

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS PIRAZINAS DE LA FEROMONA SEXUAL DE
Toxotrypana curvicauda (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

Maritza Vega-Petlascalco¹, Norma Robledo-Quintos¹ y René Arzuffi-Barrera¹. ¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Km 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla, Yautepec, 62731 Morelos. vega.petlascalco@gmail.com, nrobledo@ipn.mx y rarzuffi@ipn.mx.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue probar el efecto de atracción de la 2-etenil-6-metilpirazina, la 3-etenil-2,5-dimetilpirazina y la mezcla de éstas sobre hembras de *Toxotrypana curvicauda* (mosca de la papaya), mediante olfatometría y electroantenografía. En los bioensayos de electroantenografía la 3-etenil-2,5-dimetilpirazina provocó una despolarización mayor a la inducida por la 2-etenil-6-metilpirazina y la mezcla de éstas; sin embargo, fue menor que la provocada por las emisiones de los machos. En las pruebas de comportamiento (túnel de viento), la mezcla de las pirazinas y el extracto de los volátiles de los machos fueron los únicos estímulos que provocaron un aterrizaje en la fuente de emisión. Este estudio contribuye al conocimiento del sistema de apareamiento de *T. curvicauda* y puede tener un potencial impacto en aplicaciones prácticas para el manejo de esta plaga.

Palabras clave: *Toxotrypana curvicauda*, 2-etenil-6-metilpirazina, 3-etenil-2,5-dimetilpirazina, extracto emisiones machos.

Biological activity of the pyrazines of the sexual pheromone in *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae)

ABSTRACT: The aim of this research was to prove the attraction of the 2-ethenyl-6-methylpyrazine, 3-ethenyl-2,5-dimethylpyrazine and the mixture of them with females of *Toxotrypana curvicauda* (papaya fruit fly) by olfactometry and electroantennography. In the electroantennographic bioassays. The 3-ethenyl-2,5-dimethylpyrazine caused a bigger despolarization than induced by the 2-ethenyl-6-methylpyrazine and than the mixture of them; but it was smaller than the despolarization caused by the male emissions. On the other hand, in the behavioral tests the pyrazine blend and the male volatiles extract were the only stimulus that provoked a landing on the emission source. This study contributes to the knowledge of the mating system of *T. curvicauda* and may have potential impact on practical applications for pest management.

Key words: *Toxotrypana curvicauda*, 2-ethenyl-6-methylpyrazine, 3-ethenyl-2,5-dimethylpyrazine, males emissions extract.

Introducción

En los tefrítidos el comportamiento de cortejo, cópula y oviposición es inducido por estímulos visuales, auditivos, táctiles y químicos (Wicker-Thomas, 2007). Dentro de los estímulos químicos se encuentran las feromonas sexuales, las cuales son compuestos químicos que al ser liberados provocan una o más reacciones de comportamiento en el sexo opuesto. Los sistemas feromonales en esta familia son muy complejos, éstos se caracterizan por ser multicomponentes y presentar una variedad de estructuras químicas además de que las cantidades y proporciones de los componentes varían a través del tiempo o entre diferentes poblaciones de moscas de la misma especie (Heath *et al.*, 2000; Nation, 2002).

En *T. curvicauda* (Gerstaeker) la liberación de la feromona sexual fue estudiada por Landolt y Hendrichs en 1983, ellos describieron el llamado del macho, el cual consiste en el hinchamiento de la región pleural del abdomen y la liberación de compuestos. Posteriormente, Chuman *et al.* (1987) extrajeron, separaron, identificaron y sintetizaron a la 2-etenil-6-metilpirazina (2em), descartando la presencia de otros componentes en las emisiones de los machos. Por otra parte, Robledo (2008)

encontró otros dos componentes en las emisiones de los machos, una segunda pirazina (etenil-dimetilpirazina) y un terpeno. Recientemente Vega-Petlcalco *et al.* (2013) identificaron y sintetizaron a la segunda pirazina como 3-etenil-2,5-dimetilpirazina (3ed). El objetivo de este trabajo fue conocer la actividad antenal de la 3ed y determinar si puede modificar la capacidad de atracción en hembras de *T. curvicauda* de forma individual o mezclada con la 2em.

Materiales y Método

En los bioensayos se emplearon hembras de 6-8 días de edad entre las 13:00 y 16:00 h, periodo de mayor actividad de la mosca (Aluja *et al.*, 1997; Landolt, 2000). Para la determinación de la actividad electrofisiológica, la cabeza de la hembra se cortó con unas tijeras de disección y se insertó en el extremo de un capilar de vidrio que contenía en la parte posterior un alambre de plata para que actuara como electrodo de referencia. En la parte distal del funículo antenal se insertó otro capilar de vidrio, al cual también se le colocó alambre de plata para que funcionara como electrodo de registro. Ambos electrodos contenían solución salina (7.5 g NaCl; 0.21 g CaCl₂; 0.35 g KCl; 0.20 g NaHCO₃ disueltos en 1L de H₂O destilada). Los electrodos se conectaron a un equipo de registro y análisis de señales electroantenoográficas Syntech (Kirchzarten, Alemania) para medir la actividad de las antenas frente a los diferentes estímulos. Por medio de una micropipeta (Sigma-Aldrich) en una pieza de papel filtro de 5 x 20 mm (Whatman No. 1) se aplicaron, por separado 2 µL de cada uno de los siguientes tratamientos: 1) extracto de las emisiones de los machos con 2em, 2.5 µg µL⁻¹ y 3ed, 0.375 µg µL⁻¹; 2) la 2em sintetizada 2.5 µg µL⁻¹; 3) 3ed sintetizada 0.375 µg µL⁻¹; 4) mezcla de ambas pirazinas sintetizadas 1µL de la 2em sintetizada (5 µg µL⁻¹) y 1 µL de la 3ed sintetizada (0.75 µg µL⁻¹).

La estimulación de la antena se realizó mediante una corriente de aire puro humidificado (0.7 L min⁻¹) a través de un tubo de vidrio en forma de L (12 x 12 cm y Φ interior 1 cm) mediante una bomba de aire (CS-05, Syntech). En cada tratamiento se dejó evaporar el disolvente durante 20 s, en seguida, la muestra se introdujo en un pipeta Pasteur limpia designada solamente para ese tratamiento y se aplicó el estímulo mediante un pulso de aire (duración 1 s, flujo de 0.5 L min⁻¹) que arrastró los vapores de cada uno de los compuestos cargados en el papel filtro y los llevó a la antena del insecto. Se registraron las despolarizaciones provocadas por cada uno de los tratamientos. En cada antena se inició con los controles (hexano, metanol y hexano-metanol), posteriormente con los tratamientos: extracto de las emisiones de los machos, la 2em, la 3ed y la mezcla (2em + 3ed) y se cerró con los mismos controles. La secuencia con la que se aplicaron los tratamientos fue al azar, dejando pasar 2 min entre cada uno. Para el análisis de datos se consideraron los valores de despolarización (mV) para cada compuesto, en total se utilizaron 17 antenas de diferentes moscas.

Para determinar la actividad de atracción se utilizaron los mismos tratamientos del bioensayo anterior, en un olfatómetro de túnel de viento de plexiglass transparente (120 X 30 X 30 cm) similar al utilizado por Robacker (1999), iluminado con cuatro lámparas fluorescentes (39 W, F48T12/D Phillips, USA) colocadas en la parte superior del mismo, las cuales proporcionan una iluminación de 1900 lx. En la entrada del aire se encuentra un filtro de carbón activado que limpia, con un flujo laminar de 40 cm s⁻¹ producido por un extractor. En la parte superior de la cámara se encuentran dos orificios que permiten el acceso al interior de la cámara. Todas las pruebas se realizaron a una temperatura de 25 ± 2 °C y humedad relativa de 55 ± 5 %. Una mosca se colocó durante 2 min cerca de la salida del aire, sobre un vaso de precipitados de vidrio, a la altura del flujo del viento, en un tubo de acrílico (Φ= 3 cm, altura=8 cm) tapado por un lado con maya elástica. En el lado opuesto, donde está la entrada de aire, se colocó el estímulo en un papel filtro de 5 x 10 mm (Whatman No. 1) con ayuda de una micropipeta (Sigma-Aldrich). Para después liberar a la mosca a la misma altura del estímulo (fuente), en el lado

opuesto del túnel. Cada bioensayo duró 5 min y se desecharon aquellas moscas que tardaron más de 2 min en activarse (sacar la cabeza del tubo de acrílico). En cada estímulo se emplearon 12 moscas, excepto con la 2em que fueron 19 moscas. Para evaluar la respuesta de atracción se empleó el porcentaje de moscas que tuvieron un movimiento hacia estímulo y el porcentaje de aquellas que aterrizaron en él.

Los datos de despolarización provocada por los tratamientos en la antena se analizaron por medio de un análisis de varianza simple con medidas repetidas y las diferencias entre grupos se probaron con una prueba de Student Newman-Keuls. En el túnel de viento se obtuvo el porcentaje promedio de moscas que tuvieron un movimiento hacia la fuente y el porcentaje de aquellas que aterrizaron en la fuente y se analizaron mediante χ^2 con corrección de Yates. Se empleó el programa estadístico SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Port Richmond, CA).

Resultados y Discusión

En los bioensayos de electroantenografía (Fig. 1) la 3ed provocó una menor despolarización que el extracto de las emisiones de los machos, pero fue mayor que la provocada por la 2em y la mezcla de las pirazinas ($F_{3/67} = 19.42$, $n=17$, $p < 0.01$). La antena de la mosca puede detectar a la 3ed, a pesar de que la cantidad es 6.6 veces menor a la 2em. En el trabajo realizado por Jang *et al.* (1989) no se observó una correlación entre la abundancia de los compuestos emitidos por los machos y la respuesta medida mediante EAG en hembras de *Ceratitis capitata*, pues 3 de los compuestos mayoritarios presentaron bajas respuestas; pudiendo ser el caso de *T. curvicauda* con la 2em.

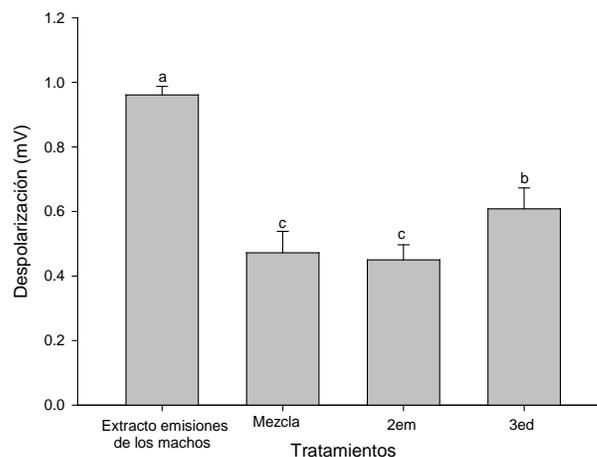


Figura 1. Despolarización (promedio ± ESM) en antenas de hembras estimuladas con: el extracto de las emisiones de los machos (Extracto), la mezcla de la 2-etenil-6-meilpirazina y la 3-etenil-2,5-dimetilpirazina (Mezcla), la 2-etenil-6-metilpirazina (2em) y la 3-etenil-2,5-dimetilpirazina (3ed) en pruebas de electroantenografía. Letras distintas indican diferencias (Student Newman-Keuls, $p < 0.05$).

En las pruebas en túnel de viento (Fig. 2) todos los estímulos provocaron que más del 67 % de las moscas tuvieran un movimiento hacia la fuente ($\chi^2 = 6.0$, $gf: 1$, $p < 0.014$). Por otro lado, el extracto fue con el que se obtuvo el mayor porcentaje (25 %) de aterrizajes en la fuente, seguido de la mezcla de pirazinas (16 %). Existiendo diferencias significativas entre éstos y las pirazinas de forma individual (2em y 3ed) ($\chi^2 = 23.386$, $gf: 1$, $p < 0.001$ y $\chi^2 = 2.6$, $gf: 1$, $p < 0.001$ respectivamente). En el túnel de

viento la mezcla, la 2em y la 3ed provocaron un movimiento dirigido hacia la fuente, pero sólo al mezclar las dos pirazinas se obtuvo un aterrizaje en la fuente como el provocado por el extracto de los volátiles emitidos por los machos. Howse *et al.*, 1998) indican que la presencia de más de un compuesto en las feromonas sexuales de los insectos, se debe a que cada compuesto controla por separado distintas fases de la atracción. Por otro lado, a la combinación de las pirazinas (2em+3ed) se le puede atribuir un efecto sinérgico.

En *C. capitata* en pruebas de túnel de viento las hembras mostraron una respuesta de atracción mayor a la mezcla de cinco compuestos [(E, E)- α -farneseno, geranil acetato, etil-(E)-3-octenoato, etil acetato, 1-pirrolino] que a la mezcla de 3 compuestos y los compuestos de forma individual (Jang *et al.*, 1994). En *Anastrepha ludens* al combinar 4 enantiómeros de lactonas con 2 alcoholes [(Z-Z)-3,6-nonadienol y (Z)-3-nonenol], también se obtuvo un efecto sinérgico en la atracción de esta mosca (Robacker y Hart, 1985).

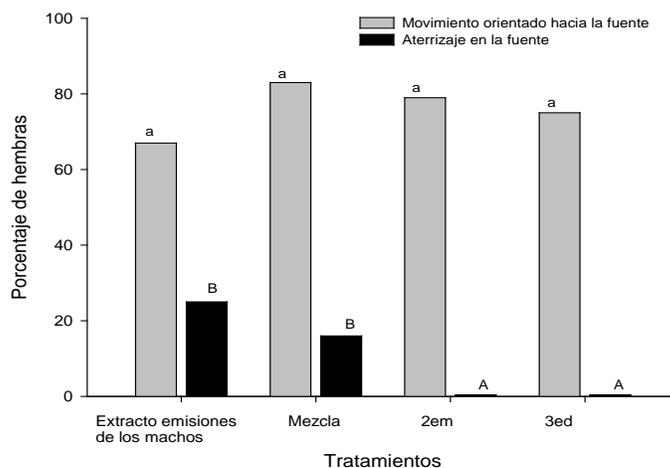


Figura 2. Respuesta de atracción en hembras estimuladas con: el extracto de las emisiones de los machos, la mezcla de la 2-etenil-6-meilpirazina y la 3-etenil-2,5-dimetilpirazina (Mezcla), la 2-etenil-6-metilpirazina (2em) y la 3-etenil-2,5-dimetilpirazina (3ed) en túnel de viento. Letras minúsculas diferentes indican diferencias en movimiento hacia la fuente y letras mayúsculas diferentes indican diferencias en aterrizaje en la fuente, χ^2 , $p < 0.05$.

El descubrimiento de una segunda etenilpirazina (3-etenil-2,5-dimetilpirazina) en las emisiones de los machos de *T. curvicauda* con actividad biológica, puede contribuir al desarrollo de métodos más eficientes para el trapeo y el muestreo de la mosca de la papaya.

Agradecimientos

M. Vega es becario CONACYT y PIFI, IPN. R. Arzuffi y N. Robledo son becarios EDI y SIBE, IPN. Agradecemos por el financiamiento de los proyectos SIP 20121196 y 20131032.

Literatura Citada

Aluja M., A. Jiménez, J. Piñero, M. Camino, L. Aldana, M. E. Valdés, V. Castrejón, I. Jácome, A. Dávila and R. Figueroa. 1997. Daily activity patterns and within field distribution of papaya fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Morelos and Veracruz, Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*. 90: 505-520.

- Chuman T., P. J. Landolt, R. R. Heath and J. H. Tumlinson. 1987. Insolation, identification and synthesis of male produced sex pheromones of papaya fruit fly *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker. (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology*. 13: 1979-1992.
- Heath R. R., P.J. Landolt, D. C. Robacker, B. D. Dueben and N. D. Epsky. 2000. Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. En: M. Aluja. and A. L. Norrbom (Eds). *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution behavior*. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 793-809.
- Howse P. E., I. D. R. Stevens y O. T. Jones. 1997. *Insect Pheromones and their Use in Pest Management*. Chapman and Hall. London, UK. 369 p.
- Jang E.B., M. L. Douglas, A. F, Robert, T. N. Janice and R.M Thomas. 1989. Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* to identified volatile constituents from calling males. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 50: 7-19.
- Jang E. B., D. M. Light, R. G. Binder, R. A. Flath and L. A. Carvalho. 1994. Atracction of female Mediterranean fruit flies to the five major components of male-produced pheromone in a laboratory flight tunnel. *Journal of Chemical Ecology*. 20 (1): 9-20.
- Landolt P.J. y J. Hendrichs. 1983. Reproductive behavior of the papaya fruit fly, *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 76: 413-417.
- Landolt P.J. and J. Hendrichs. 1983. Reproductive behavior of the papaya fruit fly, *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 76: 413-417.
- Landolt P. J. 2000. Behavior of Flies in the Genus *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypana). Pp 811-841. En: Aluja M. y Norrbom AL (Eds). *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 963 p.
- Nation J. L. 2002. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press LLC. Florida. Pp 485.
- Robacker D.C. 1999. Attraction of wild and laboratory-stream Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to two synthetic lures in wind tunnel. *Florida Entomologist*. 82: 87-96.
- Robacker D.C. and W. G. Hart. 1985. (Z)-3-nonenol, (Z, Z)-3, 6-nonadienol and (S,S)-(-)-epianatrephin: male produced pheromone of the Mexican fruit fly. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 39: 103-108.
- Robledo N. 2008. Análisis químico de los volátiles de las emisiones de los machos durante el llamado sexual y morfología glandular y antenal de *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae). Tesis de Doctorado. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN. Yautepec, Morelos.
- Vega-Petlacalco M., R. Arzuffi, J. Escalante y N. Robledo-Quintos. 2013. Identificación de los compuestos feromonales de *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae). *Entomología Mexicana* 12 (1): 671-676.
- Wicker-Thomas C. 2007. Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *Journal of Insect Physiology*. 53: 1089-1100.