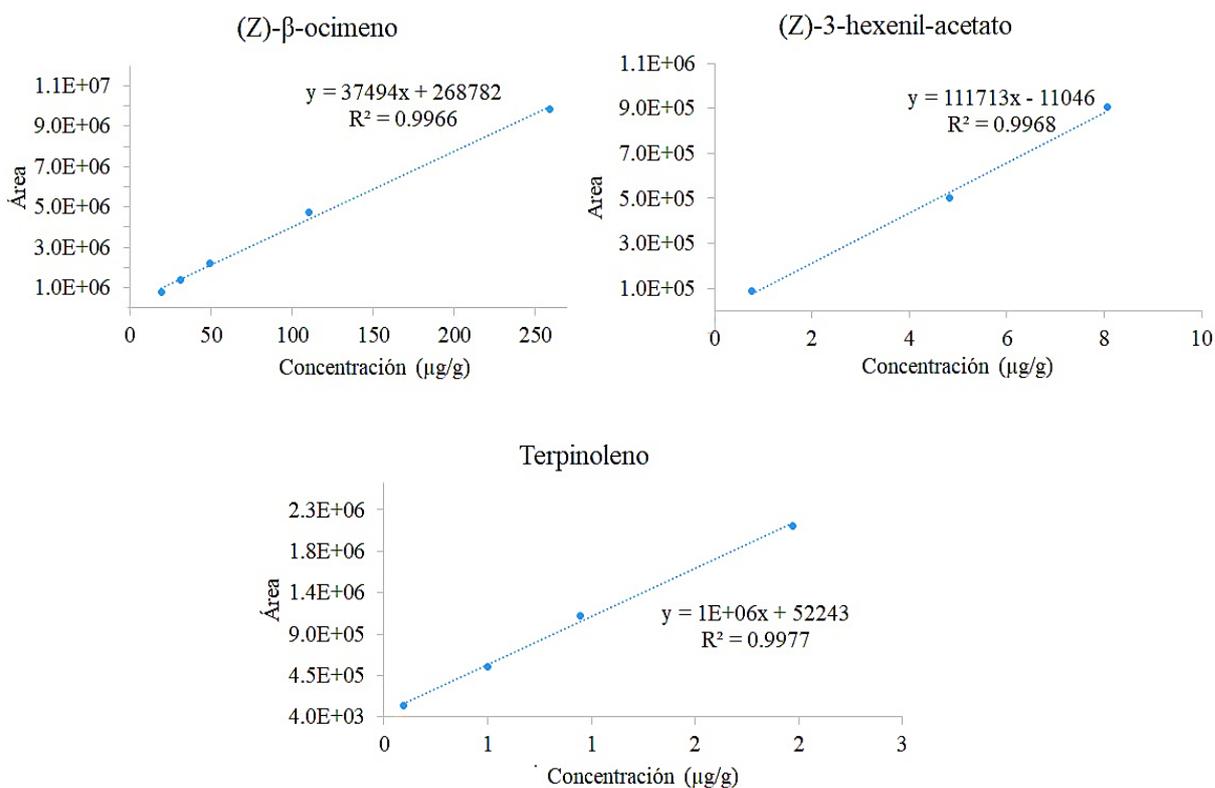


Figura 13. Curvas de calibración de los estándares. Condiciones de análisis en 1.2.4.

La cuantificación del (Z)- β -ocimeno, en los órganos de *C. annuum* var. Poblano fue de 61.65 $\mu\text{g/g}$ en botones florales, 49.24 $\mu\text{g/g}$ en flores y 283.84 $\mu\text{g/g}$ en frutos (Figura 14). Este último fue el principal órgano con mayor emisión del compuesto volátil (Z)- β -ocimeno.

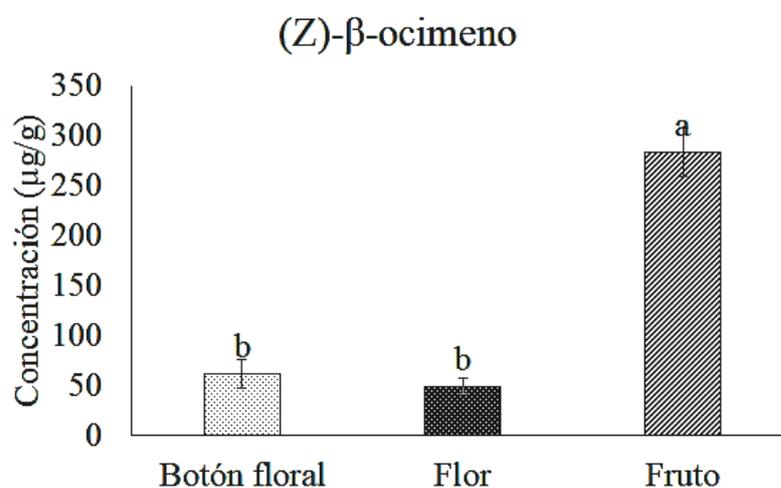


Figura 14. Comparación de la concentración de (Z)- β -ocimeno en órganos de *C. annuum* var. Poblano. Barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas ($F=15.52$, $P=0.0012$), ($n=4$).

El (Z)- β -ocimeno pertenece al grupo de los terpenos sintetizados por las sintasas terpénicas (TPSs, por sus siglas en inglés) (Chambagne y Boutry, 2016; Huchelmann *et al.*, 2017), secretado por tricomas glandulares y cavidades secretorias de las hojas, en la epidermis glandulares de los pétalos que generan y almacenan o emiten terpenos, explicados a detalle en varias especies de *Capsicum* spp., por Kim *et al.* (2011) y Dias *et al.* (2013). Sus funciones son: atraer insectos para que las flores sean polinizadas o en su caso, no benéfico para la planta, atraer herbívoros (Wang *et al.*, 2008; Farré-Armengol *et al.*, 2017; Fujita *et al.*, 2017). Por ejemplo: Borg-Karlson *et al.* (1993), reportaron en flores de la familia Apiaceae, el (Z)- β -ocimeno, como atrayente volátil para los insectos polinizadores y un incremento en la atracción de insectos herbívoros durante el desarrollo de los frutos; Sun *et al.* (2012), mencionan que el (Z)- β -ocimeno es un compuesto con potencial para atraer a los adultos de

Myllocerinus aurolineatus (Voss). Eventos importantes también observados en *A. eugenii* con su planta hospedera *Capsicum* spp.

El (Z)-3-hexenil acetato se identificó en los tres órganos de *C. annuum* var. Poblano, especialmente de botones florales con una concentración de 4.5 µg/g, seguido de flores con 1.81 µg/g y 1.54 µg/g para frutos (Figura 15).

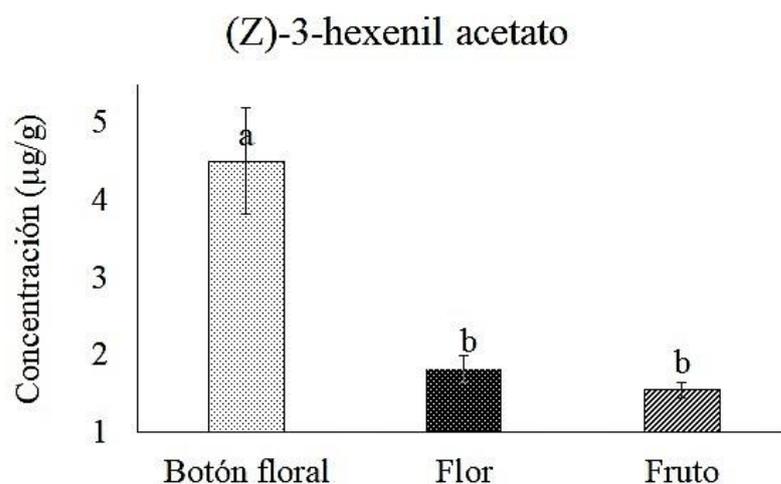


Figura 15. Comparación de la concentración de (Z)-3-hexenil acetato en órganos de *C. annuum* var. Poblano. Barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas ($F=15.52$, $P=0.0012$), ($n=4$).

La abundancia de (Z)-3-hexenil acetato en la planta *Capsicum* spp., se debe a que es un compuesto de hojas y frutos verdes (Eudes *et al.*, 2016), sintetizado por BAHD aciltransferasa (D'Auria *et al.*, 2007), y en respuesta a la herbivoría se incrementa. Este último se demostró en plantas de té que fueron infestadas con el picudo *Ectropis obliqua* (Prout) (Sun *et al.*, 2014).

Por otro lado, Muñiz-Merino *et al.* (2014) reportaron que el (Z)-3-hexenil acetato es un compuesto con potencial de atracción en hembras y machos de *A. eugenii*. También en *Anthonomus musculus* (Say), una plaga del arándano (Szendrei *et al.*, 2011).

El (Z)- β -ocimeno y (Z)-3-hexenil acetato también fueron reportados por Rodríguez-Burruezo *et al.* (2010) y Junior *et al.* (2015), en *Capsicum* spp. Incluso durante la floración y fructificación de las plantas de *Silene latifolia*, quienes actúan como atrayentes para polinizadores e insectos herbívoros (Cozzolino *et al.*, 2015).

El terpinoleno fue otro de los compuestos cuantificados con concentraciones de 0.40 $\mu\text{g/g}$ para botones florales, 0.87 $\mu\text{g/g}$ de flores y 0.18 $\mu\text{g/g}$ de frutos, con mayor concentración en flores. Se reporta como el aroma volátil responsable del sabor característico de muchos frutos. Cardeal *et al.* (2006) reportaron el terpinoleno en cuatro variedades de pimientas (*Piper* spp.); Zito *et al.* (2013), en volátiles de flores de *Caralluma europea* (Guss); San *et al.* (2017), en frutos de mango cv 'Honey Gold'. Muñiz-Merino *et al.* (2014), observaron el terpinoleno con potencial de atracción en los adultos de *A. eugenii*.

También se encontró el 2-isobutil-3-metoxipirazina con concentraciones de 0.17 $\mu\text{g/g}$ en botones florales, 0.21 $\mu\text{g/g}$ en flores y 0.44 $\mu\text{g/g}$ en frutos. Este último fue el principal órgano con mayor emisión del compuesto. Un compuesto característico con aroma volátil de chile verde y reportado en pimiento (Lama *et al.*, 2016), con potencial de atracción para el picudo del chile (Muñiz-Merino *et al.*, 2014).

Otros de los compuestos identificados tentativamente con la librería NIST 2002, en los órganos de *C. annuum* var. Poblano y no corroborados con estándares fueron: el cosmeno en flores y frutos, β -elemeno en botones florales, flores y frutos (Cuadro 2). El cosmeno pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como alcatetraenos. Estos son hidrocarburos que contienen exactamente cuatro dobles enlaces carbono a carbono (Nayler y Whiting, 1954). Es un aroma volátil con funciones importantes en la defensa de una planta y en la interacción planta-planta (Halbritter *et al.*, 2018). Se reportó en hojas de especies de

Lamiaceae (Silva y Câmara, 2013), en plantas de haba (*Phaseolus lunatus*) en respuesta a la infestación con hongos endófitos. También en flores de especies de *Syriga* en porcentajes de 0.86 a 4.35 % (Yang *et al.*, 2016). En la esencia floral de *Lilium* ‘siberia’, en respuesta a la intensidad de luz y temperatura el cosmeno incrementó en las flores (Hu *et al.*, 2013). Por lo tanto, puede ser un COV importante en la atracción del picudo del chile durante su emisión en flores de *Capsicum* spp.

El β -elemeno es un sesquiterpeno responsable de las aromas florales de algunas plantas con propiedades farmacológicas (Ahmad *et al.*, 2018). Este compuesto se reportó en frutos de pimientos rojos (Kocsis *et al.*, 2002), en los diferentes órganos de *Rhus coriaria* L. (Reidel *et al.*, 2017), y en frutos de *Piper nigrum* L. (Liu *et al.*, 2018). Incluso, el β -elemeno se usa como feromonas para algunos insectos (The Pherobase, 2018).

1.4. CONCLUSIONES

Se cuantificaron los compuestos: (*Z*)- β -ocimeno, (*Z*)-3-hexenil-acetato, terpinoleno y 2-isobutil-3-metoxipirazina, en concentraciones máximas del 283.84 $\mu\text{g/g}$ de frutos, 4.5 $\mu\text{g/g}$ de botones florales, 0.87 $\mu\text{g/g}$ de flores y del 0.44 $\mu\text{g/g}$ en frutos, respectivamente.

1.5. LITERATURA CONSULTADA

- Addesso, K. M., H. J. Mcauslane, and H. T. Alborn. 2011. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Aljbory, Z., and M. S. Chen. 2018. Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Sci.* 25: 2-23.
- Ahmad, K. A., H. Ze, J. Chen, F. U. Khan, C. Xuezhao, J. Xu, and D. Qilong. 2018. "The protective effects of a novel synthetic β -elemene derivative on human umbilical vein endothelial cells against oxidative stress-induced injury: Involvement of antioxidation and PI3k/Akt/eNOS/NO signaling pathways." *Biomed. Pharmacother.* 106: 1734-1741.
- Borg-Karlson, A. K., I. Valterová, and L. A. Nilsson. 1993. Volatile compounds from flowers of six species in the family Apiaceae: Bouquets for different pollinators?. *Phytochemistry*, 35: 111-119.
- Bruce, T.J., and J. A. Pickett. 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects—finding the right mix. *Phytochemistry*, 72: 1605-1611.
- Cardeal, Z. de L., M. D. R. Gomes da Silva, and P. J. Marriott. 2006. "Comprehensive two- dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles." *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up- to- the- Minute Research in Mass Spectrometry.* 20: 2823-2836.
- Cozzolino, S., S. Fineschi, M. Litto, G. Scopece, J. Trunschke, and F. P. Schiestl. 2015. Herbivory increases fruit set in *Silene latifolia*: a consequence of induced pollinator-attracting floral volatiles?. *J. Chem. Ecol.* 41: 622-630.

- Champagne, A., and Boutry, M., 2016. Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864: 1039-1049.
- Cuevas-Glory, L. F., O. Sosa-Moguel, J. Pino, and E. Sauri-Duch. 2015. GC-MS Characterization of volatile compounds in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) by optimization of headspace solid-phase microextraction conditions. *Food Anal. Methods*. 8:1005-1013.
- D'Auria, J., E. Pichersky, A. Schaub, A. Hansel, and J. Gershenzon. 2007. Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 49: 194-207.
- Dias, G. B., V. M. Gomes, T. M. Moraes, U. P. Zottich, G. R. Rabelo, A. O. Carvalho, M. Moulin, L. S. A. Gonçalves, R. Rodrigues, and M. Da Cunha. 2013. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genet. Mol. Res*. 12: 6488-6501.
- Eudes, A., M. Mouille, D. S. Robinson, V. T. Benites, G. Wang, L. Roux, Y. Tsai, E. Baidoo, T. Chiu, J. Heazlewood, H. V. Scheller, A. Mukhopadhyay, J. D. Keaslin, S. Deutsch, and D. Loqué. 2016. Exploiting members of the BAHD acyltransferase family to synthesize multiple hydroxycinnamate and benzoate conjugates in yeast. *Microb. Cell Fact*. 15: 1-16.
- Farré-Armengol, G., I. Filella, J. Llusà, and J. Peñuelas. 2017. β -ocimene, a key floral and foliar volatile involved in multiple interactions between plants and other organisms. *Molecules*. 22:1-9
- Fujita, Y., T. Koeduka, M. Aida, H. Suzuki, Y. Iijima, and K. Matsui. 2017. Biosynthesis of volatile terpenes that accumulate in the secretory cavities of young leaves of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*): Isolation and functional characterization of monoterpene and sesquiterpene synthase genes. *Plant Biotechnol*. 34: 17-28.

- Halbritter, D. A., D. S. Willett, J. M. Gordon, L. L. Stelinski, and J. C. Daniels. 2018. Behavioral evidence for host transitions in plant, plant parasite, and insect interactions. *Environ. Entomol.* 47: 646-653.
- Hu, Z., H. Zhang, P. Leng, J. Zhao, W. Wang, and S. Wang. 2013. The emission of floral scent from *Lilium* 'siberia' in response to light intensity and temperature. *Acta Physiol. Plant.* 35: 1691-1700.
- Huchelmann, A., M. Boutry, and C. Hachez. 2017. Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant Physiol.* 175: 6-22.
- James, D. G. 2003. Synthetic herbivore-induced plant volatiles as field attractants for beneficial insects. *Environ. Entomol.* 32: 977-982.
- Junior, S. B., P. H. Março, P. Valderrama, F. C. Damasceno, M. S. Aranda, C. A. Zini, E. B. Caramao, A. M. T. Melo, J. Teixeira Filho, and H. T. Godoy. 2015. Analysis of volatile compounds in *Capsicum* spp. by headspace solid-phase microextraction and GC × GC-TOFMS. *Anal. Methods.* 7: 521-529.
- Kim, H. J., J. H. Han, S. Kim, H. R. Lee, J. S. Shin, J. H. Kim, J. Cho, Y. H. Kim, H. J. Lee, B. D. Kim, and D. Choi. 2011. Trichome density of main stem is tightly linked to PepMoV resistance in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 122: 1051-1058.
- Kocsis, N., M. Amtmann, Z. Mednyanszky, and K. Korany. 2002. GC-MS investigation of the aroma compounds of hungarian red paprika (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food Compost. Anal.* 15:195-203.
- Lama, K., S. Alkalai-Tuvia, Y. Perzelan, and E. Fallik. 2016. Nutritional qualities and aroma volatiles of harvested red pepper fruits stored at suboptimal temperatures. *Sci. Hortic.* 213: 42-48.
- Latif, S., G. Chiapusio, and L. A. Weston. 2017. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. In *Advances in Botanical Research*. Pp. 19-54. Academic Press.

- Liu, H., J. Zheng, P. Liu, and F. Zeng. 2018. Pulverizing processes affect the chemical quality and thermal property of black, white, and green pepper (*Piper nigrum* L.). *J. Food Sci. Technol.* 55: 1-13.
- Lucas-Barbosa, D. 2016. Integrating studies on plant–pollinator and plant–herbivore interactions. *Trends Plant Sci.* 21: 125-133.
- Nayler, P. and M. C. Whiting. 1954. Researches on polyenes. Part II. The synthesis of cosmene. *J. Chem. Soc.* Pp.4006-4009.
- Mazida, M. M., M. M. Sallehand, and H. Osman. 2005. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annuum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *J. Food Compost. Anal.* 18: 427-437.
- Muñiz-Merino M., J. Cibrián-Tovar, C. Hidalgo-Moreno, N. Bautista-Martínez, H. Vaquera-Huerta y C. Aldama-Aguilera. 2014. Compuestos volátiles atraen al picudo (*Anthonomus eugenii* Cano) del chile (*Capsicum* spp.) y presentan sinergia con su feromona de agregación. *Agrociencia*, 48: 819-832.
- Murakami, Y., H. Iwabuchi, M. Horikawa, S. Mori, Y. Ohba, and H. Fukami. 2018. Isolation and identification of a volatile compound in Habanero pepper (*Capsicum chinense*). *J. Oleo Sci.* 67: 1219-1225.
- Popp, P., and A. Paschke. 1997. Solid phase microextraction of volatile organic compounds using carboxen-polydimethylsiloxane fibers. *Chromatographia.* 46: 419-424.
- Reidel, R.V.B., P. L. Cioni, L. Majo, and L. Pistelli. 2017. Evolution of volatile emission in *Rhus coriaria* organs during different stages of growth and evaluation of the essential oil composition. *Chem. Biodivers.* 14: 1-12.
- Rodríguez-Burruezo, A., H. Kollmannsberger, M. C. González-Mas, S. Nitz, and N. Fernando. 2010. "HS-SPME comparative analysis of genotypic diversity in the volatile

- fraction and aroma-contributing compounds of *Capsicum* fruits from the *Annuum–Chinense–Frutescens* complex." J. Agric. Food Chem. 58: 4388-4400.
- San, A. T., D. C. Joyce, P. J. Hofman, A. J. Macnish, R. I. Webb, N. J. Matovic, C. M. Williams, J. J. De Voss, S. H. Wong, and H. E. Smyth. 2017. Stable isotope dilution assay (SIDA) and HS-SPME-GCMS quantification of key aroma volatiles for fruit and sap of Australian mango cultivars. Food Chem. 221: 613-619.
- Sigma-Aldrich. 2018. Tenax[®] Porous Polymer Adsorbent. Consultado: octubre, 2018. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/11982?lang=es®ion=MX>
- Silva, J. B., C. S. Silva- Torres, M. C. B. Moraes, J. B. Torres, R. A. Laumann, and M. Borges. 2015. Interaction of *Anthonomus grandis* and cotton genotypes: biological and behavioral responses. Entomol. Exp. Appl. 156: 238-253.
- Silvis, I. C. J., P. A. Luning, N. Klose, M. Jansen, and S. M. van Ruth. 2019. Similarities and differences of the volatile profiles of six spices explored by Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry. Food Chem. 271: 318-327.
- Sosa-Moguel, O., J. A. Pino, G. Ayora-Talavera, E. Sauri-Duch, and L. Cuevas-Glory. 2017. Biological activities of volatile extracts from two varieties of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). I. J. Food Prop. 20: S3042-S3051.
- Sun, X. L., G. Wang, Y. Gao, X. Z. Zhang, Z. J. Xin, and Z. M. Chen. 2014. Volatiles emitted from tea plants infested by *Ectropis obliqua* larvae are attractive to conspecific Moths. J. Chem. Ecol. 40:1080-1089.
- Sun, X. L., G. C. Wang, Y. Gao, and Z. M. Chen. 2012. Screening and field evaluation of synthetic volatile blends attractive to adults of the tea weevil, *Mylocerinus aurolineatus*. Chemoecology. 22: 229-237.

- Szendrei, Z., A. Averill, H. Alborn, and C. Rodriguez-Saona. 2011. Identification and field evaluation of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Fecha de consulta: noviembre, 2018., en <http://www.pherobase.com>.
- Velázquez-González, J. C., Cibrián-Tovar, J., Hidalgo-Moreno, C., y Vásquez-Rojas, T. R. 2011. Validación del método de aireación dinámica para la captura de compuestos volátiles de *Capsicum* spp. *Rev. Latinoamericana de Química.* 39: 7-16.
- Wood, D. L. 1982. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 411-446.
- Wang, G., L. Tian, N. Aziz, P. Broun, X. Dai, J. He, A. King, P. X. Zhao, and R. A. Dixon. 2008. Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiol.* 148: 1254-1266.
- Yang, X., J. Zhao, J. Zheng, P. Leng, X. Li, Z. Hu, J. Liu, and X. Meng. 2016. Analysis of floral scent emitted from *Syringa* plants. *Journal Forestry Research.* 27: 273-281.
- Ye, M., N. Veyrat, H. Xu, L. Hu, T. C. Turlings, and M. Erb. 2018. An herbivore-induced plant volatile reduces parasitoid attraction by changing the smell of caterpillars. *Sci. Adv.* 4: 1-8.
- Zito, P., S. Guarino, E. Peri, M. Sajeva, and S. Colazza. 2013. Electrophysiological and behavioural responses of the housefly to “sweet” volatiles of the flowers of *Caralluma europaea* (Guss.) NE Br. *Arthropod-Plant Interact.* 7: 485-489.

CAPÍTULO II. ATRACCIÓN DE ADULTOS DE *Anthonomus eugenii* CON MEZCLAS DE COMPUESTOS VOLÁTILES SINTÉTICOS

RESUMEN

Durante la floración y desarrollo de frutos de *Capsicum* spp., se liberan COVs atractivos para algunos insectos que responden a las señales químicas como el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Esta plaga se alimenta de botones florales, flores y frutos en desarrollo y causa pérdidas parciales o totales, especialmente en los frutos, cuando no se detecta a tiempo. Esta investigación tuvo como objetivo, evaluar mezclas sintéticas y determinar al menos una con capacidad de atracción de adultos de *A. eugenii*. Se hicieron bioensayos por olfatometría tipo “Y”, se evaluó la respuesta de los insectos con 10 a 20 días de edad, a los tratamientos de botones florales (BF), flores (FL) y fruto (FR) de órganos frescos y extractos de BF, FL y FR obtenidos por aireación dinámica (AD) de los órganos frescos de *C. annuum* var. Poblano. También se probaron cuatro mezclas de los compuestos sintéticos (Z)- β -ocimeno, (Z)-3-hexenil acetato, terpinoleno, 2-isobutil-3-metoxipirazina y (Z)-3-hexenol). Los tratamientos de órganos frescos, seguido de los extractos generaron en machos y hembras un estímulo de atracción superior al 62.5%, en comparación con el testigo (T₁: aire). En la evaluación del T₁₀ (M3), los machos respondieron el 68.75% y hembras 62.75% en comparación con el resto de las mezclas. Este tratamiento estuvo compuesto por: (Z)- β -ocimeno (92.6%), (Z)-3-hexen-1-il-acetato (2.6%), terpinoleno (1.6%) y 2-isobutil-3-metoxipirazina (3.2%). Estos compuestos serán una buena base para desarrollar un atrayente sintético para la captura de adultos de *A. eugenii* junto con su feromona de agregación.

Palabras clave: *Capsicum* spp., kairomonas, atrayentes, picudo del chile.

ATTRACTION OF ADULTS OF *Anthonomus eugenii* WITH MIXTURES OF SYNTHETIC VOLATILE COMPOUNDS

ABSTRACT

During flowering and fruit development of *Capsicum* spp., VOCs are released which are attractive for some insects that respond to chemical signals, like the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano). This pest feeds on flower buds, flowers, and fruits in development and causes partial or total losses, especially in the fruits, when it is not detected in time. The objective of this research was to evaluate synthetic mixtures and to determine at least one with the capacity to attract adults of *A. eugenii*. Bioassays were made by olfactometry type “Y”; the response of insects with 10 to 20 days of age was evaluated to the treatments of flower buds (FB), flowers (FL), and fruit (FR) of fresh organs and extracts of BF, FL, and FR obtained by dynamic aeration (DA) of the fresh organs of *C. annuum* var. Poblano. Four mixtures of the synthetic compounds (*Z*)- β -ocimene, (*Z*)-3-hexen-1-yl-acetate, terpinolene, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, and (*Z*)-3-hexenol) were also tested. The treatments of fresh organs, followed by the extracts generated in males and females an attraction stimulus superior to 62.5%, in comparison with the control (T₁: air). In the evaluation of T₁₀ (M3), the males responded by 68.75% and females 62.75% compared to the rest of the mixtures. This treatment was composed of: (*Z*)- β -ocimene (92.6%), (*Z*)-3-hexen-1-yl-acetate (2.6%), terpinolene (1.6%), and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (3.2%). These compounds will be a good base to develop a synthetic attractant for the capture of adults of *A. eugenii* together with its aggregation pheromone.

Key words: *Capsicum* spp., Kairomones, attractants, pepper weevil.

2.1. INTRODUCCIÓN

Las kairomonas y feromonas son semioquímicos emitidos por las plantas e insectos, respectivamente (Wood, 1982), y representan un papel importante en la comunicación de los mismos (Reddy y Guerrero, 2004; Brezolin *et al.*, 2018). Por ejemplo, las kairomonas se liberan durante la etapa vegetativa y productiva de las plantas con el propósito de atraer insectos y ser polinizadas (Raguso, 2004), o hacer un llamado a parasitoides y depredadores para combatir un herbívoro beneficiado por los COVs como defensa (Kessler y Baldwin, 2001; Turlings y Wäckers, 2004).

En las plantas de *Capsicum* spp., se liberan COVs atractivos para el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) (Addesso *et al.*, 2011; Muñoz-Merino *et al.*, 2014; Seal y Martin, 2016). Esta respuesta comportamental de *A. eugenii* hacia su planta hospedera se debe a que de ellas obtienen alimento, condiciones de reproducción y desarrollo de su progenie, durante la producción de botones florales y frutos en desarrollo, causando pérdidas de hasta un 30 a 90% en la producción de chiles (Torres-Ruiz y Rodríguez-Leyva, 2012).

Los métodos de detección y control para el picudo del chile son los insecticidas, el uso de organismos benéficos y la feromona del insecto (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2012; Eller *et al.*, 1994), estos dos últimos son amigables con el ambiente (Gregg *et al.*, 2018). El uso de la feromona más mezclas sintéticas son aplicadas en muchos insectos plaga; por ejemplo, la feromona del picudo rojo de la palmera (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver) (Navarro-Llopis *et al.*, 2018), el picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus* Germar) (Abagale *et al.*, 2018) y en el picudo del pseudotallo del plátano (*Odoiporus longicollis* Olivier). En este último se empleó la feromona del insecto más la mezcla sintética de 9-Octadecenal, ácido

hexadecanoico, ácido nonanal tetradecanoico acid, etyl-4-etoxi benzoato, 2-Decenal y β -Ocimeno) de su plantas hospedera (Alagesan *et al.*, 2018).

Por otra parte, la feromona de agregación del picudo del chile, ya comerciable, junto con las kairomonas de la planta de *Capsicum* spp., pueden mejorar su detección, control, prevención y disminuir las pérdidas que ocasiona cada año esta plaga. Sin embargo, aún se desconoce las concentraciones de mezclas que permitan ser probados en campos antes de la floración y después la cosecha. Para ello se evaluó en etapa de laboratorio la atracción de adultos del picudo a mezclas de COVs sintéticos similares a los emitidos por los órganos de botones florales, flores y frutos de *C. annuum* var. Poblano. El objetivo de este estudio fue evaluar mezclas sintéticas y determinar al menos una con capacidad de atracción en los adultos de *Anthonomus eugenii* Cano.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Colecta y cría de *Anthonomus eugenii*

Se realizaron colectas de chiles infestados con larvas de *A. eugenii* de las variedades serrano y de árbol (*Capsicum* sp.) en Villa de Arista, San Luis Potosí, México (23°00'53.5"N 100°00'30.8"O) y Coatsonco, Huautla, Hidalgo, México (20°58'02.5"N 98°17'55.7"O). La emergencia de los adultos se depositaron en frascos de 3 L en condiciones controladas (24 ± 3°C y fotoperiodo de 12:12, HR 60%). Los picudos se alimentaron dos veces por semana con flores y frutos frescos de chile en desarrollo de la var. Poblano.

2.2.2. Sexado de *Anthonomus eugenii*

Previo a los bioensayos, los machos y hembras con 10 a 20 días de edad fueron sexados con base en el mucrón metatibial (Eller, 1995). A los insectos no se les suministró alimento ni agua durante 18 h (Eller *et al.*, 1994).

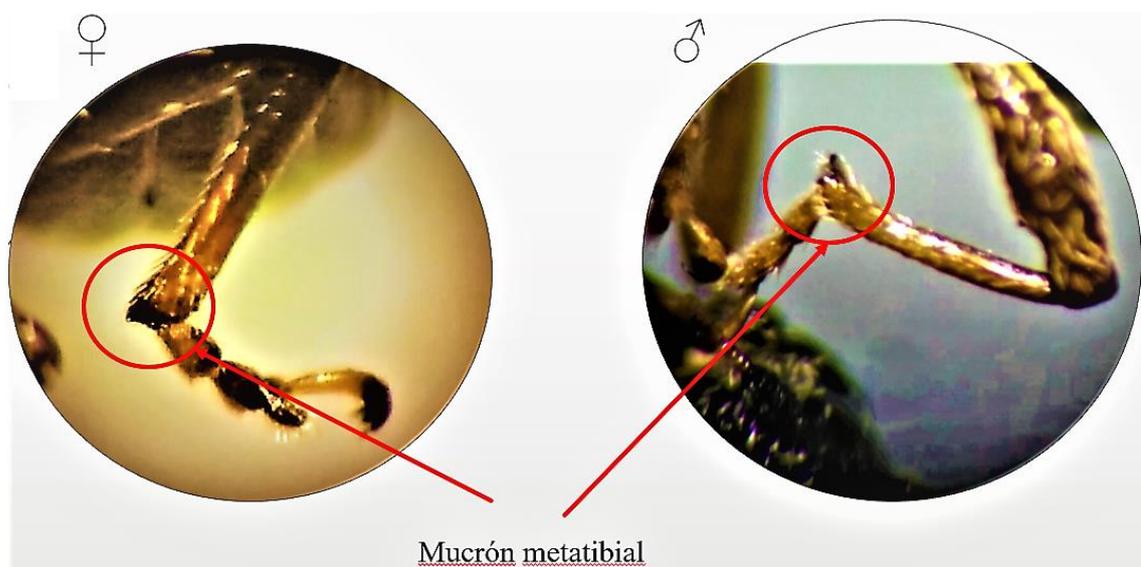


Figura 16. Mucrón metatibial de hembras (♀, izquierda) y machos (♂, derecha) de *A. eugenii*.

2.2.3. Pruebas de atracción en adultos de *A. eugenii*

Los bioensayos se realizaron en un olfatómetro tipo “Y” (Pyrex®). En el experimento se evaluó la respuesta de adultos machos y hembras de *A. eugenii*, copuladas y no copuladas, con una edad de 10 a 20 días, sexados. La distribución de los tratamientos en los brazos del olfatómetro se menciona en el Cuadro 1. Para cada tratamiento se utilizó 20 insectos por sexo que eligieron un brazo del olfatómetro. El tiempo de actividad de respuesta asignado por picudo fue de 5 min, los que no respondieron fueron reemplazados. Los experimentos se realizaron de las 10:00 a 18:00 h en condiciones controladas (luz fluorescente de 32 W, 28 ±2°C y HR del 60%), similares a los descritos por Adesso *et al.* (2011) y Hassemer *et al.* (2016), con algunas modificaciones.

Cuadro 3. Distribución de tratamientos para evaluar la atracción de *A. eugenii*

Trat.	Brazo A	Brazo B
T ₁	Aire	Aire
T ₂	Botón floral (BF)	Aire
T ₃	Flor (FL)	Aire
T ₄	Fruto (FR)	Aire
T ₅	Extractos de botón floral (EBF)	Aire
T ₆	Extractos de flores (EFL)	Aire
T ₇	Extractos de frutos (EFR)	Aire
T ₈	M1: 2-isobutil-3-metoxipirazina (66.7%) + terpinoleno (33.3%).	Aire
T ₉	M2: (Z)-3-hexenil acetato (2.7%) + (Z)-β-ocimeno (97.3%)	Aire
T ₁₀	M3: M1 (3.2% + 1.6%) + M2 (2.6% + 92.6%)	Aire
T ₁₁	M3 (3.17% + 1.59% + 2.54% + 91.43%) + (Z)-3-hexenil (1.27%)	Aire

Las mezclas (M) representadas en porcentajes en diferentes concentraciones fueron diluidos en hexano HPLC (J.K. Baker®), n=4.

Para los tratamientos de extractos de BF, FL, FR y de las mezclas sintéticas (T₈ a T₁₁) fueron aplicados 10 µL sobre un papel filtro (2 cm²; Whatman® No. 2) y depositados en el brazo derecho del olfatómetro, por separado, y en la entrada principal del sistema se ubicó un picudo. Durante las pruebas el olfatómetro se rotó a partir de la tercera repetición y cambio del papel filtro con el extracto o la mezcla para evitar la predisposición de los insectos en responder en un solo brazo y volatilidad de los compuestos, respectivamente.

2.2.3. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizaron con el programa SAS 9.0 Institute Inc., 2002, con una bondad de ajuste en regresión logística, prueba χ^2 : $P \leq 0.05$, donde se determinó si la proporción observada de insectos que entraban a cada cámara del olfatómetro fue diferente de la esperada, bajo la hipótesis de que al menos una mezcla generó una respuesta positiva.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Respuesta comportamental de machos de *A. eugenii*

Los primeros bioensayos en machos a los tratamientos T₁ a T₁₁ con estímulos se observan en la Figura 17. Para el T₁ (testigo), las respuestas de los insectos en ambos brazos del olfatómetro, la ausencia de algún estímulo, tanto machos como hembras no mostraron preferencia en comparación con los tratamientos con estímulos (Figura 17, 18: A).

En el T₃ (FL) la respuesta de los machos fue del 82.5% ($\chi^2= 17.63$, P= 0.0001), seguido del T₂ (BF) con 80% ($\chi^2= 14.65$, P= 0.0001) y 76.25% ($\chi^2= 10.81$, P= 0.0010) para el T₄ (FR) (Figura 17: A). Las respuestas indicaron que los estímulos volátiles están presentes en cada órgano e influyeron de forma similar en los insectos, aunque en flores, la respuesta de elección en porcentaje fue mejor. Lo anterior, se atribuye a los volátiles en los machos como señales para localizar áreas de alimentación (Hansson y Wicher, 2016).

En los tratamientos T₅ (EBF) y T₇ (EFR) de extractos por AD de órganos del chile var. Poblano, los machos respondieron con el 73.75% ($\chi^2= 1.24$, P= 0.2653) y 60% ($\chi^2= 8.64$, P= 0.0033), respectivamente (Figura 17, B), mejores al T₆ (FL): 58.75% ($\chi^2= 0.90$, P= 0.3404). En este último la respuesta de elección de los insectos decayó considerablemente, y probablemente se debió a la fácil volatilización de los compuestos en el ambiente (temperatura, aire y humedad) (Rodríguez-Currea *et al.*, 2017). A pesar de estos factores los insectos lograron percibir las señales químicas de los extractos.

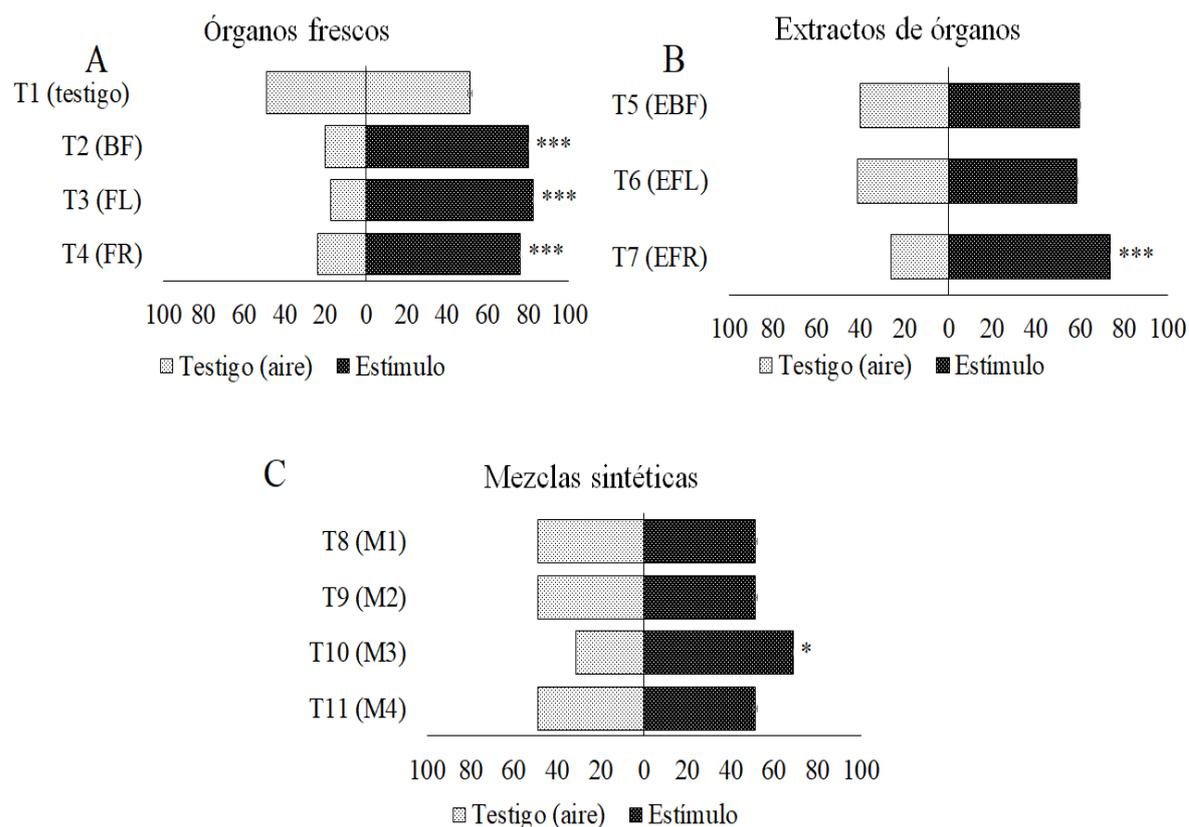


Figura 17. Respuesta de atracción de machos de *A. eugenii* a los tratamientos. BF, botón floral; FL, flor; FR, fruto; E, extracto; M, mezcla. T₈: M1 (2-isobutil-3-metoxipirazina+ terpinoleno); T₉: M2 ((Z)-3-hexenil acetato + (Z)-β-ocimeno); T₁₀: M3 (T₈+T₉); T₁₁: M4 (T₁₀+ (Z)-3-hexenol). Los datos son representados como respuestas en porcentajes. χ^2 : *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, (n=4).

La evaluación de los tratamientos con mezclas sintéticas el T₈ (M1), T₉ (M2) y T₁₁ (M4), las respuestas de los machos fueron inferiores al 51.25% ($\chi^2=0$, P=1), en comparación con el T₁₀ (M3) con un valor del 68.75% ($\chi^2=5.10$, P=0.0239) (Figura 17, C). Lo anterior demostró que la mezcla tres constituida por cuatro compuestos favorecen la interacción entre la planta y el insecto (Hao *et al.*, 2018).

2.3.2. Respuesta comportamental de hembras de *A. eugenii*

La evaluación de los tratamientos T₂ (BF), T₃ (FL) y T₄ (FR) fueron del 78.75% ($\chi^2= 15.57$, P= 0.0001), 86.25% ($\chi^2= 25.64$, P= 0.0001) y 70% ($\chi^2= 7.48$, P= 0.0062), respectivamente (Figura 18, A). En los cuales las flores generaron un incremento en la respuesta de elección en los insectos, caracterizándola como el principal órgano con mayor emisión de COVs atractivos para el insecto. Además, las flores cumplen funciones biológicas importantes en los insectos como su desarrollo y reproducción al alimentarse de ellas, a pesar de los daños que causan en las plantas (Hilker y Fatouros, 2015; Dobson, 2017; Xu y Turlings, 2017). Lo anterior se observa en cultivos de *Capsicum* spp., y su hospedante *A. eugenii* (Addesso y McAuslane, 2009).

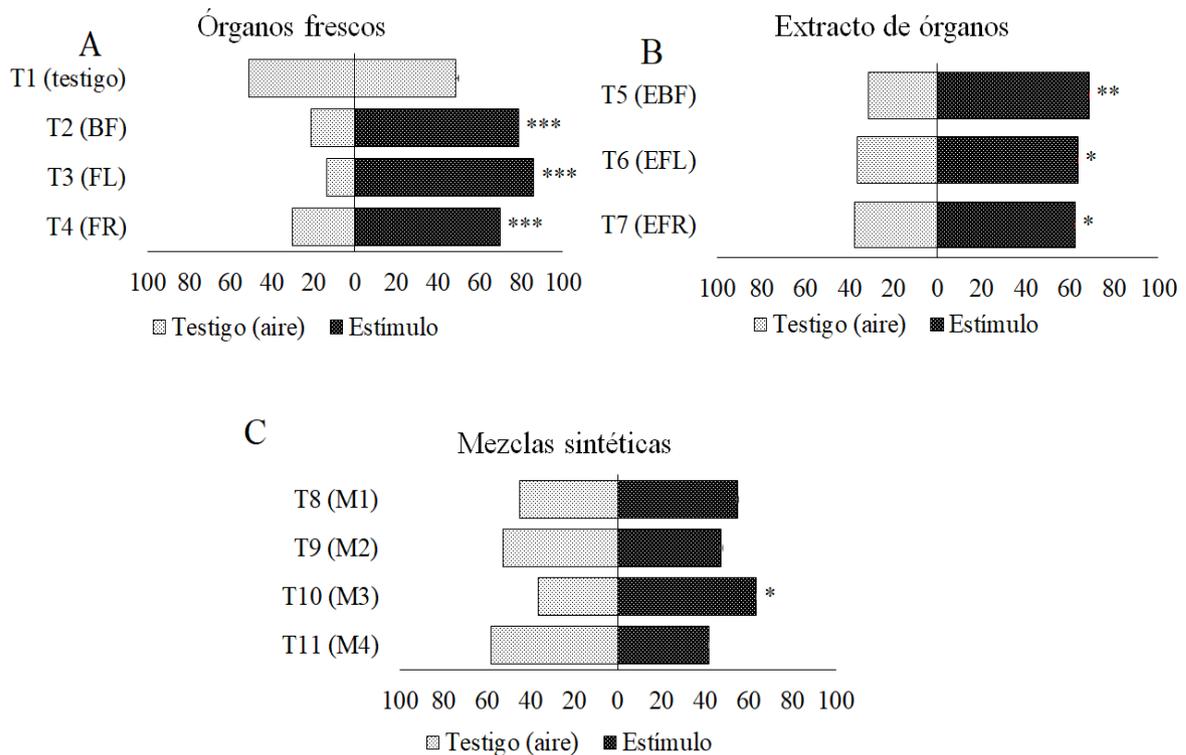


Figura 18. Respuesta de atracción de hembras de *A. eugenii* a los tratamientos.

BF, botón floral; FL, flor; FR, fruto; E, extracto; M, mezcla. T₈: M1 (2-isobutil-3-metoxipirazina+ terpinoleno); T₉: M2 ((Z)-3-hexenil acetato + (Z)- β -ocimeno); T₁₀: M3 (T₈+T₉); T₁₁: M4 (T₁₀+ (Z)-3-hexenol). Los datos son representados como respuestas en porcentajes. $\chi^2=$ *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, (n=4).

La evaluación de los extractos por AD el T₅ (BF) frente a los T₆ (FL) y T₇ (FR), la respuesta de las hembras fue del 68.75% ($\chi^2= 6.60$, P= 0.0102), seguido de 63.75% ($\chi^2= 3.65$, P= 0.0558) y 62.5% ($\chi^2= 3.06$, P= 0.0801), respectivamente. Lo anterior demostró los COVs de los extractos de AD de botones florales, estuvieron presentes en mayor tiempo durante su evaluación que el resto de los tratamientos de extractos. A pesar de las diferencias de respuestas de elección las hembras lograron percibir los volátiles en los tres tratamientos.

La evaluación de las mezclas sintéticas de los T₈ (M1), T₉ (M2), T₁₀ (M3) y T₁₁ (M4); las respuestas de las hembras al T₁₀ (M3) fue del 63.75% ($\chi^2=3.65$, P=0.0558) mejor que el resto de los tratamientos con mezclas (Figura 18, C). Similarmente a los resultados obtenidos en los machos. Lo anterior se debió por tener una mezcla de dos compuestos en el T₈: 55% ($\chi^2= 0.62$, P=0.4289) y T₉: 47.50% ($\chi^2=0.025$, P=0.8743), en consecuencia una respuesta de elección inferior en ambos sexos. Esto sugiere que el tener una mezcla incompleta de los compuestos no hay un estímulo químico positivo.

Por otra parte, la adición de (Z)-3-hexenol en el T₁₀ la respuesta de los organismos fue inferior a 41.25% ($\chi^2=0.90$, P=0.3404), representando el T₁₁ (M4) como una mezcla no atractiva para hembras y machos de *A. eugenii* (Figura 17, 18: C).

Por lo tanto, el T₁₀ (M3) compuesta por (Z)- β -ocimeno, (Z)-3-hexenil acetato, 2-isobutil-3-metoxipirazina y terpinoleno, cuantificados en *C. annuum* var. Poblano, son las principales kairomonas que generan un estímulo de atracción positiva en los adultos de *A. eugenii* y daños irreversibles por alimentación de los picudos en los cultivos. Por ejemplo; Szendrei *et al.* (2011) reportaron que el (Z)- β -ocimeno y el (Z)-3-hexenil acetato actúan como atrayentes para los adultos de *Anthonomus musculus* (Say), y es evidente que ambas especies del mismo género comparten una atracción de estos volátiles emitidas por sus plantas hospederas.

También fueron reportados por Muñiz-Merino *et al.* (2014), al evaluar atrayentes para este insecto en concentraciones diferentes a esta investigación. Además, la evaluación de los compuestos en las mezclas estuvieron en función a su cuantificación en los órganos de *C. annuum* var. Poblano.

Se necesita hacer nuevas pruebas biológicas en los que se incluyan el cosmeno y β -elemeno para determinar como posibles atrayentes que mejoren la atracción de los adultos de *A. eugenii*. La mezcla del T₁₀ junto con la feromona de agregación del picudo pudiera mejorar la captura de este insecto en trampas como se observa en *Anthonomus rubi* (Herbst) o *Lygus rugulipennis* (Poppius) al combinar las kairomonas de su planta hospedera más sus feromonas para su trampeo en cultivos de fresas (Baroffio *et al.*, 2018); las kairomonas del tallo del plátano más la feromona del picudo *Odoiporus longicollis* Oliver (Alagesan *et al.*, 2018), entre otros. Es importante señalar que ambos atrayentes (kairomonas y feromona) para el picudo del chile deben utilizarse en los campos de producción antes de la siembra y antes de la floración de *Capsicum* spp., para evitar la competencia de los COVs producidos por los órganos de la planta de chile.

2.4. CONCLUSIONES

Se determinó el T₁₀ (M3) como la mejor mezcla que generó una respuesta de atracción positiva del 68.75% en machos y 63.75% en hembras de *Anthonomus eugeni* Cano. Esta mezcla estuvo compuesta por: (Z)- β -ocimeno (92.6%), (Z)-3-hexenil acetato (2.6%), terpinoleno (1.6%) y 2-isobutil-3-metoxipirazina (3.2%).

2.5. LITERATURA CONSULTADA

- Abagale, S. A., C. M. Woodcock, K. Chamberlain, S. Osafo- Acquah, H. van Emden, M. A. Birkett, J. A. Pickett, and H. Braimah. 2018. Attractiveness of host banana leaf materials to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* in Ghana for development of field management strategies. *Pest Manag. Sci.* 1-7.
- 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. Alborn. 2011. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Alagesan, A., G. Tharani, B. Padmanaban, S. Sivaramakrishnan, and S. Manivannan. 2018. Kairomones from highly susceptible host to control banana pseudostem weevil, *Odoiporus longicollis* (olivier). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16: 655-662.
- Baroffio, C. A., L. Sigsgaard, E. J. Ahrenfeldt, A. K. Borg-Karlson, S. A. Bruun, J. V. Cross, M. T. Fountain, D. Hall, R. Mozuraitis, B. Ralle, and N. Trandem. 2018. Combining plant volatiles and pheromones to catch two insect pests in the same trap: Examples from two berry crops. *Crop Prot.* 109: 1-8.
- Brezolin, A. N., J. Martinazzo, D. K. Muenchen, A. M. de Cezaro, A. A. Rigo, C. Steffens, J. Steffens, M. C. Blassioli-Moraes, and M. Borges. 2018. Tools for detecting insect semiochemicals: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 1-18.
- Dobson, H. E. 2017. Floral volatiles in insect biology. In *Insect-Plant Interactions (1993)*: 63-98. CRC Press.
- 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.* 20: 1537-1555.
- Eller, F. J. 1995. A previously unknown sexual character for the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 78: 180-183
- Gregg, P. C., A. P. Del Socorro, and P. J. Landolt. 2018. Advances in attract-and-kill for agricultural pests: beyond pheromones. *Annu. Rev. Entomol.* 63: 453-470.
- Hansson, B., and D. Wicher. 2016. Chemical ecology in insects. *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*. Pp. 29-45.
- Hao, C. Y., R. Fan, X. W. Qin, L. S. Hu, L. H. Tan, F. Xu, and B. D. Wu. 2018. Characterization of volatile compounds in ten Piper species cultivated in Hainan Island, South China. *Int. J. Food Prop.* 21: 633-644.
- Hassemer, M. J., J. Sant'Ana, M. Borges, D. Withall, J. A. Pickett, M. W. M. de Oliveira, R. A. Laumann, M. A. Birkett, and M. C. Blassioli-Moraes. Revisiting the male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): identification of a six-component pheromone from a Brazilian population. *J. Agric. Food Chem.* 64: 6809-6818.
- Hilker, M., and N. E. Fatouros. 2015. Plant responses to insect egg deposition. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 493-515.
- Kessler, A. and T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science.* 291: 2141-2144.
- Muñiz-Merino M., J. Cibrián-Tovar, C. Hidalgo-Moreno, N. Bautista-Martínez, H. Vaquera-Huerta y C. Aldama-Aguilera. 2014. Compuestos volátiles atraen al picudo (*Anthonomus eugenii* Cano) del Chile (*Capsicum* spp.) y presentan sinergia con su feromona de agregación. *Agrociencia*, 48: 819-832.

- Navarro-Llopis, V., J. Primo, and S. Vacas. 2018. Improvements in *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) Trapping Systems. *J. Econ. Entomol.* 111: 1298-1305.
- Raguso, R. A. 2004. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. *Advances in Insect Chemical Ecology*, ed. R. T. Cardé and J. G. Millar. Published by Cambridge University Press. © Cambridge University Press 2004. pp 151-178.
- Reddy, G. V. and A. Guerrero. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Sci.* 9:253-261.
- Rodríguez-Leyva, E., J. R. Lomeli-Flores, J. M. Valdez-Carrasco, R. W. Jones, and P. A. Stansly. 2012. New Records of species and locations of parasitoids of the pepper weevil in Mexico. *Southwest. Entomol.* 37: 73-83.
- Rodríguez-Curra, H. J., J. F. Marulanda-López, and C. Amaya. 2017. *Rhynchophorus palmarum* L. 1758 (Coleoptera: Curculionidae) management methodology based on kairomones, pheromones and semiochemicals in plantations chontaduro [*Bactris gasipaes* (Arecales: Arecaceae)] IN RIOSUCIO, CALDAS. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 21: 59-67.
- SAS Institute Inc. 2002. User's guide, version 9.0. Cary, NC. USA.
- Seal, D. R. and C. G. Martin. 2016. Pepper Weevil (Coleoptera: Curculionidae) preferences for specific pepper cultivars, plant parts, fruit colors, fruit sizes, and timing. *Insects.* 7: 9.
- Szendrei, Z., A. Averill, H. Alborn, and C. Rodriguez-Saona. 2011. Identification and Field Evaluation of Attractants for the Cranberry Weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- Torres-Ruiz, A. y E. Rodríguez-Leyva. 2012. Guía para el manejo integrado de plagas del pimiento bajo invernadero, con énfasis en el picudo del chile. *Koppert México.* 1-48 p.

- Turlings, C. J., and F. Wäckers. 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Advances in Insect Chemical Ecology*, ed. R. T. Cardé and J. G. Millar. Published by Cambridge University Press. © Cambridge University Press 2004. Pp: 21-75.
- Wood, D.L. 1982. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annu. Rev. Entomol.* 27: 411-446.
- Xu, H., and T. C. Turlings. 2017. Plant volatiles as mate-finding cues for insects. *Trends Plant Sci.* 23: 100-111.

CONCLUSIONES GENERALES

Se cuantificaron los compuestos con concentraciones que oscilan para (Z)- β -ocimeno 49.24 $\mu\text{g/g}$ a 283.84 $\mu\text{g/g}$, (Z)-3-hexenil acetato 1.54 $\mu\text{g/g}$ a 4.5 $\mu\text{g/g}$, terpinoleno 0.18 $\mu\text{g/g}$ a 0.87 $\mu\text{g/g}$ y 2-isobutil-3-metoxipirazina 0.44 $\mu\text{g/g}$ en los órganos de *Capsicum annuum* var. Poblano.

Se determinó el T₁₀ (M3) como la mejor mezcla que generó una respuesta comportamental positiva del 68.75% en machos y 63.75% en hembras de *A. eugenii*.

Estos compuestos serán una buena base para desarrollar un atrayente sintético para la captura de adultos de *Anthonomus eugenii* junto con su feromona de agregación.