

IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE HIDROCARBUROS CUTICULARES DE *Toxotrypana curvicauda* (Gerstaecker, 1860) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Ricardo Peralta-Falcón y Norma Reyna Robledo-Quintos✉

Laboratorio de Ecología Química de Insectos. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (Instituto Politécnico Nacional), Calle CEPROBI no. 8, San Isidro, Yautepec, 62731, México

✉ Autor de correspondencia: nrobledo@ipn.mx

RESUMEN. Los hidrocarburos cuticulares en los insectos varían entre especie y sexo, también intervienen en el reconocimiento intraespecífico e interespecífico, por lo cual son una herramienta taxonómica efectiva y tienen potencial para ser utilizados en el manejo de plagas. Debido a su importancia, estos compuestos han sido estudiados en diversos insectos como la familia Tephritidae. *Toxotrypana curvicauda* (Gerstaecker, 1860) es una plaga importante de *Carica papaya*, su principal hospedero. Se estudiaron machos y hembras vírgenes de edad adulta de 1, 3, 5, 7, 9, y 11 (n=13), se realizaron extracciones con hexano para obtener el perfil de hidrocarburos cuticulares. Se analizaron muestras de los hidrocarburos por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se encontró que el perfil de compuestos de ambos sexos corresponde a 2-metilooctacosano, 1-heptacosanol, (14Z)14-tricosen-1-il formato, un isómero y 2-[(E)-octadec-9-iloxi] etanol.

Palabras clave: Reconocimiento intraespecífico; Ecología química de insectos; Mosca de la papaya

Identification of the profile of cuticular hydrocarbons of *Toxotrypana curvicauda* (Gerstaecker, 1860) (Diptera: Tephritidae)

ABSTRACT. The cuticular hydrocarbons in insects vary between species and their sexes, also is an intraspecific and interspecific recognition mediated for which are an effective taxonomic tool and have potential to be used in pest management. Because of their importance, these compounds have been studied in various insects such as the Tephritidae family. *Toxotrypana curvicauda* (Gerstaecker, 1860) is an important pest of *Carica papaya*, its main host, Adult males and females of 1, 3, 5, 7, 9, and 11 were studied (n = 13), we make hexane extractions to analyze the different age virgin male and female of *T. curvicauda* cuticular hydrocarbons profile. Samples of the hydrocarbons were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry and the profile compounds of both sexes was found to correspond to 2-methyloctacosane, 1-heptacosanol, (Z)-14-tricosenyl formate, an isomer and ethanol, (Z)-.2-(9-octadecenyloxy).

Key words: Intraspecific recognition; Insect chemical ecology; fruit flies

INTRODUCCIÓN

Los tefrítidos son causantes de la mayor parte de los daños generados a plantas cultivadas en gran parte del mundo debido a que sus ciclos vitales se desarrollan en plantas angiospermas pertenecientes a diferentes familias (Fría, 1992; Landolt, 2000). Actualmente ha aumentado el interés de estudiar los hidrocarburos cuticulares de los insectos, ya que son señales químicas que varían entre especies, según la edad adulta, el sexo y el estado de apareamiento, han sido estudiados en especies de la familia Tephritidae como *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), *C. anonae* (Graham, 1908), *C. fasciventris* (Bezzi, 1920), *C. rosa* (Karsch, 1887), y *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), como un medio eficaz de identificación taxonómica (Vaničková *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestro interés está enfocado en su intervención en la comunicación intraespecífica, como parte del reconocimiento intraespecífico en *Toxotrypana curvicauda* (Gerstaecker, 1860) (Diptera: Tephritidae).

La cutícula en los insectos está compuesta por múltiples capas que le confiere diversas funciones de protección a condiciones ambientales y frente a microorganismos patógenos e insectos, además de proporcionarle soporte al cuerpo. Los hidrocarburos contenidos en la capa cerosa de la epicutícula evitan la deshidratación y el daño por rayos UV (Hadley, 1984; Vrkoslav *et al*, 2010) y son señales de reconocimiento inter e intraespecífico.

La presente investigación tiene como objetivo: estudiar el perfil de hidrocarburos cuticulares según el sexo y la edad en *T. curvicauda*.

MATERIALES Y MÉTODO

Se obtuvieron muestras a partir frutos de *Carica papaya* infestados en plantaciones ubicadas dentro del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos IPN y en las proximidades de San Isidro, Yautepec, Morelos. Se extrajeron larvas en estadio L3 y se introdujeron para pupar en recipientes de 500 mL con 300 g de tierra esterilizada, en una cámara de cría (25°C de temperatura, 50-60% de H.R. y ciclo de luz y oscuridad 12 a 12 h) en el periodo de emergencia de pupas (20 – 23 días). Una vez emergidas, las moscas fueron separadas en envases individuales y alimentados con solución acuosa al 10% de azúcar.

En la extracción y análisis de hidrocarburos cuticulares se utilizó un procedimiento modificado de Vaníčková *et al.* (2014). Para la extracción ocuparon moscas vírgenes en edades de 1, 3, 5, 7, 9, y 11 días y con ayuno previo de un día y un intervalo de peso ($0.0469 \text{ g} \pm 0.0050$ machos y $0.0510 \text{ g} \pm 0.0055$ hembras) se congelaron a -20°C por 30 minutos y se colocaron por 15 min dentro de un desecador. Posteriormente, se introdujeron dentro de viales de vidrio con 1mL de hexano HPLC. Los viales se agitaron por 5 min en un equipo agitador vortex, se extrajeron las moscas del vial y se desecharon. Las muestras de cada vial se re concentraron a 150 μl con una corriente de flujo constante de Nitrógeno (N_2) y almacenaron a -20°C hasta su análisis.

El análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) (7890A) acoplado con un espectrómetro de masas (EM) (5975C), marca Agilent Technologies. Para CG se usó una columna capilar de sílice fundida SLB-5ms, 30m x 0.25mm de diámetro interno y 0.25 μm espesor de película). Se utilizó hidrogeno como gas portador. El inyector se trabajó en modo split, a una temperatura de 250 °C. El programa en el horno inicio con 150 °C durante 2 min, subiendo 5°C/min hasta llegar a 308 °C, el tiempo total de corrida: 33.6 min. La temperatura del auxiliar: 280 °C. El detector de EM se trabajó en ionización electrónica en modo SCAN y un intervalo de masas de 29-400 UMA.

El volumen de inyección fue de 2 μL . La identificación de compuestos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención, los índices de retención (Kovats) (Clarke, 1978) y los espectros de masas de la biblioteca espectral (NIST/EPA/NIH,2002) obteniendo así los perfiles para cada sexo y edad de *T. curvicauda*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles para moscas vírgenes ambos sexos incluyen mezclas de hidrocarburos de largas cadenas de carbonos (20-31), con alto peso molecular. En el cromatograma se detectaron seis picos, de los cuales fueron identificados cinco compuestos (cuadro 1). Entre los compuestos del perfil se encuentra: un hidrocarburo alcano (2-metiloctacosano), dos alcoholes (1-heptacosanol, 2-[(E)-octadec-9-iloxi] etanol), un isómero y un éster ((14Z)-14-tricosen-1-il formato).

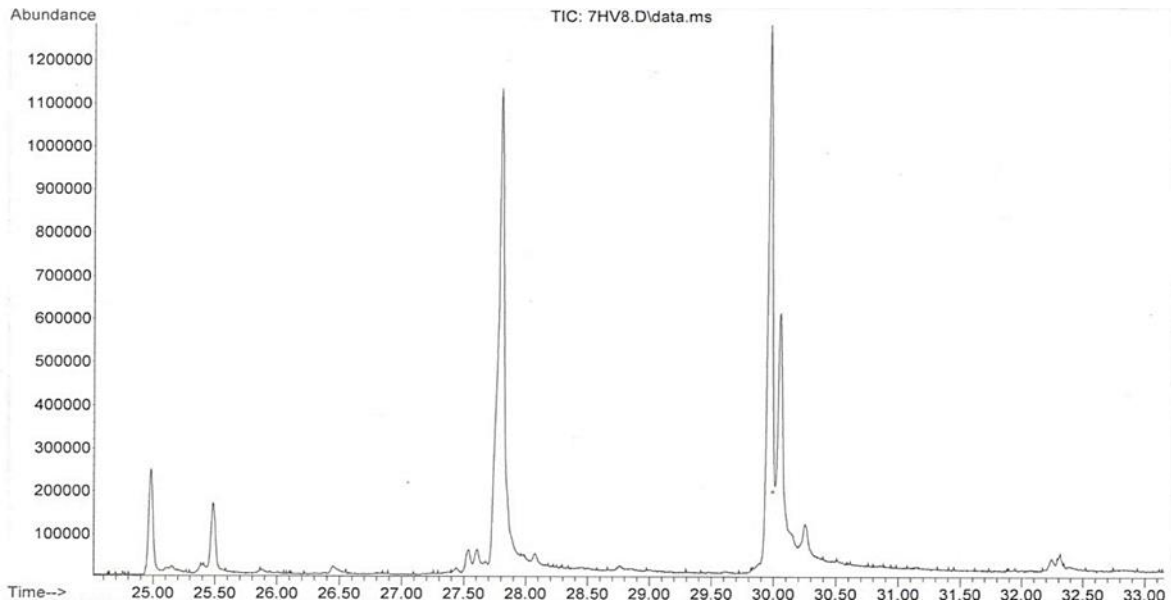


Figura 1. Cromatograma de mosca hembra virgen de 7 días de edad adulta.

El perfil de hidrocarburos encontrado no presenta diferencias cualitativas, un caso similar se ha observado en *C. anonae* (Vaníčková L. *et al.*, 2014) y *Phormia Regina* (Meigen, 1826) (Stoffolano *et al.*, 1997); sin embargo, no sucede igual con la cantidad, ya que hay diferencias en las cuentas de área, este hecho se muestra también en el trabajo de Howard *et al.* (2003) con *Drosophila birchii* (Ayala, 1965) y *Drosophila serrata* (Ayala, 1965), donde ambos sexos en las dos especies comparten compuestos, pero en diferente abundancia. El hecho de la especificidad en perfiles puede estar relacionado y ser impulsado por la selección sexual, ya que la composición química puede ser utilizada como una señal feromonal de contacto en la elección de pareja, mencionada en casos como el de *Teleogryllus oceanicus* (Le Guillou, 1841) (Thomas y Simmons, 2010).

En el perfil identificado en moscas vírgenes de *T. curvicauda* fue reportado anteriormente el compuesto 2-metiloctacosano para ambos sexos en las especies *D. birchii* y *D. serrata* (Howard *et al.*, 2003), en *Aldrichina grahami* (Aldrich, 1930), *Achoetandrus rufifacies* (Macquart, 1843), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1798) y *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Ye G. *et al.*, 2007); en *A. fraterculus* (Vaníčková *et al.*, 2012), en *C. capitata*, *C. anonae*, *C. fascivertis* y en hembras de *C. rosa* (Vaníčková *et al.*, 2014 y 2015), todas del orden díptera, siendo las últimas cinco especies pertenecientes a la familia Tephritidae. Sin embargo, los otros 3 compuestos identificados no se encontraron en algún otro perfil del orden díptera estudiado al momento, lo que indicaría que es un perfil único para esta especie.

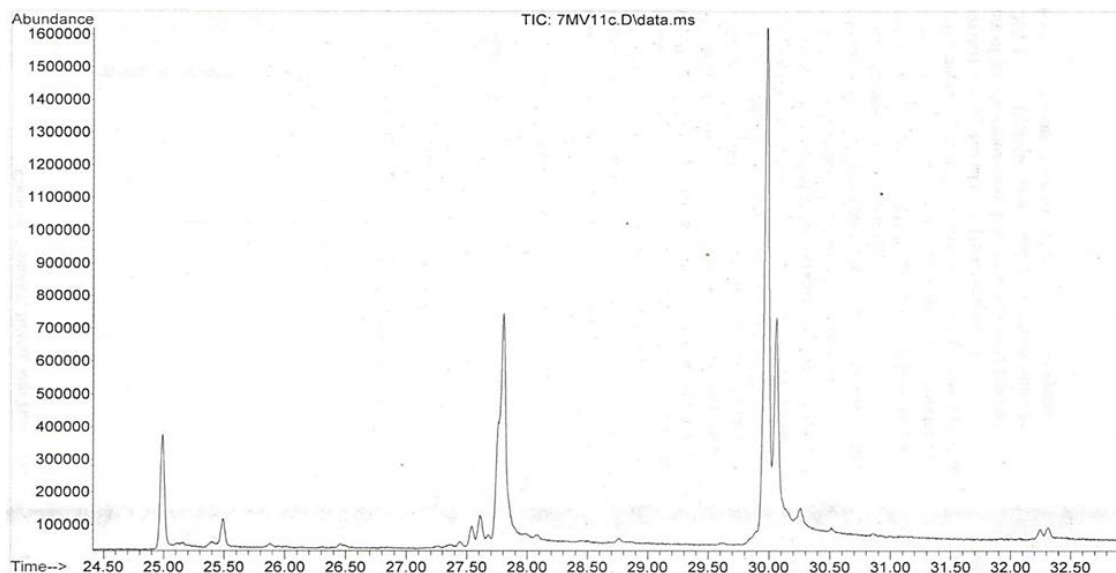


Figura 2. Cromatograma de mosca macho virgen de 7 días de edad adulta.

En hembras los compuestos por orden de abundancia se organizan de la siguiente manera: 1-heptacosanol (36.17%), (14Z)-14-tricosen-1-il formato (36.14%), isómero (18.34%), 2-metiloctacosano (6.84%) y 2-[(E)-octadec-9-iloxi] etanol (2.48%). Los compuestos en machos presentaron un diferente orden respecto a sus abundancias: tricosen-1-il formato (41.04%), 1-heptacosanol (28.93%) isómero (18.55%), 2-metiloctacosano (8.80%) y 2-[(E)-octadec-9-enoxi] etanol (2.67%).

La presencia de los compuestos a través de la edad es constante, con un crecimiento gradual de las cuentas de área de todos los compuestos, principalmente en los compuestos 1-heptacosanol y (14Z)-14-tricosen-1-il formato. En las cuentas de área a través de la edad el cambio significativo se da entre los cinco y siete días de edad adulta.

Cuadro 1. Compuestos presentes en machos y hembras vírgenes.

Compuesto*	tr	Formula**	PM	CAS	IR
2-metiloctacosano	24.981	C ₂₉ H ₆₀	408.4695	1560-98-1	2868
1-Heptacosanol	27.784	C ₂₇ H ₅₆ O	396.4331	2004-39-9	3086
(14Z)-14-Tricosen-1-il formato	29.960	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	366.5776	77899-10-6	3246
Isómero	30.088	-	278.48	-	3255
2-[(9Z)-9-Octadecen-1-iloxi] etanol	32.310	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.4928	94677-31-3	3412

Tiempo de retención (tr), peso molecular (PM), Chemical Abstracts Service (CAS), Índice de retención (IR), *De acuerdo con la IUPAC **Formula condensada

Los compuestos están presentes en todas las edades del macho, sin embargo, hay variación en sus abundancias representadas en cuentas de área. Se observa la evolución de las cuentas de área de compuestos a través de la edad, en el caso de 1-heptacosanol, su mayor pico fue en el día 9 de edad, seguido por el día cinco, teniendo un decremento en el día siete pero, su incremento se llevó de manera gradual al igual que los demás compuestos, a excepción de (14Z)-14-tricosen-1-il formato, el cual alcanzó su mayor elevación para en el día cinco, siguiendo del día nueve, teniendo el mismo decremento en el día siete.

Los análisis revelaron cambios relacionados a la edad en el perfil de hidrocarburos en hembras y machos. En los perfiles se presenta una dinámica cuantitativa dependiente de la edad, los compuestos del día uno al cinco a partir de la eclosión su abundancia fue similar o sin cambios significativos. A partir del día cinco se presentaron cambios cuantitativos, y las diferencias fueron representativas entre sexos.

El intervalo en el que se da el mayor aumento en la abundancia en los compuestos en hembras coincide con el intervalo de madurez sexual en las hembras (Landolt y Heath, 1988), lo que indicaría que pueden estar relacionados con la comunicación y cortejo sexual, fenómeno también expuesto sobre *A. fraterculus* (Vaníčková *et al.*, 2012) donde la diferencia cuantitativa mayor se da a los 7 días, edad en que la especie es madura sexualmente e inicia a liberar su feromona, y donde también a como menciona Blomquist y Bagnères, (2010) pueden funcionar como una señal para el reconocimiento del sexo y la elección de pareja, para probar dichas hipótesis estamos haciendo bioensayos de comportamiento.

CONCLUSIONES

Los compuestos de hidrocarburos cuticulares identificados en *T. curvicauda* en orden de tiempo de retención son: 2-metiloctacosano, 1-heptacosanol, (14Z)-14-tricosen-1-il formato, un isómero y 2-[(9Z)-9-octadecen-1-iloxi] etanol. Los perfiles de hidrocarburos cuticulares en ambos sexos son los mismos, sin embargo, las abundancias son diferentes. De los compuestos presentes en el perfil solo 2-metiloctacosano fue encontrado anteriormente en especies de dípteros, incluyendo tefrítidos, concluyendo que el perfil es específico de la especie.

La variación del perfil en hembras fue representativa en los compuestos 1-heptacosanol, seguido por (14Z)-14-tricosen-1-il formato del intervalo de cinco a siete días de edad, el cual coincide con la madurez sexual. En machos, la variación mayor se presentó en los compuestos (14Z)-14-tricosen-1-il formato y 1-heptacosanol en el intervalo de 3 a 7 días después de la eclosión, dicho periodo coincide con la madurez sexual de la mosca.

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt por el apoyo económico con la beca para estudios de posgrado. Al Instituto Politécnico Nacional que por medio de la beca BEIFI con los proyectos: “Variación intraespecífica de los hidrocarburos cuticulares de *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae)” con clave SIP: 20160834 y “Efecto de atracción de los hidrocarburos cuticulares entre machos y hembras de *Toxotrypana curvicauda* (Diptera: Tephritidae) con clave SIP: 20171338 se recibió apoyo económico para llevar a cabo la investigación.

LITERATURA CITADA

- Ozaki, M. and Wada-Katsumata A. 2010. Perception and olfaction of cuticular compounds. Pp. 207-222. In: Blomquist, G. and Bagnères, A. (Eds.). *Insect Hydrocarbons Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press. New York, USA. ISBN 978-0-521-89814-0
- Clarke, E.G. 1978. Insolation and identification of drugs. *The Pharmaceutical Press*. 2: 927-928.
- Fria, L.D. 1992. Species of Tephritidae (Diptera). *Acta Entomologica Chilena*, 17: 69-79.
- Hadley, F.N. 1984. Cuticle: Ecological Significance. 1: Pp. 685-693 In: Beretier H.J., Matoltsy AG. and Richards S. K. (Eds.). *Biology of the integument*. Vol.1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Berlin.

- Howard, R.W., Jackson, L.L., Banse, H., and Blows, M.W. 2003. Cuticular hydrocarbons of *Drosophila birchii* and *D. serrata*: identification and role in mate choice in *D. serrata*. *Journal of chemical ecology*, 29(4): 961-976.
- Howard R.W. and Blomquist G. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*. 50: 371–393.
- Landolt P.J. and Heath R.R. 1988. Effect of age, ating and day on behavioral responses of female papaya fruit fly, *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera:Tephritidae), to synthetic sex pheromone, *Enviromental Entomology*. 17: 47-51.
- Landolt, P.J. 2000. Behavior of Flies in the Genus *Toxotrypana* (Trypetinae: *Toxotrypana*). Pp 811-841. En: Aluja M. y Norrbom A.L. (Eds.). *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press. Florida, USA. ISBN 0-8493-1275-2.
- NIST/EPA/NIH. 2002. Mass spectral library. Mass Spectral Library with Search Program (Data Version: NIST05, Software Version 2.0), USA.
- Stoffolano, J.G., Schaubert, E., Yin, C. M., Tillman, J. A., and Blomquist, G. J. 1997. Cuticular hydrocarbons and their role in copulatory behavior in *Phormia regina* (Meigen). *Journal of insect physiology*, 43(11): 1065-1076.
- Thomas, M.L. and Simmons, L.W., 2010. Cuticular hydrocarbons influence female attractiveness to males in the Australian field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 707–714.
- Vaníčková L., Svatoš A., Kroiss J., Kaltenpoth M., Nascimento R., Hoskovec M., Břízová R. and Kalinová B. 2012. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 1133–1142.
- Vaníčková, L., Virgilio, M., Tomčala, A., Břízová, R., Ekesi, S., Hoskovec, M., and De Meyer M. 2014. Resolution of three cryptic agricultural pests (*Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa*, Diptera: Tephritidae) using cuticular hydrocarbon profiling. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 631-638.
- Vaníčková, L., Břízová, R., Pompeiano, A., Ekesi, S., and De Meyer, M. 2015. Cuticular hydrocarbons corroborate the distinction between lowland and highland natal fruit fly (Tephritidae, *Ceratitis rosa*) populations. *ZooKeys*, (540) 507.
- Vrkoslav, V., Muck, A., Cvačka, J., and Svatoš A. 2010. MALDI imaging of neutral cuticular lipids in insects and plants. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21: 220-231.
- Ye, G., Li, K., Zhu, J., Zhu, G., and Hu C. 2007. Cuticular hydrocarbon composition in pupal exuviae for taxonomic differentiation of six necrophagous flies. *Journal of Medical Entomology*, 44(3), 450-456.