

RESPUESTAS DEL INSECTO MAX (*SCYPHOPHORUS ACUPUNCTATUS* GYLLENHAL [COLEOPTERA: CURCULIONIDAE]) HACIA ALGUNOS COMPUESTOS ATRAYENTES DEL HENEQUÉN

¹Silvia VALDÉS-RODRÍGUEZ, ²José Luis RAMÍREZ-CHOZA,
³Jorge REYES-LÓPEZ y ¹Alejandro BLANCO-LABRA

¹ Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN-Unidad Irapuato.
Apdo. postal 629, 36500. Irapuato, Guanajuato, MÉXICO. svaldes@ira.cinvestav.mx

² INIFAP. Edificio Sta. Lucía calle 55x62. Depto 1. Mérida, Yucatán. MÉXICO

³ Laboratorio de Tecnología Ambiental y Especialidades Químicas. TAMEQSA.
Cerrada 5 de Mayo 295-Bis. La Hera Iztapalapa. CP 09720. MÉXICO D.F.

RESUMEN

El max *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal 1838 (Coleoptera: Curculionidae) es una de las plagas más importante en agaves cultivados, produciendo daños severos a las hojas de las plantas y pérdidas de rendimiento hasta de 40% en el Estado de Yucatán. En estudios previos se demostró el efecto atrayente que ejercen las hojas de henequén sobre el insecto adulto de *S. acupunctatus* y el control efectivo que se logra de esta plaga usando hojas de henequén tratadas con insecticidas comunes. Por lo tanto, en el presente trabajo se llevó a cabo la identificación de los compuestos responsables de la actividad atrayente del henequén hacia el insecto *S. acupunctatus*.

Fragmentos de hojas de henequén se sometieron a una destilación por arrastre con vapor y el destilado se extrajo con diferentes solventes orgánicos. Se realizaron bioensayos de elección libre para determinar la actividad atrayente de cada uno de los extractos obtenidos, hacia el insecto *S. acupunctatus*, utilizando grupos de insectos separados por sexo, o bien tomados al azar. El análisis estadístico de estos tratamientos mostró que existían diferencias significativas entre los diferentes extractos probados. Los extractos con mayor actividad atrayente se analizaron por CG-EM pudiéndose identificar 5 compuestos en común: 4-etil cumeno, p-metoxi-etil-benceno, 1-metil-4-(1-metil etil)-ciclohexanol, p-menta-1,5-dien-8-ol y butirofenona. Considerando que estos compuestos están disponibles en forma comercial, se plantea la posibilidad de utilizarlos para lograr un control efectivo de esta plaga en la zona henequenera.

Palabras Claves: Atrayentes de insectos, Henequén, *Scyphophorus acupunctatus*.

ABSTRACT

Scyphophorus acupunctatus Gyllenhal 1838 (Coleoptera: Curculionidae) is one of the most important pests of cultivated agave, causing severe damage to the leaves of the plant. Yield losses up to 40% have been reported due to this insect. Previous studies have shown the attractive effect of henequen leaves towards the insect *S. acupunctatus* and the effective control of this pest using henequen leaves treated with common insecticides. Therefore, this study was undertaken to identify the compounds responsible for the strong attraction towards the insect *S. acupunctatus*.

Henequen leaves were steam distilled and subsequently extracted with different organic solvents. Free choice bioassays were conducted to determine the attractive activity of each extract towards this insect, using groups of insects separated on the basis of their sex, or else, taken at random. Statistical analysis showed significant differences among the different extracts tested. The five main compounds from the most active extracts determined by GC-MS were: 4-ethyl cumene, p-methoxy-ethyl benzene, 1(methyl 4-(1-methyl ethyl) cyclohexanol, p-mentha-1,5-dien-8-ol and butirofenone. Since these compounds are commercially available, it raises the possibility of using them in the control of this pest.

Key Words: Attractants, Henequen, *Scyphophorus acupunctatus*.

INTRODUCCIÓN

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) representa una importante alternativa para el aprovechamiento de suelos en zonas áridas y calcáreas (Otero 1991). El henequén es una especie de gran importancia socioeconómica en el Estado de Yucatán, México, donde se cultiva para la obtención de fibra dura. La fibra de henequén ha sido utilizada durante siglos para la elaboración de hamacas, cuerdas para fines agrícolas, bolsas y tapetes (Peniche 1985). Actualmente, hay una gran cantidad de usos para el henequén, algunos de los cuales son irremplazables, por lo que su futuro no corre un peligro inminente (Nelson 1998).

Hoy en día se estima que la producción de henequén es de aproximadamente 25,000 toneladas por año (Eastmond et al. 2000). Sin embargo, año con año los rendimientos han disminuido, debido entre otras causas a los serios problemas fitosanitarios que existen en la zona henequenera (Quijano-Ramayo et al. 2002). El insecto *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal 1838 (Coleoptera: Curculionidae) conocido como "max" representa una de las principales plagas que atacan al henequén (Halffter 1957). Los daños que provocan en la planta pueden ser de gran magnitud, desmeritando la cantidad y la calidad de la fibra. Sin embargo, los daños más severos los causa en la parte central de la planta, produciendo perforaciones profundas que afectan el crecimiento y turgencia de la planta. Se ha documentado que esta plaga produce pérdidas hasta del 40% de la producción en el Estado de Yucatán (Ramírez-Choza 1978). Para el control de esta plaga se ha recurrido al uso de insecticidas comunes, sin embargo, su control no ha sido exitoso debido a que las larvas e insectos adultos se alojan en tejidos profundos, siendo poca o casi nula la cantidad de insecticida que penetra hasta el sitio en que se alojan.

Como sabemos, las kairomonas son sustancias volátiles de la planta hospedera, que actúan interespecíficamente con el insecto. Se han reportado diversas experiencias en casos de atrayentes con Curculionidos, entre ellos resalta el caso de uno de los picudos de la palma, perteneciente a la familia *Rhynchophorinae* (Coleoptera: Curculionidae) (*Rhynchophorus* spp., *Dynamis borassi*), de los cuales, las hembras son atraídas por las kairomonas de la planta y depositan entre 30 a 400 huevos en tejido dañado de la palma, tanto de la palma estresada como de la sana (Weissling & Giblin-Davis 1994). A medida que el daño producido por estos insectos se acumula, se genera la fermentación y la mayor producción de volátiles, haciendo al hospedero más apetitoso para otros insectos, aunque se ha reportado también que algunos insectos prefieren el tejido fresco al fermentado (Hagley 1965).

En el caso del henequén, hace algún tiempo se planteó la posibilidad de controlar esta plaga con el uso de atrayentes naturales, en combinación con insecticidas comerciales, ya que se encontró que las hojas de henequén ejercían un importante efecto atrayente sobre este insecto. Experimentos de campo mostraron que fragmentos de hojas tratadas con insecticidas permitían un control efectivo de esta plaga, abatiendo considerablemente la dosis de insecticida requerida (Ramírez-Choza 1978). Sin embargo, los altos niveles de temperatura y humedad de la región en la que crecen estos agaves, producen una rápida descomposición del tejido, lo que limita esta posibilidad. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se planteó la identificación de los compuestos que están determinando la

actividad atrayente de las hojas de henequén hacia este insecto, los cuales podrán ser usados sin que afecte la descomposición del tejido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las hojas de henequén y los cultivos de *S. acupunctatus* fueron proporcionadas por el INIFAP-Yucatán. Los insectos se propagaron y mantuvieron en el laboratorio, utilizando hojas de henequén. Los solventes utilizados fueron grado reactivo obtenidos de J.T. Baker®.

Obtención de extractos de hojas de henequén: Las bases de las hojas de henequén se cortaron en pequeños fragmentos y se sometieron a una destilación por arrastre con vapor a 35 °C. El destilado obtenido se extrajo con 400 ml de diferentes solventes orgánicos (pentano, hexano, diclorometano y acetato de etilo) mantenidos a 4 °C. Estos extractos se concentraron, reduciendo su volumen a 40 ml., en un sistema de destilación provisto con una trampa, conteniendo 8 ml del solvente correspondiente frío, obteniéndose un total de 21 extractos, los cuales se guardaron en refrigeración para ser usados posteriormente.

Análisis por cromatografía de gases: Los extractos obtenidos se analizaron en un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3700 provisto con una columna de FFAP-10% en cromosorb w (d. i. 1/8" x 6 ft). El programa de temperatura empleado fue de 60 a 160° C, calentando 4 °C/min. La temperatura del inyector fue de 200 °C, se utilizó un detector FID a 200 °C con un flujo de nitrógeno de 25 ml/min.

Bioensayos: Con los 21 extractos obtenidos con los solventes orgánicos, 2 destilados y 3 fracciones acuosas obtenidas después de las extracciones, se realizaron bioensayos de libre elección con insectos adultos de *S. Acupunctatus*. Para ello los 26 extractos fueron agrupados en series de 3, por lo que se formaron 9 grupos. Cada grupo se probó 4 veces poniendo cada vez 50 insectos en la siguiente forma: a) 50 machos, b) 50 hembras, c) 25 machos y 25 hembras y d) 50 insectos tomados al azar. Todos los insectos empleados fueron de edad desconocida y se usó un grupo diferente de insectos en cada repetición, de tal manera que ningún insecto fue utilizado en más de una ocasión por día. Los insectos se liberaban colocándolos en el centro de una charola de madera de 75 cm de diámetro, cubierta con suelo, la cual tenía en la periferia 4 discos para colocar las muestras de manera equidistante. En cada disco se colocó un algodón impregnado con cada uno de los extractos (0.5 ml) y como control se incluyó un algodón impregnado con el solvente respectivo según el caso. Estos ensayos se realizaron en la oscuridad y en todos los casos se usó un diseño completamente al azar con 8 repeticiones (en tiempo), haciéndose en esta forma 8 lecturas a intervalos de 10 minutos.

Análisis estadístico: Con los resultados obtenidos en los bioensayos se efectuó un análisis de varianza bifactorial. La comparación de medias contra el testigo se realizó por el método Student-Newman-Keuls, para la comparación múltiple de medias se realizó la prueba de Tukey. Para todo lo anterior se utilizaron programas del Paquete de diseños experimentales (Olivares Saéñz 1994) a una $p < 0.05$.

Análisis CG-EM: Los extractos que mostraron mayor actividad atrayente se analizaron, utilizando un cromatógrafo de gases Hewlet Packard 5840-A, provisto con una columna

capilar de 25 m SP 2100 Carbowax 20M desactivada, y acoplado a un espectrómetro de masas de resolución normal, obteniendo los espectros a 70 eV.

RESULTADOS

Los compuestos volátiles presente en las hojas de henequén se obtuvieron mediante una destilación por arrastre con vapor a baja temperatura y se fraccionaron con el uso de diferentes solventes orgánicos. Los diferentes extractos obtenidos se utilizaron en los bioensayos de elección libre, para determinar el efecto atrayente que ejercían sobre insectos adultos de *S. acupunctatus*, separados en grupos de diferente sexo (hembras, machos, mixto [hembras y machos] y tomados al azar). De acuerdo a la prueba de ANOVA se encontró un efecto altamente significativo en los extractos ($F_{26, 728} = 71.7$; $p < 0.01$), en el sexo de los grupos de insectos probados ($F_{3, 728} = 13.06$; $p < 0.01$) y en la interacción extracto-sexo ($F_{75, 728} = 13.06$; $p < 0.01$).

En la figura 1 se muestra el número de insectos atraídos por los destilados D1 y D2 que representan las fracciones iniciales a partir de las cuales se realizó el fraccionamiento, mostrando una alta actividad atrayente y reproducible.

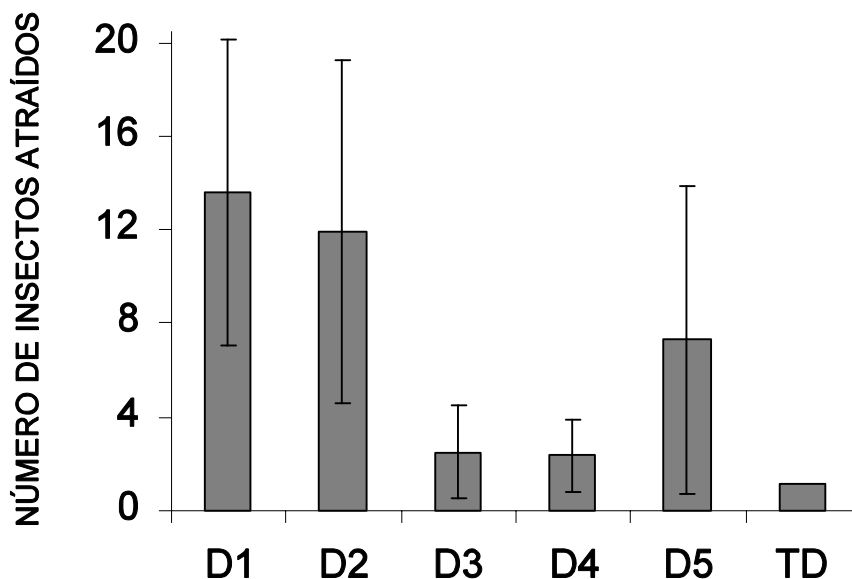


Figura 1

Número de insectos atraídos por 2 de los destilados obtenidos por arrastre de vapor de las hojas de henequén. D1 y D2 corresponden a los destilados originales antes de realizar cualquier extracción. D3, D4 y D5 corresponden a las fracciones acuosas resultantes después de extraer con pentano, hexano y acetato de etilo respectivamente. T corresponde al testigo de agua incluido en los bioensayos.

Las fracciones acuosas resultantes después de la extracción con pentano y hexano denominadas D3 y D4 respectivamente, no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo, de acuerdo a la prueba de Student-Newman-Keuls a una $p > 0.05$., mientras que la fracción acuosa resultante después de la extracción con acetato de etilo D5, atrajo un número significativo de insectos. Estos resultados sugieren que los solventes no polares (pentano y hexano) permitieron una extracción más eficiente de los compuestos responsables de la actividad atrayente.

En la figura 2 se muestra el número de insectos atraídos por los extractos originales de: pentano (P1), hexano obtenido a temperatura ambiente (H1), y a 4 °C (H2), diclorometano (C3), y acetato de etilo obtenido a temperatura ambiente (A1) y a 4 °C (A2) encontrándose entre estos diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ($w = 2.29$, $p < 0.05$). El extracto P1 atrajo mayor número de insectos, después le siguió H2, no encontrándose diferencias entre H1 y C3. Los extractos de acetato de etilo atrajeron menor número de insectos, incluso A2 no mostró diferencias significativa con el testigo.

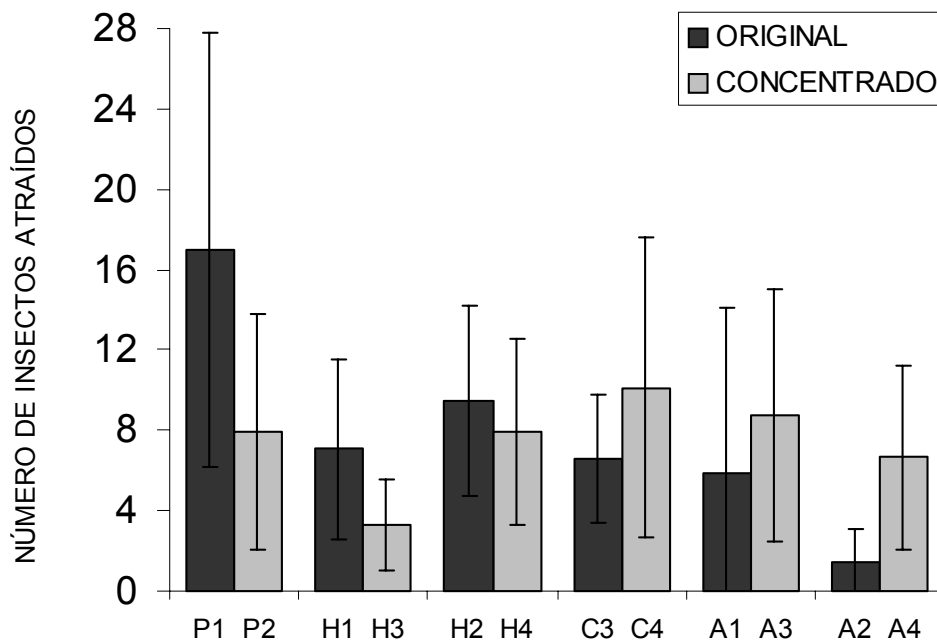


Figura 2

Número de insectos atraídos por los extractos originales y concentrados. Los extractos originales se concentraron por destilación a presión reducida hasta un 10% del volumen original. P1 representa el extracto de pentano original y P2 concentrado, H1 extracto original de hexano mantenido a temperatura ambiente H3 concentrado; H2 extracto original de hexano mantenido a 4 °C y concentrado H4; extracto de diclorometano original C3 y concentrado C4; extracto de acetato de etilo original mantenido a temperatura ambiente A1 y concentrado A3; extracto de acetato de etilo original mantenido a 4 °C A2 y concentrado A4.

Como se describió en la metodología, todos los extractos se concentraron al 90% de su volumen original, por destilación a presión reducida. Este tratamiento produjo cambios importantes en su actividad atrayente como se muestra en la figura 2. Los extractos concentrados de pentano (P2) y hexano (H3) redujeron significativamente su actividad atrayente, mientras que los extractos concentrados de hexano (H4) y diclorometano (C4) no mostraron diferencias significativas con respecto a los extractos sin concentrar. En cambio, los extractos concentrados de acetato de etilo (A3 y A4) atrajeron mayor número de insectos que los extractos respectivos sin concentrar.

En la figura 3 se muestra la actividad atrayente de los compuestos volátiles recuperados en las trampas utilizadas al concentrar los diferentes extractos. En general estas fracciones mostraron baja actividad atrayente. Las fracciones P3, H5 y C5 no mostraron diferencias significativas con los testigo incluidos en los bioensayos de acuerdo al análisis de Student-Newman-Keuls a una $p < 0.05$, mientras que H6 y A6 mostraron una actividad intermedia estadísticamente significativa, destacando la actividad mostrada por A5.

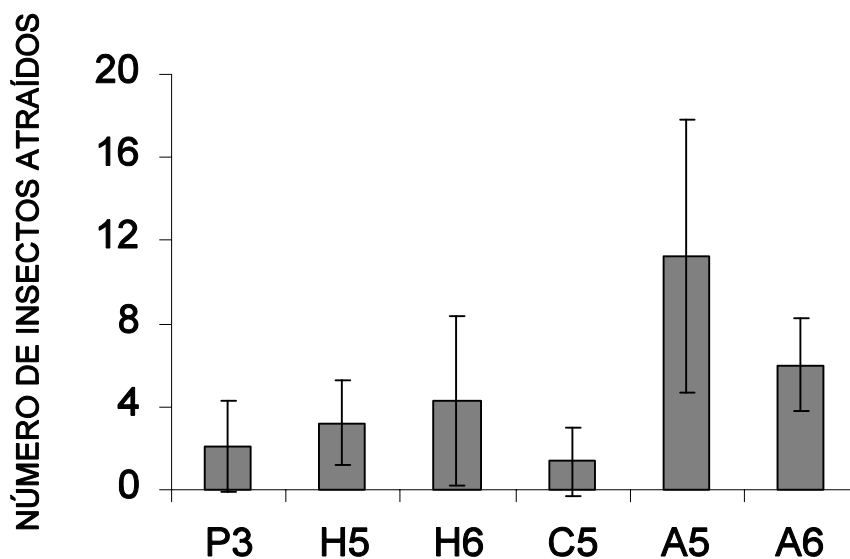


Figura 3

Número de insectos atraídos por los compuestos volátiles recuperados en las trampas utilizadas al concentrar los extractos originales de pentano (P3), hexano (H5 y H6), diclorometano (C5) y de acetato de etilo (A5 y A6).

En lo que se refiere al sexo de los grupos de insectos probados el análisis general de las medias por el método de Tukey ($w = 0.652$ a una $p < 0.05$) permitió establecer una diferencia estadísticamente significativa cuando los extractos se probaron con el grupo mixtos de insectos (25 hembras + 25 machos), no encontrándose diferencias significativas entre los grupos de hembras, machos y de insectos tomados al azar. En el cuadro 1 se ilustra el

efecto de la interacción extracto x sexo mixto para 10 fracciones diferentes. De acuerdo con la prueba de Tukey ($w = 4.59$ a una $p < 0.05$) la fracción A5 mostró una mayor actividad atrayente frente al grupo de insectos mixtos, no habiéndose encontrado diferencias entre D1, P2, D2, H3 y C4.

Cuadro 1
Respuesta del grupo mixto de insectos a diferentes extractos

| Extracto | Número de insectos (grupo mixto)* | |
|----------|--------------------------------------|-----|
| A5 | 21.88 ± 4.61 | A |
| D1 | 16.13 ± 3.64 | B |
| P2 | 15.00 ± 2.33 | B |
| D2 | 14.63 ± 2.88 | B |
| A3 | 13.38 ± 1.30 | BC |
| C4 | 12.13 ± 4.26 | C |
| C3 | 8.88 ± 3.56 | CDE |
| H6 | 8.88 ± 5.19 | CDE |
| P1 | 8.88 ± 2.38 | DE |
| C1 | 7.50 ± 2.83 | EF |

* constó de 25 hembras y 25 machos

A,B,C,D,E,F indican diferencias estadísticamente significativas

De acuerdo a los análisis anteriores, se seleccionaron los extractos P1, A5, H3 y C4, y se analizaron por cromatografía de gases bajo las condiciones antes descritas. En estas fracciones se detectó la presencia de 7 componentes formando el aroma con actividad atrayente, los cuales mostraron tiempos de retención de 1.24, 1.48, 2.12, 2.48, 3.12, 4.24 y 6.36 min. La identificación de cinco de estos componentes se realizó por espectrometría de masas usando un sistema de CG-EM. Los espectros de masas obtenidos nos permitieron identificar los siguientes compuestos: 4-etil cumeno m/z (%): $[M^+]$ 148.24 (26.8); 133.21(100); 119.18 (24.1); 105.16 (65); 77.10 (19.2); p-metoxi-etil-benceno m/z (%) $[M^+]$ 136.19 (31.3); 121.16 (100); 122.16 (9.2); 77.10 (8.2); 1-metil-4-(1-metil etil) ciclohexanol m/z (%): 123.22 (24.8); 71.10 (100); 55.10(45.3); 43.09(35.2), 41.07(46.9); p-menta-1,5-dien-8-ol m/z (%): 94.15 (71.5); 79.13 (53.1); 59.09 (100); y butirofenona m/z (%): $[M^+]$ 148.2 (8.3); 120.19 (6.8); 105.11(100); 77.10(66.2); 27.11(20.3). Estos resultados se confirmaron comparando los espectros obtenidos con los reportados en un banco de datos (NIST Mass Spectral Search Program, 1997). Las estructuras de los compuestos identificados se presentan en la figura 4. Debido a que estos compuestos se pueden obtener comercialmente, se abre la posibilidad de probar diferentes mezclas de ellos, a fin de determinar la composición más adecuada que produzca el mejor efecto atrayente sobre el insecto. Con estos resultados se plantea una alternativa no contaminante para controlar de manera más eficiente a este importante insecto.

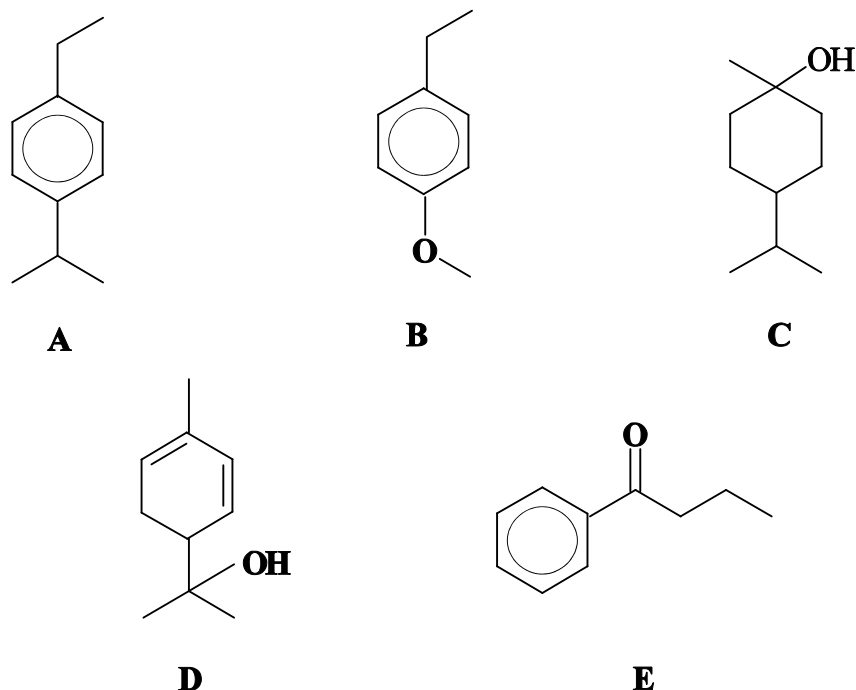


Figura 4

Estructuras de los compuestos identificados por CG-EM, en los extractos de hojas de henequén con actividad atrayente hacia el insecto adulto de *Scyphophorus acupunctatus*. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlet Packard 5840-A, provisto con una columna capilar de 25 m SP 2100 Carbowax 20M desactivada, y acoplado a un espectrómetro de masas de resolución normal, obteniendo los espectros a 70 eV. (A) 4-etil-cumeno, (B) p-metoxi- etil benceno, (C) 1-metil-4-(1-metiletil) ciclohexanol, (D) p-menta-1,5,-dien-8-ol y (E) butirofenona.

DISCUSIÓN

Un atrayente es un compuesto o mezcla de compuestos volátiles que estimulan en un insecto una respuesta de orientación y locomoción a la fuente del atrayente (Renou & Guerrero 2000). Gran parte de los atrayentes son mezclas complejas que constituyen un aroma, en el que se requiere la presencia simultánea de los diferentes componentes, en proporciones adecuadas para ser activos. El uso de atrayentes naturales de insectos, representa una herramienta valiosa en el control biológico de plagas y día a día su uso se difunde más, debido a las ventajas que presenta, entre las cuales podemos mencionar su inocuidad ecológica, debido a su alta especificidad, la cual evita la posibilidad de matar insectos benéficos, su elevada eficiencia que permite el uso del atrayente en pequeñas cantidades, ya que los insectos los detectan en niveles cercanos a los moleculares, además de que no crean resistencia, ni producen el tipo de contaminación ambiental que genera el uso inadecuado de insecticidas químicos. Este tipo de atrayentes se usan en trampas en

las que además del atrayente se adiciona una pequeña cantidad de insecticida para que el insecto salga de donde se encuentre y vaya a la trampa donde morirá. En lo que se refiere al max, una de las principales plagas que afecta al henequén, el uso de atrayentes naturales representa una alternativa en el control de esta plaga, ya que, como se mencionó anteriormente, el uso de insecticidas comunes no es adecuado debido a que por la profundidad en la que se aloja el insecto adulto y las larvas, éste no llega a hacerle efecto.

En el presente trabajo se obtuvieron extractos de hojas de henequén con actividad atrayente hacia el insecto max (*S. Acupunctatus*).

El efecto atrayente de los extractos probados no mostró ser específico del sexo del insecto, ya que éste se manifestó independientemente del sexo de las poblaciones de insectos usadas en los bioensayos.

Los extractos de hoja de henequén con mayor actividad atrayente se caracterizaron por presentar 5 compuestos en común, los cuales de acuerdo a sus espectros de fragmentación corresponden a: 4 etil cumeno, p-metoxi-etil-benceno, 1-metil-4-(-1-metiletil) ciclohexanol, p-menta 1,5-dien-8-ol, y butirofenona.

AGRADECIMIENTOS

Al INIFAP-Yucatán por habernos proporcionado las hojas de henequén y los cultivos de *S. acupunctatus* Gyllenhal, utilizados en el presente trabajo. Al Dr. Jorge Molina por su ayuda en la interpretación y análisis de los espectros de masas.

LITERATURA CITADA

- Eastmond A., M. Robert & Herrera.** 2000. La biotecnología aplicada al henequén: Alternativas para el futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 106p
- Hagley E. C.** 1965. Test of attractants for the palm weevil. *J. Econ. Entomol.* 58: 1002-1003.
- Halffter G.** 1957. Plagas que afectan las diferentes especies de agaves cultivadas en México. Dirección general de la defensa agrícola. México.
- Landon V.** 2001. A review of the market in traditional sisal and henequen products (especially agricultural twines and general cordage) and an assessment of future potential. <http://www.fao.org/DOCREP/004/y1873E/y1873e07.htm>. London
- Nelson M.** 1998. Modern henequen production www.mexicomike.com/stories/henequen.htm
- NIST** 1997. Mass Spectral Search Program (version 1.6) for the NIST/EPA/NIH Mass spectral Library USA.
- Olivares Saénz E.** 1994. Paquete de programas de diseños experimentales versión 2.5. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín, Nuevo León.
- Otero Baña R.** 1991. El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem) como planta textil y su aprovechamiento integral. Internet www.utm.mx/temas.does/eu923 La Habana, Cuba.
- Peniche R. P.** 1985. Evolución histórica de la producción del henequén. *In:* Cruz C., Del Castillo L., Robert M., Ondarza RN (Eds). *Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves*. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán A.C. Mérida Yucatán, México, 295 p
- Quijano-Ramayo A., J. L. Herrera-Herrera, M. Canul-Salazar & M. Robert.** 2002. Microbial diseases affecting henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 18-23
- Ramírez Choza J. L.** 1978. Reporte. Evaluación de daño, biología, comportamiento y método de control del max del henequén *Scyphophorus interstitialis* en Yucatán, CIAPY. Yucatán.

Valdés-Rodríguez et al.: *Respuestas de un curculionido a compuestos del henequén*

Renou M. & A. Guerrero. 2000. Insect parpheromone in olfaction research and semiochemical-based pest control strategies. *Ann. Rev. Entomol.* 45:605-630

Valdés Rodríguez S. 1981. Aislamiento de las sustancias del henequén con propiedades atrayentes hacia el insecto *Scyphophorus interstitialis* (max). *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química. UNAM. México, D. F.

Weissling, T. J. & R. M. Gibling-Davis. 1994. Fecundity and fertility of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomol.* 77: 75-78.

Recibido: 3 de noviembre 2003

Aceptado: 24 de junio 2004