



El Colegio de la Frontera Sur

**INDICE ENANTIOMÉRICO Y CUANTIFICACIÓN DE LA
FRONTALINA Y *ENDO-BREVICOMINA* EN UNA POBLACIÓN
DE *Dendroctonus frontalis* ZIMM (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE) EN EL SURESTE DE MÉXICO**

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Alicia Niño Domínguez

2007

i. AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de El Colegio de la Frontera Sur-Unidad Tapachula por haberme aceptado en el programa de Maestría con orientación en Entomología Tropical.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca otorgada al presente trabajo de investigación.

A la dirección de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, CONANP, en el Parque Nacional Lagos de Montebello, Trinitaria, Chiapas, por la disposición y apoyo otorgado durante la realización del trabajo de campo. En especial quiero agradecer a Don Roberto Castellanos y Eduardo Castellanos por su gran soporte técnico brindado durante mis estancias en el parque.

Al Convenio existente entre el ARS-USDA y ECOSUR, a cargo del Dr. Jorge E. Macías Sámano y El Dr. Brian Sullivan, por el soporte técnico y económico para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Jorge E. Macías Sámano por su muy particular enseñanza profesional durante más de 4 de años de colaboración que me ayudó a mejorar mi capacidad de razonamiento y trabajo. Por la confianza y credibilidad que ha depositado en mi persona. Con gran respeto a usted Dr. Macías muchas gracias ya que sin usted el presente trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Brian Sullivan por aceptar ser parte de este trabajo de investigación, por su disposición y paciencia en enseñarme las maravillas de la cromatografía y electroantenografía y por sus valiosas sugerencias profesionales que hicieron mejorar este trabajo de investigación.



Al Dr. Gerardo Zuñiga y al Dr. Julio Rojas por aceptar ser parte de mi comité tutorial y por sus valiosas observaciones al presente trabajo de investigación.

Al Dr. Leopoldo Cruz quien a mediados de este trabajo se incorporó a mi comité tutorial y quien represento un valioso apoyo para poder concluir satisfactoriamente este trabajo de investigación.

A Lic. José Higinio López Urbina por su apoyo técnico así como también por su gran disposición para apoyarme tanto en el trabajo en campo como en laboratorio.

Al Químico Antonio Santiesteban por su amable colaboración técnica en laboratorio.

A Lic. Benjamín Moreno por su apoyo en campo.

Al Lic. Javier Valle Mora, por su disposición y apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

A Lic. Ana María Galindo, por su disposición y eficiencia en proporcionar el material bibliográfico solicitado.

A Rosalba Morales por su disposición y apoyo durante mi estancia como estudiante de maestría y por su apoyo logístico en el trámite de mi titulación.

A todas las personas de servicio social que facilitaron el trabajo en laboratorio y a todas aquellas personas que de alguna marea contribuyeron en el desarrollo del presente trabajo de investigación.



ii. DEDICATORIAS

A mis papas: la Sra. Eugenia Domínguez M. y al Sr. Mauro Niño C. quienes siempre están al pendiente de mi aún en la distancia. A ti mamá por brindarme siempre tu amor, por impulsarme y por darme inspiración para seguir adelante con mis metas, gracias má.

A mis hermanos Asbel, Yeni y Yort por su cariño incondicional que me da fuerzas para continuar con mis metas profesionales y personales.

A mi tío materno José Abel Domínguez quien ha sido para mi un ejemplo a seguir, gracias tío por demostrarme que las metas se pueden alcanzar teniendo confianza y credibilidad en uno mismo.

A mi compañero José Higinio López U. por apoyarme siempre e incondicionalmente en los buenos y malos momentos, por su amor y por regalarme una nueva ilusión a nuestras vidas, gracias Kino.

A mi bebé que con 28 semanas de gestación forma parte ya de mi vida y quien me ha dado el último empuje para terminar con este proyecto profesional, a ti bebé gracias por haber llegado a mi vida.

A mi familia política especialmente a mi suegra Doña Elva Urbina, quien desde un principio de conocerme me ha brindado su cariño y cuidado.

Al Dr. Macías Sámano por su valiosa amistad, paciencia y cariño que me ha otorgado a lo largo de casi 5 años de conocernos.

Finalmente a mis compañeros de maestría con quienes empecé este nuevo reto y de quienes aprendí cosas nuevas: Carolina, Alejandro, Helisama, Marisela, Aldo y en especial a Claudia quien llegó a ser mi confidente personal, gracias Clau por tu apoyo.



INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| OBJETIVOS..... | 6 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 7 |
| RESULTADOS Y DISCUSION..... | 11 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 18 |
| ANEXO 1. ARTICULO EDITADO Y ENVIADO AL J. CHEM. ECOL. | 24 |



Resumen- La frontalina y la *endo*-brevicomina, dos feromonas importantes en el proceso de colonización, presumiblemente presentan una variación en la producción y en el índice enantiomérico entre diferentes poblaciones geográficas de *Dendroctonus frontalis*. Por otra parte se han identificado mediante captura directa, individuos de dos morfos de *D. frontalis* en la parte sureste de México. Los morfos han sido diferenciados por su longitud corporal y se han denominado como morfo chico (MC) y morfo grande (MG). Por ello se realizó la extracción de frontalina y *endo*-brevicomina en hembras (MC y MG), y en hembras (MC y MG) y machos (MC), respectivamente, en una población de *D. frontalis* del sureste de México. La extracción de dichas feromonas se realizó mediante aireación estática en ejemplares alimentándose solitariamente durante 24 hr, y del aserrín producido se extrajeron los volátiles mediante SPME, y arrastre de volátiles con disolvente. El análisis químico se realizó a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los resultados muestran que las hembras del MC produjeron 133.5 ng (\pm E.E.= 25.4) de frontalina y 2.1 ng (\pm E.E.= 0.7) de *endo*-brevicomina; los machos del MC produjeron 2.0 ng (\pm E.E.= 1.8) de *endo*-brevicomina, lo que no representó diferencias estadísticamente significativas en la producción de esta feromona comparada con lo producido por las hembras del MC. Las hembras del MG produjeron 333.4 ng (\pm E.E.= 80.9) de frontalina y 307.5 ng (\pm E.E.= 103.1) de *endo*-brevicomina, el resultado de este último compuesto fue significativamente mayor a lo producido por hembras del MC. El índice enantiomérico promedio de la frontalina producida por hembras del MC y del MG fue (+) 4.6%:(-) 95.4% (\pm E.E.= 0.6) y (+) 3.9%: (-)96.1% (\pm E.E.= 0.6), respectivamente; sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos morfos. El índice enantiomérico de la *endo*-brevicomina producido por hembras de ambos morfos y por machos del MC fue en un mayor porcentaje por el enantiomero positivo. Los resultados reportados soportan la variación enantiomérica, al menos para la frontalina de poblaciones distanciadas geográficamente, y una diferenciación entre dos morfos de *D. frontalis* en cuanto a la producción de una de sus feromonas, *endo*-brevicomina.

Palabras Clave— Semioquímicos, comunicación química, descortezadores, feromonas de agregación, variación geográfica, morfos.

INTRODUCCIÓN

Dendroctonus frontalis es un descortezador que coloniza varias especies y grupos de pino, *Pinus spp* (Mirov, 1961), su distribución es discontinua ya que presenta tres grandes separaciones, en el sureste de Estados Unidos de América; en Arizona, Norte y Centro de México; y en el sureste de México y Centro América (Wood, 1982; Zuñiga et al. 2002). En México *D. frontalis* coloniza 24 de 47 especies (Salinas-Moreno et al., 2004). En estado epidémico, la población de este descortezador llega a causar la muerte de cientos de árboles ocasionando la pérdida de grandes extensiones de bosque de pino. En estado endémico las poblaciones de dicho descortezador logran coexistir junto con su árbol huésped (Berryman, 1982).

D. frontalis localiza a su árbol huésped a través de la orientación visual (Payne, 1986; Strom et al., 1999; Strom y Goyer, 2001), táctil (Strom et al., 1999), gustativa (McNee et al., 2000, 2003) y principalmente olfativa (DL Wood, 1982; Payne, 1986). Por lo que la comunicación intra e interespecífica de este descortezador se lleva a cabo a través de la detección de sustancias volátiles o semioquímicos (Payne et al., 1982), conocidos como kairomonas y feromonas, provenientes del huésped y del insecto, respectivamente (Dicke y Sabelis, 1988). Los semioquímicos son detectados a través de miles de células o sensilas que cubren las antenas de los descortezadores (Dickens y Payne, 1978).

De acuerdo a los estudios en poblaciones de descortezadores en el Sureste de Estados Unidos de América, *D. frontalis* coloniza un árbol huésped detectando como kairomona monoterpenos de la resina cuyo componente mayoritario es el α -pineno (2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] hept-2-eno) (Mirov,1961). Los monoterpenos se pueden encontrar en la resina de follaje, ramas (Niinements et al., 2002), y en el tronco del árbol de pino (Mirov, 1961). Los monoterpenos liberados del tronco juegan un papel importante en la comunicación química de los descortezadores ya que a través de ellos las hembras pioneras inician su dispersión y la localización del huésped (Renwick y Vité, 1969; Silverstein, 1970; Payne et al., 1978; McCarty et al., 1980; Borden, 1982; Billings, 1985; Miller y Borden, 2000; Seybold et al., 2006). Se ha hipotetizado que durante el proceso evolutivo, los descortezadores al tratar de desintoxicarse de los

compuestos presentes en la resina del árbol, lograron metabolizar parte de ellos y sus subproductos se convirtieron adaptativamente en feromonas (Hughes, 1973). Por lo que ciertos monoterpenos son precursores o están relacionados en la formación de feromonas (Renwick et al., 1973; Hughes, 1975; Smith et al., 1993; Farjon y Styles, 1997; Seybold y Vandewel, 2003).

Cuando las hembras han logrado penetrar la corteza del huésped inician la liberación de una cetona bicíclica conocida como frontalina (1,5-dimetil-6-8-dioxabicyclo [3.2.1] octano), una feromona producida *de novo* (Barkawi et al., 2003) que promueve la agregación de conoespecíficos y paralelamente el apareamiento (Kinzer et al., 1969; Pitman et al., 1969). Las hembras también producen un monoterpeno oxigenado, *trans*-verbenol (*trans*-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-ol) (Renwick, 1967), feromona que sinergiza la acción de la frontalina (Payne et al., 1978; Smith et al. 1993). Una vez que los machos se han apareado éstos inician la producción de una cetona bicíclica, *endo*-brevicomina (*endo*-7-etil-5-metil-6-8-dioxabicyclo [3.2.1]-octano) (Pitman et al., 1969; Silverstein, 1970; Sullivan et al., 2007) feromona producida *de novo* (Vanderwel y Oehlschlager, 1987) cuya función es múltiple, debido a que uno de sus enantiómeros sinergiza o incrementa la acción de la frontalina y el otro provoca la antiagregación de conoespecíficos (Vité et al., 1985). Tanto los machos como las hembras producen verbenona (4-metileno-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] hep-2-eno), un monoterpeno oxigenado que se ha reportado como inhibidor al reducir la acción de la frontalina (Payne et al., 1978; Salom et al., 1992), al igual que la *endo*-brevicomina, se ha reportado que la verbenona es una feromona multifuncional (Rudinsky, 1973). Cuando la colonización del huésped ha sido exitosa los insectos se establecen construyendo galerías y cámaras de oviposición para depositar ahí la generación de individuos que al emerger, colonizarán un nuevo árbol huésped.

La concentración, la tasa de liberación y la composición enantiomérica de las feromonas puede determinar un comportamiento específico como el aumentar, disminuir o inhibir la respuesta de atracción (Renwick y Vité, 1969 y 1970; Rudinsky, 1973; Rudinsky et al., 1974; McCarty et al., 1980; Billings, 1985), y en ciertas feromonas el efecto es multifuncional (Salom et al., 1992; Vité et al., 1985). Stewart et al. (1977) obtuvieron extractos de frontalina de hembras barrenando sobre *Pinus enchinata*. El

análisis cromatográfico y de espectrometría de masas de estos extractos mostró que el índice enantiomérico de la feromona de *D. frontalis* es (-) 85% : (+) 15% . Estudios usando electroantenografía (EAG), bio-ensayos en túneles de viento y trapeo en campo confirman el hecho de que individuos de *D. frontalis* son atraídos a ambas formas isoméricas de la frontalina, pero la respuesta se incrementa cuando se trata de (-) frontalina (Dickens y Payne, 1978).

Berisford et al. (1990) demostraron que la respuesta de *D. frontalis* de Virginia, Georgia y Texas en Estados Unidos de América es mayor hacia el extracto de volátiles de su misma población y menor al extracto de volátiles de otra población. En dicho trabajo también se reporta que la atracción que presentan las poblaciones de Virginia al extracto de volátiles de Georgia es mayor que a la de Texas, lo que parece indicar que la atracción al extracto de volátiles provenientes de diferentes poblaciones de *D. frontalis* es menor tanto más alejadas geográficamente se encuentren; los mismos autores sugieren que dichas diferencias pueden deberse a la cantidad y calidad específica de las feromonas liberadas en cada sitio de distribución de este descortezador.

La determinación enantiomérica de la *endo*-brevicomina producida por machos fue hecha por primera vez por Redlich et al. (1987), siendo ésta mayor hacia el enantiomero positivo en un 97%, resultados similares fueron obtenidos por Sullivan et al. (2007); mientras que Grossman et al. (1997) reportaron el índice quiral de la *endo*-brevicomina en machos y hembras de tres poblaciones geográficas. Sus resultados mostraron que en cuanto al porcentaje del enantiomero positivo, las hembras presentaron diferencias significativas (8.7, 12.1, y 21.1, en TX, SC, y NC, respectivamente), en contraste, los machos no tuvieron diferencias significativas (8.2, 24.5, y 0.0, en TX, SC, y NC, respectivamente).

En otras especies de descortezadores se ha comprobado la variación de la composición feromonal en poblaciones de diferentes sitios geográficos. Por ejemplo, *Ips pini* produce *de novo* (*R*)-(-) ipsdienol y (*S*)-(+) ipsdienol (Birch et al., 1980; Seybold y Tittiger, 2003). *I. pini* produce (*R*)-(-) ipsdienol en dos poblaciones geográficas, sin embargo una tercera población geográfica produce (*R*)-(-) ipsdienol y (*S*)-(+) ipsdienol en proporciones racémicas (Birch et al., 1980; Lanier et al., 1980). Lanier et al. (1972)

reportaron por primera vez para *Ips pini*, que la composición enantiomérica de su feromona de agregación (ipsdienol) varía entre poblaciones geográficas.

Por otra parte la frontalina y *endo*-brevicomina feromonas producidas *de novo*, tienen como precursor al 6-methyl-6-hepten-2-one (Barkawi et al., 2003) y 6-nonen-2-one (Vanderwel et al., 1992), respectivamente, sin embargo el origen de dichos precursores no es claro aún pero se ha supuesto que pueden tener un origen terpenoide (frontalina) (Vanderwel y Oehlschlager, 1987) proveniente del árbol huésped, así como también pueden ser originados por la asociación con hongos (*endo*-brevicomina) (Vanderwel et al., 1992).

De acuerdo a Perry (1991) los pinos son clasificados en tres grupos principales con respecto a la composición de la resina, de esta manera está el grupo de pinos Austral en donde se encuentran las especies de pino *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*, entre otras especies, los que secretan resina constituida principalmente por α -pineno y β -pineno; mientras que en el grupo Insignes se encuentran los pinos como *P. oocarpa* y *P. pringlei*, entre otras especies, los que producen resina compuesta por α -pineno y limoneno; y en el tercer grupo, Macrocarpae incluye a los pinos como *P. jeffreyi*, entre otras especies, los que producen resina con α -pineno y n-heptano.

Por otra parte, varios investigadores (Gerardo Zúñiga, del Instituto Politécnico Nacional, México; Lawrence Kirkendall de la Universidad de Bergen, Noruega; Brian Sullivan y Jane L. Hayes del Servicio Forestal del ARS-USDA, E.U.A.; y Jorge Macías de ECOSUR, México) han podido notar en la longitud corporal de individuos de *D. frontalis* la aparente existencia de dos tamaños diferentes, reconocidos aquí como morfo chico (MC) y morfo grande (MG). Estas observaciones vienen de comparaciones hechas entre individuos capturados en trampas cebadas con frontalina y una fuente de α -pineno, como de insectos emergidos y/o extraídos directamente de la corteza de árboles infestados, de Chiapas, México, Huhuetenango, Guatemala y en Belmopan, Belice. La aparente presencia de dos morfos de *D. frontalis* podría representar la existencia de dos especies diferentes de dicho descortezador.

Debido a que *D. frontalis* coloniza diferentes especies y grupos de pino a lo largo de su distribución geográfica; a que existe un aislamiento geográfico entre las poblaciones de la parte del Sureste de Estados Unidos de América; Arizona, Norte y

Centro de México; y Sureste de México y Centro América; a la evidencia sobre la variación geográfica del índice enantiomérico de una feromona producida de *novo* (ipsdienol) en otra especie de descortezador (Lanier et al., 1972; Miller et al., 1989; Miller et al., 1996); y a la aparente existencia de dos morfos de *D. frontalis* en el sureste de su distribución geográfica es razonable suponer que dichas poblaciones sureñas de *D. frontalis* presenten diferencias en la producción y composición feromonal con lo reportado para poblaciones del Sureste de Estados Unidos de América (Stewart et al., 1977; Grossman et al., 1997).

OBJETIVOS

General

Generar conocimiento básico acerca de la ecología química de *D. frontalis* y de los dos morfos identificados, a través de la determinación cuantitativa y cualitativa de la frontalina y la *endo*-brevicomina, en una población de *D. frontalis* distribuida en el sureste de México.

Particulares

1. Cuantificar la frontalina producida por hembras del morfo chico (MC) y morfo grande (MG) de *D. frontalis*.
2. Cuantificar la *endo*-brevicomina producida por machos y hembras del MC y MG de *D. frontalis*.
3. Determinar el índice enantiomérico de la frontalina producida por hembras del MC y MG, y de la *endo*-brevicomina producida por machos y hembras de ambos morfos de *D. frontalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Para la obtención de ejemplares vivos de *D. frontalis* y su alimentación, se derribaron 4 árboles infestados, y 4 árboles no infestados de *P. oocarpa* del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Trinitaria, Chiapas, México (16°06'45.7" N y 91°43' 56.6" OE a 1494 msnm). Los árboles fueron cortados entre los meses de agosto y diciembre del 2006, y sus troncos se trasladaron a los laboratorios de ECOSUR-Tapachula, Chiapas, México. Los troncos no infestados se trocearon a 30 cm de longitud, se etiquetaron y guardaron en bolsas nylon para conservarlos en refrigeración a no más de -2 °C, en donde se mantuvieron ahí hasta su uso. Los troncos infestados se trocearon a 75 cm de longitud y se introdujeron en jaulas de emergencia de 1 m³ a temperatura ambiente bajo sombra (entre 27°C y 35°C), las jaulas se revisaron diariamente para obtener los ejemplares emergidos de *D. frontalis*, separando a los individuos por sexo, a través de la presencia de tubérculos frontales prominentes en los machos (Osgood and Clark, 1963) y de la presencia del micangium en hembras (Barras, 1967), y por morfo, esto último se definido de acuerdo con su longitud corporal, el morfo chico (MC) incluyo insectos de longitud corporal menor a 3.9 mm, el morfo grande (MG) insectos mayores a 4.1 mm; insectos de 4 mm se descartaron para evitar error de separación. La longitud corporal de los insectos se obtuvo utilizando una caja petri cuadrículada cada 4 mm. Todos los insectos, por grupo, se colocaron en cajas petri (30 insectos por caja petri), con papel toalla humedecida y se guardaron en una hielera a no más de 10°C, hasta su uso.

Extracción de volátiles. Para asegurar la captura de volátiles se llevaron a cabo cuatro técnicas diferentes de extracción de volátiles. La primera técnica que se realizo fue mediante aireación estática usando la metodología aplicada por Sullivan (2005) pero modificada en este trabajo para la captura individual y directa de volátiles desde la entrada a la galería del descortezador (EG), para lo cual se usaron viales cónicos de 100 µl llenado a un centímetro de profundidad con adsorbente (poraq-Q de 50-80 mesh; SUPELCO) (Figura 1). Se capturaron volátiles de 1) tronco no infestado + hembra virgen del MC, 2) tronco no infestado + hembra virgen del MG, y 3) tronco no infestado + macho virgen del MC. Por falta de material no se trabajo un cuarto tratamiento con

machos del MG. En esta técnica la captura individual de volátiles de cada insecto represento una muestra. El número de muestras obtenidas dependieron de la disponibilidad de descortezadores emergentes.

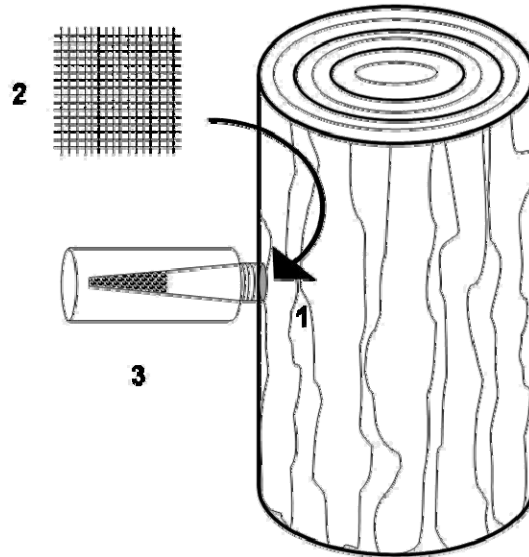


Figura 1. Método de captura de volátiles a través de aireación estática desde la entrada a la galería de un descortezador (EG). 1. Entrada a la galería de un descortezador, 2. Malla nylon de 2 cm^2 , entre la boca del vial y el orificio de entrada del descortezador. 3. Vial cónico con porapaq-Q (llenado a 1 cm de profundidad, aproximadamente).

Para facilitar la barrenación por los insectos sobre los troncos no infestados se hicieron orificios de 3 mm de diámetro, correspondiente al grosor de los insectos. Machos y hembras fueron confinados individualmente en cada orificio, por medio de una cápsula de gelatina. A partir del confinamiento las hembras de ambos morfos produjeron aserrín después 4 hr y los machos 6 y 24 hr. Posteriormente se sustituyó, en los 3 tratamientos, la cápsula de gelatina por un vial cónico incrustando éste directamente en la corteza. Para evitar que el aserrín producido por los insectos se introdujera en el interior del vial cónico, se colocó un trozo de malla nylon (Lumite, Woven Synthetic Fabrics con 0.5 mm de luz) de 2 cm^2 entre la entrada a la galería del descortezador y la boca del vial cónico. A manera de tratamiento control, se incrustaron viales cónicos en troncos no infestados y sin insectos. Después de 24 hr, a partir de incrustados todos los viales, éstos fueron retirados del tronco. Para evitar la contaminación de las muestras, los viales se

cubrieron con tapas cuyo empaque interior fue de teflón. Los volátiles fueron extraídos de los viales agregando 50 µl de una solución formada por hexano HPLC y acetato de heptilo (3.5 ng/µl), este último solvente fue utilizado como estándar interno (STDI), después de extraer una primera muestra líquida y de colocar ésta en un vial limpio de 2 ml, se agregaron 50 µl de hexano HPLC en el mismo vial cónico para extraer lo más posible todos los volátiles que hayan quedado en el adsorbente, finalmente la muestra de la segunda extracción se agregó a la muestra ya colocada en el vial de 2 ml. La muestra final obtenida fue de 100 µl, con una concentración de STDI de 1.75 ng/ul.

En una segunda técnica se colectaron de manera directa los volátiles emitidos por defecación por cada insecto (VI) ya alimentado mediante aireación estática (Sullivan 2005). Los insectos utilizados en esta técnica fueron los mismos utilizados durante la técnica GE, es decir, después de capturar los volátiles durante la barrenación de los troncos en la técnica GE, los insectos se extrajeron de los troncos y se emplearon en la técnica VI. Se colectaron individualmente volátiles de 1) hembras vírgenes del MC, 2) hembras vírgenes del MG y 3) machos vírgenes del MC. Como control se aplicó la misma metodología para la captura de volátiles de los insectos pero sin ellos. La extracción de volátiles se llevo a cabo de la misma manera que en la técnica GE. Al término de la extracción de volátiles en esta técnica, los insectos se conservaron individualmente en viales de plástico de 1 ml con alcohol al 70%.

El aserrín generado por cada insecto durante la técnica GE fue colectado y mezclado por tratamiento para aplicar la técnica tres (VA) y la técnica cuatro (ALV). El aserrín se pesó y se dividió en dos partes, cada una entre 0.05 g y 0.1 g. La primera parte (VA) se utilizó para capturar sus volátiles por medio de la técnica de extracción en fase sólida (SPME), con una fibra 100 µm de polydimetilsiloxano (SUPELCO, Toluca, México). La muestra de aserrín se colocó en un vial limpio de 4 ml, cuya boca se tapó con cinta teflón, la fibra se introdujo atravesando la cinta de teflón y se dejó expuesto a la muestra por 3 hr, a 25°C aproximadamente. Como control, se capturaron de la misma manera, los volátiles de una cantidad equivalente de aserrín producido por la acción de una broca sobre un tronco sano. La segunda parte del aserrín colectado (ALV) se colocó en un vial limpio de 4 ml con 100 µl de n-pentano HPLC durante 2 hr, después de este tiempo el disolvente fue recuperado y colocado en un vial limpio de 2 ml. Como

control se realizó el mismo procedimiento con aserrín obtenido por medio de una broca; a ambas muestras, lavado y control, se les agregó 50 µl de solución estándar utilizada en la técnica GE.

Análisis químico. Los extractos fueron analizados en un cromatógrafo de gases (VARIAN-SATURN 4D) con una columna con fase quiral (CHIRAL-DEX CB 25mX0.25 mm ID VARIAN) para obtener la cuantificación e identificación de enantiómeros. El cromatógrafo estaba acoplado a un espectrómetro de masas (VARIAN STAR 3400 CX-C6). El análisis se realizó en modo “splitless” programado a una temperatura inicial de 50°C durante 23.66 min, aumentando posteriormente 3°C por minuto, hasta alcanzar una temperatura de 220°C, en la que permaneció así durante 5 minutos. El flujo de la fase móvil se mantuvo a 12 psi. Para conocer el índice enantiomérico de los compuestos, se obtuvo el área de correlación bajo la curva de cada pico a través de la herramienta de integración manual del software. La suma de las áreas de cada pico correspondiente a cada enantiomero se llevo a 100% por lo que el índice enantiomérico se expreso en porcentajes. Para la cuantificación de las feromonas se utilizó la suma de los enantiómeros y el área de correlación del ISTD cuya concentración final fue de 1.75 ng/µl. Para confirmar la identidad de las feromonas analizadas se compararon los tiempos de retención y los espectros con una mezcla estándar de compuestos sintéticos (Aldrich, Pherotech, Albany Internacional, BASF, Acros, Chemical Simple, Co., y Fluka) conocidos para *D. frontalis*.

Análisis estadístico. Para identificar diferencias significativas entre las técnicas y entre los tratamientos, se aplico una prueba no paramétrica de Mann-Whitney ($\alpha= 0.05$). Para conocer las diferencias estadísticas entre el índice enantiomérico de cada técnica aplicada se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Todos los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS, ver 12.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de feromonas. Las hembras del MC (EG) produjeron individualmente 133.5 ng (\pm E.E.= 25.4) de frontalina y 2.1 ng (\pm E.E.= 0.7) de *endo*-brevicomina. Los machos del MC (EG) produjeron individualmente 2.0 ng (\pm E.E.=1.8) de *endo*-brevicomina, que no mostró diferencias significativas con las hembras del MC (Figura 2), la producción de este último compuesto, la *endo*-brevicomina, coincide con lo reportado en otros trabajos llevados a cabo con esta misma especie en otras latitudes (Grossman et al., 1997; Pureswaran et al., datos no publicados).



Figura 2. Cantidad promedio (\pm E.E) de *endo*-brevicomina producida por una población de *D. frontalis* del MC del Parque Nacional Lagos de Montebello, Chiapas, México. Barras con letras iguales no tienen diferencias significativas (Prueba de Mann-Whitney $U=0.547$; $\alpha=0.05$).

Numerosos estudios han reportado que la producción de *endo*-brevicomina esta asociada con machos (Pitman et al., 1969; Rudinsky et al., 1974; Hughes, 1973; Vanderwel et al., 1992; Grossman et al., 1997; Pureswaran et al., 2006; Sullivan et al., 2007), en contraste otros trabajos reportan que las hembras pueden producir esta feromona (Vanderwel et al., 1992; Grossman et al., 1997; Sullivan et al., 2007). Los resultados del presente estudio muestran que de 15 hembras que produjeron frontalina sólo 9 de ellas produjeron *endo*-brevicomina; una situación similar fue observada por Sullivan et al. (2007), quienes reportan que de 96 hembras solo 7 de ellas produjeron *endo*-brevicomina. El que las hembras puedan producir *endo*-brevicomina sugiere que la función de esta feromona producida por las hembras durante el proceso de colonización masiva todavía no es bien conocida.

Se realizó la cuantificación de frontalina y *endo*-brevicomina producida por hembras de ambos morfos en la técnica VI. Las hembras del MC, produjeron 171.5 ng (\pm E.E.= 58.3) de frontalina y 20.3 ng (\pm E.E.= 9.6) de *endo*-brevicomina. Las hembras del MG produjeron 333.4 ng (\pm E.E.= 80.9) de frontalina y 307.5 ng (\pm E.E.= 103.1) de *endo*-brevicomina. La producción de frontalina entre las hembras de ambos morfos no presento diferencias estadísticamente significativas mientras que si las hubo en la producción de *endo*-brevicomina (Figura 3), esto último sugiere que las diferencias podrían estar asociadas al tamaño, sin embargo, se ha comprobado que el tamaño corporal no tiene relación con la producción de feromonas (Pureswaran et al., 2006); esto mismo se aplica a la producción de frontalina, ya que no hubo diferencias estadísticas entre la frontalina producida por hembras de ambos morfos. Las diferencias observadas en la producción de una de las feromonas analizadas, *endo*-brevicomina y producida por hembras de cada morfo sugiere que podrían ser dos especies incipientes, sin embargo, es necesario realizar un análisis más completo de todos los volátiles liberados por morfo, así como llevar a cabo pruebas de comportamiento en campo para definir si se trata realmente de especies incipientes o sólo de dos morfotipos de *D. frontalis*.

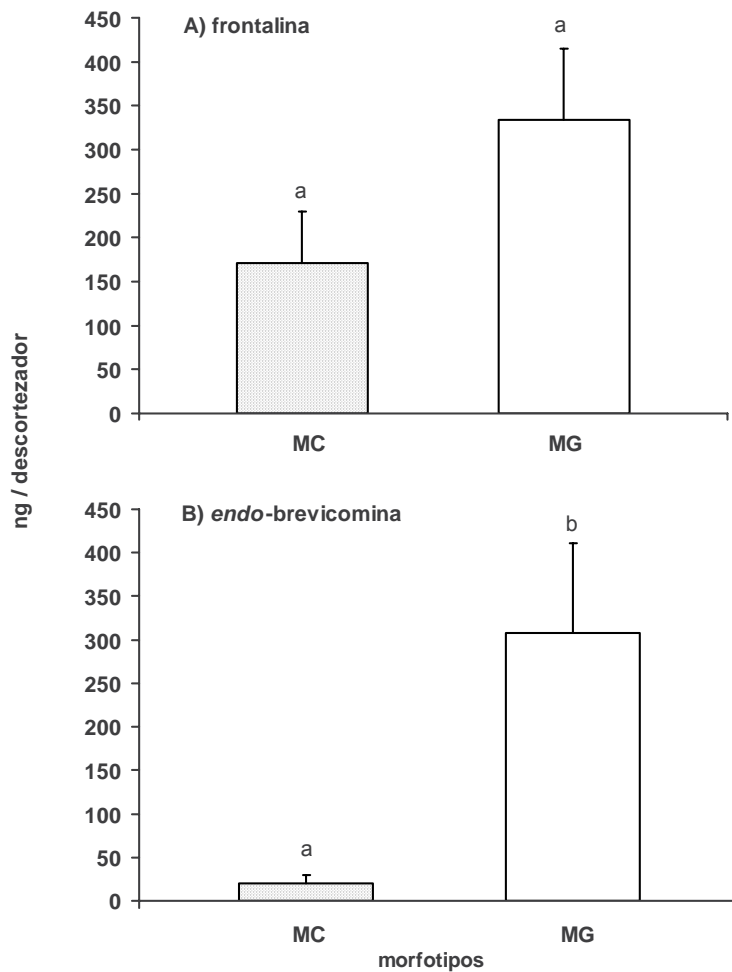


Figura 3. Cantidad promedio (\pm E.E) de frotalina y *endo-brevicomina* producidas por las hembras de ambos morfos de una población de *D. frontalis* del Parque Nacional Lagos de Montebello, Chiapas, México. MC, morfo chico; MG, morfo grande. Barras con letras iguales no tienen diferencias significativas. A) Prueba de Mann-Whitney $\alpha=0.05$ $U=0.140$; B) Prueba de Mann-Whitney $\alpha=0.05$ $U= 0.001$.

Índice enantiomérico de feromonas. El análisis químico de los volátiles producidos por hembras de *D. frontalis* del MC, reveló que el índice enantiomérico promedio de la frontalina (Tabla 1) es muy similar al índice enantiomérico [(+) 4.6% : (-) 95.4%]] reportado por Sullivan et al. (2007) para insectos de esta misma especie de Mississippi y Alabama en los EUA, pero diferente a [(+) 15% : (-) 85%]] lo reportado por Stewart et al. (1977) aunque no señalan la procedencia de los insectos, y a las proporciones reportadas por Grossman et al. (1997) en Texas [(+) 29.2% : (-) 70.8%], Sur [(+) 34.9% : (-)65.1%]] y Norte de Carolina [(+) 25.1% : (-) 74.9%].

TABLA 1 Índice enantiomérico de la frontalina y *endo-brevicomina* de *D. frontalis* del morfo chico en el Parque Nacional Lagos de Montebello, Chiapas, México

| | Técnica de extracción | n ¹ | hembras MC | | n ¹ | machos MC | |
|-------------------------|-----------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| | | | (+)% (± E.E.) | (-)% (± E.E.) | | (+)% (± E.E.) | (-)% (± E.E.) |
| frontalina | EG | 15/15 | 4.72 (0.5)a | 95.27 (0.5)a | 5/5 | 0 | 0 |
| | VI | 12/12 | 5.57 (0.6)a | 94.42 (0.6)a | 6/6 | 0 | 0 |
| | VA | 8/64 | 4.07 (0.3)a | 95.92 (0.3)a | NP | NP | NP |
| | ALV | 7/145 | 4.95 (0.6)a | 95.04 (0.6)a | NP | NP | NP |
| endo-brevicomina | EG | 9/15 | 100 (0) | ND | 5/3 | 100 (0) | ND |
| | VI | 10/12 | 100 (0) | ND | 6/5 | 100 (0) | ND |
| | VA | 8/46 | 100 (0) | ND | NP | NP | NP |
| | ALV | 12/320 | 100 (0) | ND | NP | NP | NP |

Valores dentro de cada columna con letras iguales no muestran diferencias significativas (ANOVA; F = 0.876; g. l. = 3; $\alpha=0.05$). n¹ = No. de muestras/Total de insectos muestreados. ND= No detectado, debajo del umbral de ruido o sin aparecer. NP- No probado.

La aparente diferencia en la composición enantiomérica de la frontalina de poblaciones geográficas (Stewart et al., 1977; Sullivan et al., 2007), incluyendo lo reportado en el presente trabajo, soporta en parte lo reportado por Berisford et al. (1990), quienes propusieron que las poblaciones geográficas de *D. frontalis* deberían presentar una variación en el índice enantiomérico de la frontalina.

Los machos de *D. frontalis* del MC produjeron *endo-brevicomina* con un índice enantiomérico dado en un mayor porcentaje por el enantiomero positivo (Tabla 1). El enantiomero negativo no se pudo distinguir aún por debajo del umbral de ruido probablemente debido a su baja abundancia o ausencia en las muestras, sin embargo siempre fue posible identificar en su totalidad el enantiomero positivo. Estos resultados concuerda con lo obtenido por Redlich et al. (1987), quienes reportan la presencia de (+)-*endo-brevicomina* en un 97% sin reportar el porcentaje del antípodo. Por el contrario Grossman et al. (1997) reportan un índice enantiomérico predominantemente por el enantiomero negativo. Esta baja definición de la presencia del enantiómero negativo en

nuestro estudio requiere de la obtención de una muestra concentrada de *endo-brevicomina* de cientos de insectos para confirmar la presencia o ausencia de (-)-*endo-brevicomina*.

El índice enantiomérico de la frontalina en hembras del MC y *endo-brevicomina* en machos y hembras del MC obtenido en las cuatro técnicas de extracción fue invariable (Tabla 1), ya que no hubo diferencias significativas en el índice obtenido en cada técnica. En general la captura de volátiles por los cuatro métodos fue relativamente fácil y rápida de obtener, sin embargo la técnica EG, ofrece la oportunidad de capturar los volátiles que se están generando por los insectos de manera más natural sin que esto represente un estrés para ellos. La técnica VI, ofrece la oportunidad de capturar e identificar fácilmente los compuestos producidos por los insectos sin ser enmascarados por los que provienen del huésped, ya que estos se obtienen en menor abundancia y suelen ser de mayor abundancia en los extractos obtenidos por aireación de descortezadores barrenando en su árbol huésped, lo que dificulta la identificación de los compuestos de los insectos, uno de los problemas más comunes cuando se intenta identificar las feromonas de interés. Las técnicas VA y ALV, son también buenas técnicas de extracción, sin embargo requieren de mas labor y en los dos últimos podría haber una pérdida de volátiles.

El análisis químico en cuanto al índice enantiomérico de volátiles también se realizó en muestras (VI) de insectos del MG, para saber si existía alguna diferencia comparado con el MC. El índice enantiomérico de la frontalina no presento diferencias significativas en hembras de ambos morfos (Tabla 2). El índice enantiomérico de la *endo-brevicomina* de machos y hembras del MG fue similar a lo reportado para los machos y hembras del MC. Estos resultados no son suficientes para sugerir que los morfos identificados son uno sólo.

TABLA 2 Índice enantiomérico de la frontalina y *endo-brevicomina* de dos morfos de *D. frontalis* en el Parque Nacional Lagos de Montebello, Chiapas, México

| | n ¹ | MC | | n ¹ | MG | |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| | | (+)% (± E.E.) | (-)% (± E.E.) | | (+)% (± E.E.) | (-)% (± E.E.) |
| frontalina | 12/12 | 4.57 (0.6)a | 95.42 (0.6)a | 12/12 | 3.86 (0.6)a | 96.13 (0.6)a |
| endo-brevicomina | 9/12 | 100 (0) | ND | 12/12 | 100 (0) | ND |

Valores dentro de cada columna con letras iguales no muestran diferencias significativas (Mann-Whitney U=0.932; $\alpha=0.05$). n¹ = No. de insectos en los que se detectaron los semioquímicos/No. de insectos muestreados. ND=No detectado, debajo del umbral de ruido o sin aparecer, NP- No probado.

El índice de liberación de feromonas es una parte importante en la comunicación de varias especies de descortezadores, ya que se ha comprobado que feromonas como la *endo-brevicomina* juegan un papel multifuncional en el proceso de colonización masiva para muchas especies de descortezadores del genero *Dendroctonus*, por lo que es importante la cuantificación de dicha feromona.

Por otro lado la separación *a priori* de dos morfos de *D. frontalis* basada en su longitud corporal y la diferencia en la producción de *endo-brevicomina* entre los morfos sugieren la existencia en Chiapas de dos poblaciones de *D. frontalis*. De manera preliminar sabemos que no hay diferencias en el número cromosómico, ni en las secuencias del citocromo oxidasa I del DNA mitocondrial entre ambos morfos (G. Zúñiga com. personal), sin embargo Kirkendall y Hayes (datos no publicados) obtuvieron mediante análisis de DNA que estos dos morfos son diferentes, reconociendo al morfo grande como *D. woodii*. Debido a que hay información poco clara al respecto y sin publicarse aún es necesario continuar con la caracterización de estas poblaciones, realizando estudios genéticos complementarios, obteniendo e identificando el total de los volátiles liberados por cada morfo, y realizando pruebas de comportamiento en campo, para poder obtener las diferencias reales entre estos dos morfos.

En un estudio con descortezadores del género *Ips*, Borden (1982) señaló que la especificidad enantiomérica refleja un proceso por el cual individuos de una población que pertenecen a una misma especie, llegan a separarse de manera parcial, al presentar diferencias como la variación en la composición de su feromona. De acuerdo a lo anterior esta diferenciación entre las hembras de ambos morfos identificados en este trabajo, no se está dando puesto que la composición enantiomérica de sus feromonas es idéntica, pero si existe la diferenciación en la producción de una de sus feromonas, que suponen que dos poblaciones de *D. frontalis* se mantienen separadas por el recurso o inclusive para asegurar un aislamiento reproductivo. Por lo que se requiere realizar estudios sobre la distribución espacial de ambos morfos, además de identificar el huésped en donde cada morfo es más abundante, puesto que en nuestro estudio sólo se trabajó con una especie de pino, en donde el número de insectos emergentes del MG, no fue abundante en comparación con el MC.

Finalmente, se considera que el conocimiento básico sobre la producción y el índice enantiomérico de la frontalina y de la *endo*-brevicomina, provisto por este trabajo representa una ventaja importante aplicado al conocimiento sobre la fluctuación real poblacional de *D. frontalis* que se encuentra en la parte sur de México, puesto que permite adecuar las técnicas de monitoreo aplicadas actualmente, las cuales están basadas en técnicas adecuadas al monitoreo de poblaciones de *D. frontalis* distribuidas en el sureste de Estados Unidos de América. Aunado a lo anterior los resultados reportados por este trabajo, permiten interpretar las bajas capturas obtenidas mediante trampas cebadas con compuestos comerciales (a base de frontalina racémica) en la parte sur de México (registros no publicados).

BIBLIOGRAFÍA

- BARKAWI, L. S., FRANCKE, W., BLOMQUIST, G.J., y SEYBOLD, S. J. 2003. Frontalin: de novo biosynthesis of an aggregation pheromone component by *Dendroctonus* spp. bark beetles (COLEOPTERA: Scolytidae). *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33:773-788.
- BARRAS, S. J. 1967. Thoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) is synonymous with a secondary females character. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60:486-487.
- BERISFORD, C. W., PAYNE, T. L., y BERISFORD, Y. C. 1990. Geographical variation in response of southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) to aggregating pheromones in laboratory bioassays. *Environ. Entomol.* 19:1671-1674.
- BERRYMAN, A. A. 1982. Population dynamics of bark beetles, pp. 304-314, in J. B. Mitton y K. B. Sturgeon (eds.). *Bark beetles in North American conifers a system for the study of evolutionary biology*. University de Texas Press, Austin.
- BILLINGS, R. F. 1985. Southern pine bark beetles and associated insects: effects of rapidly-released host volatiles on response to aggregation pheromones. *Applied Entomology* 99:483-491.
- BIRCH, M. C., SVIHRA, P., PAINE, T. D., y MILLER, J. C. 1980. Influence of chemically mediated behavior on host tree colonization by four cohabiting species of bark beetles. *J. Chem. Ecol.* 6:395-414.
- BORDEN, J. H. 1982. Aggregation pheromones, pp. 74-139, in J. B. Mitton y K. B. Sturgeon (eds.). *Bark beetles in North American conifers, a system for the study of evolutionary biology*. University of Texas Press, Austin.
- DICKE, M. y SABELIS, M. W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional Ecol.* 2:131-139.
- DICKENS, J. C. y PAYNE, T. L. 1978. Structure and function of the sensilla on the antennal club of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* (Zimmerman) (Coleoptera: Scolytidae). *Int. J. Insect. Morpho. & Embryol.* 7:251-265.
- FARJON, A. y STYLES, B. T. 1997. Flora neotropica: *Pinus* (Pinaceae). Published for Organization for Flora Neotropica. *Monograph* 75:291.

- GROSSMAN, D. M., SALOM, S. M., WILLIAM RAVLIN, F., y YOUNG, R. W. 1997. Geographic and gender differences in semiochemicals in emerging adult southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:438-446.
- HUGHES, P. R. 1973. *Dendroctonus*: production of pheromones and related compounds in response to host monoterpenes. *Z. Angew. Entomol.* 73:294-12.
- HUGHES, P. R. 1975. Pheromones of *Dendroctonus*: origin of α -pinene oxidation products present in emergent adults. *J. Insect Physiol.* 21:687-691.
- KINZER, G. W., FENTIMAN, A. F. Jr., PAGE, T. F., FOLTZ, R. L., VITÉ, J. P., y PITMAN, G. B. 1969. Bark beetle attractants: Identification, synthesis and field bioassay of a new compound isolated from *Dendroctonus*. *Nature* 221:477-478.
- McCARTY, F. A., BILLINGS, P M., RICHERSON, J. V., PAYNE, T. L., y EDSON, L. J. 1980. Response of the southern pine beetle to behavioral chemicals in the laboratory. *J. Georgia Entomol. Soc.* 15:307-317.
- McNEE, W.R., WOOD, D. L., y STORER, A. J. 2000. Pre-emergence feeding in bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.* 29:495-501.
- McNEE, W.R., BONELLO, P., STORER, A. J. WOOD, D. L., y GORDON, T. R. 2003. Feeding response of *Ips paraconfusus* to phloem metabolites of *Heterobasidion annosum*-inoculated ponderosa pine, *Pinus ponderosa*. *J. Chem. Ecol.* 29:1183-1201.
- MILLER, D.R., BORDEN, J. H., y SLESSOR, K. N. 1989. Inter- and intrapopulation variation of the pheromone, ipsdienol produced by male pine engravers, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.* 15:233-247.
- MILLER, D. R., BORDEN, J. H., y SLESSOR, K. N. 1996. Enantiospecific pheromone production and response profiles for populations of pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae), in British Columbia. *J. Chem. Ecol.* 22:2157-2172.
- MILLER, D. R. y BORDEN, J. H. 2000. Dose-dependent and species-specific responses of pine bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) to monoterpenes in association with pheromones. *Can. Entomol.* 132:183-195.
- MIROV, N. T. 1961. Composition of gum turpentine of pines. U. S. Department of Agriculture Forest Service. Technical Bulletin No. 1239.

- NIINEMENTS, Ü., REICHSTEIN, M. STAUDT, M., SEUFERT, G., y TENHUNEN, J. D. 2002. Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*. *Plant. Physiol.* 130:1371-1385.
- LANIER, G. N., BIRCH, M.C, SCHMITZ, R. F., y FURNISS, M. M. 1972. Pheromones of *Ips pini* (Coleoptera: Scolytidae): variation in response among three populations. *Can. Entomol.* 104:1917-1923.
- LANIER, G. N., CLAEISSON, A., STEWART, T. E., PISTON, J. J., and SILVESTAIN, R. M. 1980. The basis for interpopulational differences in pheromone biology. *J. Chem. Ecol.* 6:677-687.
- OSGOOD, E. A. and CLARK, E. W. 1963. Methods of sexing and sex ratios of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimm. *Can. Entomol.* 95: 1106-1109.
- PAYNE, T. L., COSTER, J. E., RICHERSON, J. V., EDSON, L. J., y HART, E. R. 1978. Field response of the southern pine beetle to behavioral chemicals. *Environ. Entomol.* 7:578-582.
- PAYNE, T. L., RICHERSON, J. V., DICKENS, J. C., WEST, J. R., MORI, K., BERISFORD, C. W., HEDDEN, R. L., VITÉ, J. P., y BLUM, M. S. 1982. Southern pine beetle: Olfactory receptor and behavior discrimination of enantiomers of the attractant pheromone frontalin. *J. Chem. Ecol.* 8:873-881.
- PAYNE, T. L. 1986. Olfaction and vision in host finding by a bark beetle, pp. 111-116, in T. L. Payne, M. C. Birch y C.E. J. Kennedy (eds.). *Mechanisms in insect olfaction*. Oxford: Clarendon Press.
- PERRY, J. P. 1991. *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon.
- PITMAN, G. B., VITÉ, J. P., KINZER, G. W., y FENTIMAN, A. F. Jr. 1969. Specificity of population-aggregating pheromones in *Dendroctonus*. *J. Insect Physiol.* 15:363-366.
- PURESWARAN, D. S., SULLIVAN, B. T., y AYRES, M. P. 2006. Fitness consequences of pheromones production and host selection strategies in a tree-killing bark beetle (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Oecologia* 148:720-728.

- REDLICH, H., BRUNS, W., FRANCKE, W., SCHURIG, V., PAYNE, T. L., y VITÉ, J. P. 1987. Identification of the absolute configuration of *endo*-brevicomín from *Dendroctonus frontalis*. *Tetrahedron* 43:2029-2034.
- RENWICK, J. A. A. 1967. Identification of two oxygenated terpenes from the bark beetles *Dendroctonus frontalis* and *Dendroctonus brevicomis*. *Contribution of Boyce Thompson Institute* 23:355-360.
- RENWICK, J. A. A. y VITE, J. P. 1969. Bark beetle attractants: Mechanism of colonization by *Dendroctonus frontalis*. *Nature* 224:1222-1223.
- RENWICK, J. A. A., y VITE, J. P. 1970. Systems of chemical communication in *Dendroctonus*. *Contribution of Boyce Thompson Institute* 24:283-292.
- RENWICK, J. A. A., HUGHES, P. R., y TANLETIN, D. T. Y. 1973. Oxidation products of pinene in the bark beetle *Dendroctonus frontalis*. *J. Insect Physiol.* 19:1735-1740.
- RUDINSKY, J. A. 1973. Multiple functions of the southern pine beetle verbenone. *Environ. Entomol.* 2:511-514.
- RUDINSKY, J. A., MORGAN, M. E., LIBBEY, L. M., y PUTNAM, T. B. 1974. Antiaggregative-rivalry pheromone of the mountain pine beetle and a new arrestant of the southern pine beetle. *Environ. Entomol.* 3:90-98.
- SALINAS-MORENO, Y., MENDOZA, M. G., BARRIOS, M. A., CISNEROS, R., MACÍAS-SÁMANO, J. E., y ZUÑIGA, G. 2004. Areography of the genus *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Mexico. *J. Biogeogr.* 31:1163-1177.
- SALOM, S. M., DALUSKY, M. J., BERISFORD, C. W., y SHAVER, T. N. 1992. Effect of verbenone enantiomers and racemic *endo*-brevicomín on response of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) to attractant-baited traps. *Can. J. For. Res.* 22:925-931.
- SEYBOLD, S. J. y VANDERWEL, D. 2003. Biosynthesis and endocrine regulation of pheromone production in the coleopteran, pp. 137-199, in G. Blomquist y R. Vogt (eds.). *Insect pheromone biochemistry and molecular biology: the biosynthesis and detection of pheromone*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- SEYBOLD, S. J. y TITTIGER, C. 2003. Biochemistry and molecular biology of *de novo* isoprenoid pheromone production in the Scolytidae. *Annu. Rev. Entomol.* 48:425-453.

- SEYBOLD, S. J., HUBER, D. P. W., LEE, J. C., GRAVES, A. D., y BOHLMANN, J. 2006. Pine monoterpenes and pine bark beetles: a marriage of convenience for defense and chemical communication. *Phytochem Rev.* 5:143-178.
- SILVERSTEIN, R. M. 1970. Attractant pheromones of coleopteran, pp. 21-40, *in* M. Beroza (ed.). Chemicals controlling insect behavior. Academic press, New York.
- SMITH, M. T., SALOM, S. M., y PAYNE, T. L. (eds.). 1993. The southern pine bark beetle guild: An historical review of the research on the semiochemical-based communication system of the five principal species. Virginia Agricultural Experiental Station Bulletin No. 93.
- STEWART, T. E., PLUMMER, E. L., McCANDLESS, L. L., WEST, J. R., y SILVERSTEIN, R. M. 1977. Determination of enantiomer composition of several bicyclic ketal insect pheromone components. *J. Chem. Ecol.* 3:27-43.
- STROM, B. L., ROTON, L. M., GOYER, R. A., y MEEKER, J. R. 1999. Visual and semiochemical disruption of host finding in the southern pine beetle. *Ecological Applications* 9:1028-1038.
- STROM, B. L. y GOYER, R. A. 2001. Effect of silhouette color on trap catches of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94:948-953.
- SULLIVAN, T. 2005. Electrophysiological and behavioral responses of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae) to volatiles isolated from conspecifics. *J. Econ. Entomol.* 98:2067-2078.
- VANDERWEL, D. y OEHLISCHLAGER, A. C. 1987. Mechanism of brevicomin biosynthesis from (Z)-6-nonen-2-one-2 in bark beetle. *J. Am. Chem. Soc.* 14:5081-5086.
- VANDERWEL, D., GRIES, G., SINGH, S. M., BORDEN, J.H, y OEHLISCHLAGER, A.C. 1992. (E)- and (Z)-6 nonen-2-one: biosynthetic precursors of *endo*- and *exo*-brevicomine in two bark beetle (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem Ecol.* 18:1389-1404.
- VITÉ, J. P., BILLINGS, R. F., WARE, C. W., y MORI, K. 1985. Southern pine beetle: Enhancement or inhibition of aggregation response mediated by enantiomers of *endo*-brevicomine. *Naturwiss.* 72:99-100.

- 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.
- WOOD, S. L., 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. Brigham Young University, Provo, Utah.
- ZUÑIGA, G., CISNEROS, R., HAYES, J. L., y MACIAS-SAMANO, J. 2002. Karyology, geographic distribution and origin of the genus *Dendroctonus* Erischson (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95:267-275.

ANEXO 1.

ARTÍCULO EDITADO Y ENVIADO AL JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY

Editorial Manager(tm) for Journal of Chemical Ecology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: ENANTIOMERIC RATIOS AND CHEMICAL QUANTIFICATION OF FRONTALIN AND ENDO-BREVICOMIN IN A *Dendroctonus frontalis* Zimm. (Coleoptera: Curculionidae) POPULATION FROM SOUTHERN MEXICO

Article Type: Original Research

Section/Category:

Keywords: Semiochemicals; chemical communication; pheromones; bark beetles; geographic variation; morphs.

Corresponding Author: Miss Alicia Niño,

Corresponding Author's Institution: ECOSUR

First Author: Alicia Niño

Order of Authors: Alicia Niño; Jorge E Macías-Sámamo, Dr; Brian T Sullivan, Dr; Leopoldo Cruz-López, Dr; Gerardo Zúñiga, Dr; Julio C Rojas, Dr

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 ENANTIOMERIC RATIOS AND CHEMICAL QUANTIFICATION OF
2 FRONTALIN AND ENDO-BREVICOMIN IN A *Dendroctonus frontalis* Zimm.
3 (Coleoptera: Curculionidae) POPULATION FROM SOUTHERN MEXICO

4
5
6
7 ALICIA NIÑO D.^{1, *}, JORGE MACÍAS S.¹, BRIAN SULLIVAN², LEOPOLDO
8 CRUZ-LÓPEZ¹, GERARDO ZÚÑIGA³, AND JULIO C. ROJAS¹

9
10 ¹ *El Colegio de la Frontera Sur, Carr. Antiguo Aeropuerto Km. 2.5, Tapachula,*
11 *Chiapas, CP 30700, México*

12
13 ² *USDA, Forest Service, Southern Research Station, 2500 Shreveport hwy,*
14 *Pineville, LA 71360, USA*

15
16 ³ *Instituto Politécnico Nacional, Lago Texcoco No. 22 Col. Anahuac C.P. 11320,*
17 *Delegación Miguel Hidalgo México Distrito Federal*

1
2
3
4 26 **Abstract-***D. frontalis* use host volatiles (kairomones) and pheromones to locate
5
6 27 and colonize host trees. The aggregation pheromone frontalin is produced by
7
8 28 females and *endo*-brevicomin is produced by males. Individuals of *D. frontalis*
9
10 29 from a population from Southern Mexico were segregated into two distinct body-
11
12 30 length groups, a large morph (LM) with a body-length larger than 4.1 mm and a
13
14 31 small morph (SM) with a body-length smaller than 3.9 mm. Volatiles from
15
16 32 mining SM females and males and LM females were extracted 24 hr using
17
18 33 headspace static aeration and analyzed chemically by GC-MS. SM females
19
20 34 produced, $133.5 \pm 25.7\text{SE}$ ng frontalin and $2.1 \pm 0.7\text{SE}$ ng *endo*-brevicomin. SM
21
22 35 males did not differ from females in *endo*-brevicomin production with $2.0 \pm$
23
24 36 1.8SE ng. LM females produced $333.4 \pm 80.9\text{SE}$ ng frontalin and $307.5 \pm$
25
26 37 103.13SE ng *endo*-brevicomin, this last compound amount was statistically
27
28 38 different from SM females. The enantiomeric ratio of frontalin from females of
29
30 39 both morphs did not differ statistically with average values of (+) 4.6 %:(-) 95.4%
31
32 40 $\pm 0.6\text{SE}$ for SM and (+) 3.9 %:(-) 96.1% $\pm 0.6\text{SE}$ for LM. *Endo*-brevicomin from
33
34 41 females of the two morphs and males of the SM was in excess of the positive
35
36 42 enantiomer. Our results suggest that an enantiomeric variation of pheromones
37
38 43 occurs between distant populations and indicates size-related variation in
39
40 44 pheromone production by *D. frontalis* in southern Mexico.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51
52 47 **Key Words**—Semiochemicals, chemical communication, pheromones, bark
53
54 48 beetles, geographic variation, morphs.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 51 INTRODUCTION
5
6 52
7
8 53 *Dendroctonus frontalis* Zimm (Coleoptera: Curulionidae) is a conifer bark beetle
9
10 54 that is considered to be the most important pest of pines in the southeastern
11
12 55 United States, Mexico and Central America. This bark beetle can rapidly kill
13
14 56 large numbers of trees and often disrupts forest management and local
15
16 57 economies (Berryman, 1982). Host colonization by this species is mediated by
17
18 58 chemical attractants released by the host tree (kairomones), mainly
19
20 59 monoterpenes, and by pheromones released by the insect themselves,
21
22 60 particularly frontalin (1,5-dimethyl-6-8-dioxabicyclo [3.2.1] octane) (Kinzer et al.,
23
24 61 1969; Hughes, 1976) and *endo*-brevicommin (*endo*-7-ethyl-5-methyl-6-8-
25
26 62 dioxabicyclo [3.2.1]-octane) (Silverstein, 1970; Sullivan et al., 2007).
27
28
29
30
31 63 *D. frontalis* females produce frontalin (Kinzer et al., 1969; Pitman et al.,
32
33 64 1969), while males produce *endo*-brevicommin (Silverstein, 1970; Hughes, 1973;
34
35 65 Vanderwel et al., 1992). The precise proportions, concentration and/or
36
37 66 enantiomeric ratios of pheromones could determine a specific behavior in bark
38
39 67 beetles such as promoting, increasing, decreasing or inhibiting the aggregation
40
41 68 (Renwick and Vite, 1969; Rudinsky, 1973; Rudinsky et al., 1974; McCarty et al.,
42
43 69 1979; Billings, 1985). Some pheromones are multifunctional (Salom et al.,
44
45 70 1992). Vité et al. (1985) reported that (+)-*endo*-brevicommin increases *D. frontalis*
46
47 71 attraction to a mixture of frontalin and α -pinene, while the reverse occurred with
48
49 72 (-)-*endo*-brevicommin. Stewart et al. (1977) determined the enantiomeric ratio of
50
51 73 frontalin for *D. frontalis* to be finding a (+) 15%: (-) 85% and demonstrated a
52
53 74 greater attraction to the negative enantiomer.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 75 Berisford et al. (1990) demonstrated that volatiles extracts from *D. frontalis*
5
6 76 are less attractive to beetles from distant populations than to beetles from the
7
8 77 same population. These authors also suggested that these results were due to
9
10 78 quantity and quality of pheromones, this phenomenon has been reported for
11
12 79 other bark beetles. For example Lanier et al. (1980) and Miller et al. (1996)
13
14 80 reported geographic variation in the enantiomeric composition of the
15
16 81 pheromone ipsdienol among different populations of *Ips pini* (Say).
17
18
19

20 82 Populations of *D. frontalis* in Chiapas, Mexico and Central America are
21
22 83 geographically isolated by Isthmus of Tehuantepec from northerly population
23
24 84 (Wood, 1982; Salinas-Moreno et al., 2004). Several researchers (Midtgaard and
25
26 85 Thunes, 2003; Sullivan et al., personal communication) had noticed that some
27
28 86 individuals from Belize, Guatemala and Chiapas, Mexico had a noticeable
29
30 87 larger size than those more “common” smaller size *D. frontalis*.
31
32

33 88 Since *D. frontalis* has a very wide geographic distribution, that populations
34
35 89 from Chiapas are discontinuous with Northern populations and that evidence
36
37 90 exist for geographical variation in the enantiomeric ratio of some bark beetle
38
39 91 aggregation pheromones (Lanier et al. 1980; Miller et al., 1989; Miller et al.,
40
41 92 1996), we hypothesized that populations in the extreme southern parts of *D.*
42
43 93 *frontalis* range must possess pheromone enantiomeric ratios that differ from
44
45 94 those reported for the Southeastern United States (Stewart et al., 1977). This
46
47 95 study quantified and determined the enantiomeric ratios of frontalin and *endo-*
48
49 96 *brevicommin* from individuals of “more common” smaller size and larger size *D.*
50
51 97 *frontalis* from Southern Mexico.
52
53
54
55

56 98
57
58
59 99
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 100 METHODS AND MATERIALS
5
6 101
7
8 102 *Biological Material.* Live *D. frontalis* were obtained from four infested and
9
10 103 feeding material from four uninfested *Pinus oocarpa* (Schiede) in Lagunas de
11
12 104 Montebello National Park, Trinitaria, Chiapas, México (16°06'45.7" N y 91°43'
13
14 105 56.6" W a 1494 msl). Trees were collected in August and December, 2006 and
15
16 106 were taken to the laboratory in Tapachula, Chiapas, Mexico. Uninfested trees
17
18 107 were cut in to 30 cm long bolts and held in cold storage (-2°C) until use.
19
20 108 Infested trees were cut in to 75 cm long bolts and held in emergence cages at
21
22 109 room temperature (27 to 35°C). Insects were collected daily, separated by sex
23
24 110 using the male prominence of the frontal tubercles (Osgood and Clark, 1963)
25
26 111 and female mycangium characters (Barras, 1967), and kept them in petri dishes
27
28 112 with moistened paper towel at 10°C until use. Since we notice that there was
29
30 113 insects that could be separated in a body-length up and down of 4 mm, beetles
31
32 114 with a body length less than 3.9 mm (SM, small morph) were separated from
33
34 115 those with larger than 4.1 mm (LM, large morph). Insects with a body length of 4
35
36 116 mm were not used.
37
38 117 *Volatile Extraction.* Volatiles were captured using a modified Sullivan's
39
40 118 (2005) headspace static aeration technique to capture volatiles directly from
41
42 119 individual gallery entrances ("gallery aeration"), using 100 µl conical vials with a
43
44 120 1 cm depth of clean Porapaq-Q adsorbent (50-80 mesh; SUPELCO) in theirs tip
45
46 121 (Figure 1), of either virgin LM females (T1), virgin SM females (T2), or virgin
47
48 122 SM males (T3) boring into an uninfested log; and from artificial entrances on
49
50 123 (T4). LM males were not available in the necessary numbers. To encourage
51
52 124 boring activity by the insects, 3 mm of diameter holes were drilled into the bark
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 125 until before touch phloem before introduce of beetles. Insects were introduced
5
6 126 individually into each hole and confined on the bark inside one half of a gelatin
7
8 127 capsule. After beetles began producing frass (4 hr for females and 6 to 24 hr for
9
10 128 males) all gelatin capsules were replaced by conical vials, threaded directly into
11
12 129 the outer bark. To prevent frass entering the vials, a piece of nylon mesh
13
14 130 (Lumite, Woven Synthetic Fabrics) was fitted between the vial's rim and the
15
16 131 gallery entrance (Figure 1). In the control treatment (T4), conical vials were
17
18 132 installed over drill holes without insects, removed after 24 hr and immediately all
19
20 133 conical vials were sealed with Teflon lined caps.
21
22

23
24 134 Volatiles were extracted from the vials sequentially with 50 μ l of a solution
25
26 135 of HPLC grade hexane spiked with heptyl acetate (3.5 ng/ μ l) as an internal
27
28 136 standard (ISTD) followed by 50 μ l of non-spiked HPLC grade hexane.
29
30

31 137 Additionally, volatiles were captured using the unmodified Sullivan's (2005)
32
33 138 headspace static aeration technique to target volatiles arising from feces of
34
35 139 individual previously fed beetles ("beetle aeration"). Insects were excised after
36
37 140 feeding 24 hr into a pine bolt as previously described. These insects in the
38
39 141 following treatments were held individually for 24 hr in prepared conical vials:
40
41 142 SM virgin females (T5), LM virgin females (T6), SM virgin males (T7) and as a
42
43 143 control similar those with the insects (T8). Beetles were removed from vials and
44
45 144 volatile extraction was performed as described above for the "gallery aeration"
46
47 145 technique. All insects used in "beetle aeration" technique were individually
48
49 146 preserved 70% alcohol.
50
51

52
53 147 *Chemical Analyses.* All extracts were analyzed on a GC-MC (VARIAN-
54
55 148 SATURN 4D, VARIAN STAR 3400 CX-C6) fitted with a chiral column (CHIRAL-
56
57 149 DEX CB 25mX0.25 mm ID VARIAN). Analyses were run in splitless mode, with
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 150 a temperature program of 50 °C for 23.66 min, then increased 3°C/min until up
5
6 151 to 220 °C, then held for 5 min. Inlet pressure was maintained at 12 psi.
7
8 152 Enantiomeric ratios were obtained by dividing the integration area of each
9
10 153 enantiomer peak by the sum of areas of both peaks (100%). In order to quantify
11
12 154 pheromones, the sum of enantiomers and the area under the curve of the ISDT
13
14 155 was used. To confirm pheromone, identity retention times and mass spectra
15
16 156 were compared to those commercially-obtained synthetic compounds (Aldrich,
17
18 157 Pherotech, Albany Internacional, BASF, Acros, Chemical Simple, Co., and
19
20 158 Fluka).

21
22
23
24 159 *Statistical Analysis.* To identify significant differences between techniques
25
26 160 and treatments, we performed no-parametric *Mann-Whitney* test ($\alpha = 0.05$). All
27
28 161 data were analyzed with SPSS, Ver. 12.0 package.
29
30

31 162

32 33 163 RESULTS AND DISCUSSION

34
35 164 *Pheromone Quantification.* SM females (“gallery aeration”) produced 133.5
36
37 165 ± 25.7 SE ng frontalin and 2.1 ± 0.7 SE ng *endo-brevicomin*. SM males (“gallery
38
39 166 aeration”) produced 2.0 ± 1.8 SE ng *endo-brevicomin* which did not differ
40
41 167 statistically from SM females (*Mann-Whitney test* $U=0.55$; $P=0.05$). These are
42
43 168 similar to amount reported for this species in other latitudes (Grosman et al.,
44
45 169 1997; Pureswaran et al., unpublished data). Numerous works have reported
46
47 170 *endo-brevicomin* production in males *D. frontalis* (Pitman et al., 1969; Rudinsky
48
49 171 et al., 1974; Hughes, 1973; Vanderwel et al., 1992; Pureswaran et al., 2006;
50
51 172 Sullivan et al., 2007), while a few have reported that females also can produce
52
53 173 this pheromone in small amounts (Vanderwel et al., 1992; Sullivan et al., 2007).
54
55 174 All 15 sampled females produced frontalin but only 9 produced *endo-brevicomin*
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 175 in detectable quantities. Sullivan et al. (2007) reported that 7 out of 96 females
5
6 176 produced the pheromone. The fact that females produce *endo*-brevicommin
7
8 177 suggests that its function in host colonization is still not entirely clear.
9

10
11 178 Using “beetle aeration” technique, we isolated $171.52 \pm 58.3\text{SE}$ ng
12
13 179 frontalin and $20.7 \pm 9.6\text{SE}$ ng *endo*-brevicommin from SM females and $333.4 \pm$
14
15 180 80.9SE ng frontalin and $307.5 \pm 103.1\text{SE}$ ng *endo*-brevicommin from LM females.
16
17 181 Frontalin production by females was not statistically different between morphs,
18
19 182 but the contrary occurred for *endo*-brevicommin (Figure 2), suggesting that
20
21 183 differences in pheromone production could be associated with body size.
22
23 184 However a study with a population in the southeastern of United States showed
24
25 185 that body size of *D. frontalis* is not correlated to pheromone production
26
27 186 (Pureswaran et al., unpublished data). Hence the differences we observed in
28
29 187 *endo*-brevicommin production between both size morphs in Chiapas further
30
31 188 suggest the possible existence of an incipient species in this region, but more
32
33 189 complete volatile analysis are needed for each morph and several behavioral
34
35 190 field test too, in order to define an incipient species or two morph types of *D.*
36
37 191 *frontalis*.
38
39
40
41

42 192 *Pheromone Enantiomeric Ratios.* The average enantiomeric ratio of
43
44 193 frontalin obtained with “gallery aeration” technique from SM females (Table 1)
45
46 194 was similar to Sullivan et al. (2007) reported for *D. frontalis* from Mississippi
47
48 195 and Alabama results [(+) 4.6%: (-) 95.4%], but different from results of Stewart
49
50 196 et al. (1977) [(+) 15% : (-) 85%] with unreported origin, and results of Grosman
51
52 197 et al. (1997) with *D. frontalis* populations from Texas [(+) 29.2% : (-) 70.8%],
53
54 198 South of Carolina [(+) 34.9% : (-) 65.1%] and North Carolina [(+) 25.1% : (-)
55
56 199 74.9%]. These apparent differences in the enantiomeric ratio of frontalin in
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 200 different locations, could explain *D. frontalis* preferences for pheromones from
5
6 201 their own region over those of more geographically distant populations
7
8 202 (Berisford et al., 1990).
9

10 203 SM Males sampled with the “gallery aeration” technique produced an
11
12 204 excess of the (+) enantiomer of *endo*-brevicommin (Table 1). The (-) enantiomer
13
14
15 205 never exceeded the noise threshold or in some samples never was detected,
16
17 206 but the (+) enantiomer was detected from all sampled insects. Redlich et al.
18
19 207 (1987) reported 97 % of (+)-*endo*-brevicommin from *D. frontalis* while Grosman et
20
21 208 al. (1997) reported predominantly (-) enantiomer from the same species.
22
23 209 Detection of this enantiomer from beetles in our study may require a
24
25
26 210 concentrated sample of hundreds of insects to confirm the presence or absence
27
28
29 211 of (-)-*endo*-brevicommin.
30

31 212 The enantiomeric ratios of frontalin from SM females and *endo*-brevicommin
32
33 213 from SM females and males were not statistically different for either technique,
34
35 214 “gallery aeration” and “beetle aeration”. In general, volatile capture was easy
36
37
38 215 and fast with either technique; however “gallery aeration” technique was more
39
40 216 natural since the insects were not constrained and likely less stressed. The
41
42 217 “beetle aeration” technique favored the capture of insect-produced compounds
43
44
45 218 since the host was not present, hence “beetle aeration” technique avoided
46
47 219 interference with pheromone identification, by potentially coeluting host
48
49 220 compounds.
50

51 221 The enantiomeric ratios of frontalin and *endo*-brevicommin between morphs
52
53 222 (in “beetle aeration” technique) did not show statistical differences (Table 2).
54
55

56 223 The *a priori* segregation of the two morphs by body size and the difference
57
58 224 on *endo*-brevicommin production between morphs; suggest the existence in
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 225 Chiapas of two different *D. frontalis* populations. Zuñiga et al. (unpublished
5
6 226 data) founded in a preliminary way that nether chromosome analysis or
7
8 227 citocrome oxidase I of DNA mitochondrial between both morphs were not
9
10 228 different, but Kirkendall and Hayes have unpublished DNA data that suggest
11
12 229 just the opposite of Zuniga's data. Given that there is much unclear data, – all
13
14 230 unpublished – on the subject, studies complementary are necessary in order to
15
16 231 know the genetic differentiation level between these morphs.
17
18

19
20 232 We consider that our findings could partially explain low beetle catches on
21
22 233 traps baited with commercial *D. frontalis* bait for monitoring purposes in
23
24 234 southern Mexico, even under outbreak conditions. Also partially suggest an
25
26 235 explanation why the vast majority insect coughed were from the SM. Since the
27
28 236 commercial baits are loaded with racemic frontalin plus α -pinene, there seems
29
30 237 to be not enough specificity to attract the local populations. Even more,
31
32 238 produced differences of female *endo*-brevicommin between morphs propose an
33
34 239 intriguing existence of two incipient species; however there is still so much to be
35
36 240 done to gather robust information for this phenomenon.
37
38

39
40 241
41
42 242 *Acknowledgement-* We would like to thank the United States Forest
43
44 243 Service, Southern Research Station for funding and technical support; to
45
46 244 CONACyT who support this work too by a grant; to the Comisión Nacional de
47
48 245 Áreas Naturales Protegidas (CONANP) and Lagos de Montebello National
49
50 246 Park. Special thanks goes to the people who helped us with technical work in
51
52 247 field and in laboratory, Roberto Castellanos, Eduardo Castellanos, José Higinio
53
54 248 López U., Benjamín Moreno C. and Antonio Santiesteban.
55
56

57 249
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 250 REFERENCES
5
6 251
7
8 252 BARRAS, S. J. 1967. Thoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis*
9
10 253 (Coleoptera: Scolytidae) is synonymous with a secondary females
11
12 254 character. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 60:486-487.
13
14
15 255 BERISFORD, C. W., PAYNE, T. L., and BERISFORD, Y. C. 1990.
16
17 256 Geographical variation in response of southern pine beetle (Coleoptera:
18
19 257 Scolytidae) to aggregating pheromones in laboratory bioassays. *Environ.*
20
21 258 *Entomol.* 19:1671-1674.
22
23
24 259 BERRYMAN, A. A. 1982. Population dynamics of bark beetles, pp. 152-160, *in*
25
26 260 J. B. Mitton y K. B. Sturgeon (eds.). Bark beetles in North American
27
28 261 Conifers a System for the Study of Evolutionary Biology. University of
29
30 262 Texas Press, Austin.
31
32
33 263 BILLINGS, R. F. 1985. Southern pine bark beetles and associated insects:
34
35 264 effects of rapidly-released host volatiles on response to aggregation
36
37 265 pheromones. *J. Appl. Entomol.* 99:483-491.
38
39
40 266 HUGHES, P. R. 1973. *Dendroctonus*: production of pheromones and related
41
42 267 compounds in response to host monoterpenes. *Z. Angew. Entomol.*
43
44 268 73:294-312.
45
46
47 269 HUGHES, P. R. 1976. Response of female southern pine beetles to the
48
49 270 aggregation pheromone frontalin. *Z. ang. Ent.* 81:463-466.
50
51
52 271 GROSMAN, D. M., SALOM, S. M., WILLIAM RAVLIN, F., and YOUNG, R. W.
53
54 272 1997. Geographic and gender differences in semiochemicals in emerging
55
56 273 adult southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *Ann. Entomol. Soc.*
57
58 274 *Am.* 90:438-446.
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 275 KINZER, G. W., FENTIMAN, A. F. Jr., PAGE, T. F., FOLTZ, R. L., VITÉ, J. P.,
5
6 276 and PITMAN, G. B. 1969. Bark beetle attractants: Identification, synthesis
7
8 277 and field bioassay of a new compound isolated from *Dendroctonus*. *Nature*
9
10 278 221:477-478.
- 11
12 279 MIDTGAARD, F. and THUNES, K. H. 2003. Pine bark beetles in the Mountain
13
14 280 pine ridge Forest Reserve, Belize: Description of the species and advice
15
16 281 on monitoring and combating the beetle infestations. Norwegian Forestry
17
18 282 Group, Second edition.
- 19
20 283 MILLER, D.R., BORDEN, J. H., y SLESSOR, K. N. 1989. Inter- and
21
22 284 intrapopulation variation of the pheromone, ipsdienol produced by male
23
24 285 pine engravers, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *J. Chem. Ecol.*
25
26 286 15:233-247.
- 27
28 287 MILLER, D. R., BORDEN, J. H., and SLESSOR, K. N. 1996. Enantiospecific
29
30 288 pheromone production and response profiles for populations of pine
31
32 289 engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae), in British Columbia. *J.*
33
34 290 *Chem. Ecol.* 22:2157-2172.
- 35
36 291 LANIER, G. N., CLASSON, A., STEWART, T., PISTON, J. J., and
37
38 292 SILVESTEIN, R. M. 1980. *Ips pini*: The bases of interpopulational
39
40 293 differences in pheromone biology. *J. Chem. Ecol.* 6:677-687.
- 41
42 294 McCARTY, F. A., BILLINGS, P. M., RICHERSON, J. V., PAYNE, T. L., and
43
44 295 EDSON, L. J. 1979. Response of the southern pine beetle to behavioral
45
46 296 chemicals in the laboratory. *J. Georgia Entomol. Soc.* 15:307-317.
- 47
48 297 OSGOOD, E. A. and CLARK, E. W. 1963. Methods of sexing and sex ratios of
49
50 298 the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimm. *Can. Entomol.* 95:
51
52 299 1106-1109.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 300 PITMAN, G. B., VITÉ, J. P., KINZER, G. W., and FENTIMAN, A. F. Jr. 1969.
5
6 301 Specificity of population-aggregating pheromones in *Dendroctonus*. *J.*
7
8 302 *Insect Physiol.* 15:363-366.
9
10 303 PURESWARAN, D. S., SULLIVAN, B. T., and AYRES, M. P. 2006. Fitness
11
12 304 consequences of pheromones production and host selection strategies in
13
14 305 a tree-killing bark beetle (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae).
15
16 306 *Oecologia* 148:720-728.
17
18 307 REDLICH, H., BRUNS, W., FRANCKE, W., SCHURIG, V., PAYNE, T. L., and
19
20 308 VITÉ, J. P. 1987. Identification of the absolute configuration of *endo-*
21
22 309 *brevicom*in from *Dendroctonus frontalis*. *Tetrahedron* 43:2029-2034.
23
24 310 RENWICK, J. A. A. and VITE, J. P. 1969. Bark Beetle attractants: Mechanism
25
26 311 of colonization by *Dendroctonus frontalis*. *Nature* 224:1222-1223.
27
28 312 RUDINSKY, J. A. 1973. Multiple functions of the southern pine beetle
29
30 313 verbenone. *Environ. Entomol.* 2:511-514.
31
32 314 RUDINSKY, J.A., MORGAN, M. E., LIBBEY, L. M., and PUTNAM, T. B. 1974.
33
34 315 Antiaggregative-rivalry pheromone of the mountain pine beetle and a new
35
36 316 arrestant of the southern pine beetle. *Environ. Entomol.* 3:90-98.
37
38 317 SALINAS-MORENO, Y., MENDOZA, M. G., BARRIOS, M. A., CISNEROS, R.,
39
40 318 MACÍAS-SÁMANO, J. E., and ZÚÑIGA, G. 2004. Areography of the genus
41
42 319 *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Mexico. *J.*
43
44 320 *Biogeogr.* 31:163-1177.
45
46 321 SALOM, S. M., DALUSKY, M. J., BERISFORD, C.W., and SHAVER, T. N.
47
48 322 1992. Effect of verbenone enantiomers and racemic *endo-brevicom*in on
49
50 323 response of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) to attractant-
51
52 324 baited traps. *Can. J. For. Res.* 22:925-931.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 325 SILVERSTEIN, R. M. 1970. Attractant pheromones of coleopterans, pp. 21-40,
5
6 326 *in* M. Beroza (ed.). Chemicals Controlling Insect Behavior. Academic
7
8 327 Press, New York.
- 10 328 STEWART , T. E., PLUMMER, E. L. McCANDLESS, L.L. WEST, J. R., and
11
12 329 SILVERSTEIN, R. M. 1977. Determination of enantiomer composition of
13
14 330 several bicyclic ketal insect pheromone components. *J. Chem. Ecol.* 3:27-
15
16 331 43.
- 19 332 SULLIVAN, B. T. 2005. Electrophysiological and behavioral responses of
20
21 333 *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae) to volatiles isolated
22
23 334 from conspecifics. *J. Econ. Entomol.* 98:2067-2078.
- 26 335 VANDERWEL, D., GRIES, G., SINGH, S. M., BORDEN, J. H., and
27
28 336 OEHLISCHLAGER, A. C. 1992. (*E*)- and (*Z*)-6 nonen-2-one: biosynthetic
29
30 337 precursors of *endo*- and *exo*-brevicommin in two bark beetle (Coleoptera:
31
32 338 Scolytidae). *J. Chem Ecol.* 18:1389-1404.
- 35 339 VITÉ, J. P., BILLINGS, R. F., WARE, C. W., and MORI, K. 1985. Southern pine
36
37 340 beetle: Enhancement or inhibition of aggregation response mediated by
38
39 341 enantiomers of *endo*-brevicommin. *Naturwiss.* 72:99-100.
- 42 342 WOOD, S. L. 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central
43
44 343 America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. Brigham
45
46 344 Young University, Provo, Utah.

47
48
49 345
50
51 346
52
53 347
54
55 348
56
57 349
58
59
60
61
62
63
64
65

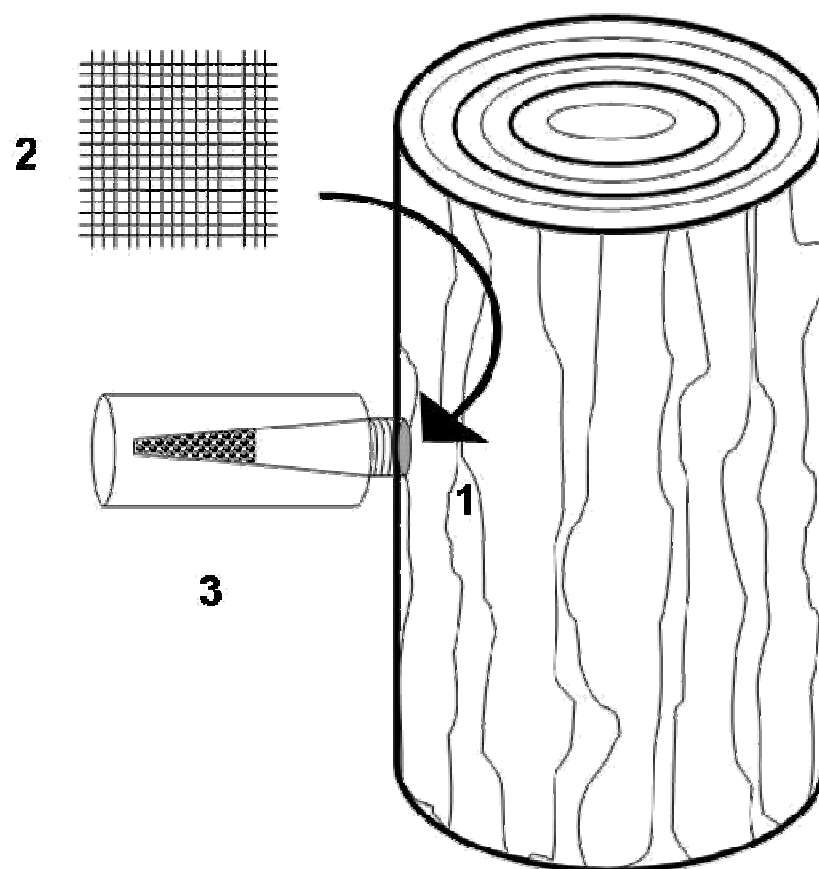


Figure 1. “Entrance aeration technique” for volatiles from individual bark beetles boring into an uninfested log. Labeled items: Conical vial with adsorbent (3), a beetle entrance hole attached to a beetle boring hole (1). A piece of plastic mesh (2) that prevented frass from getting into the vial.

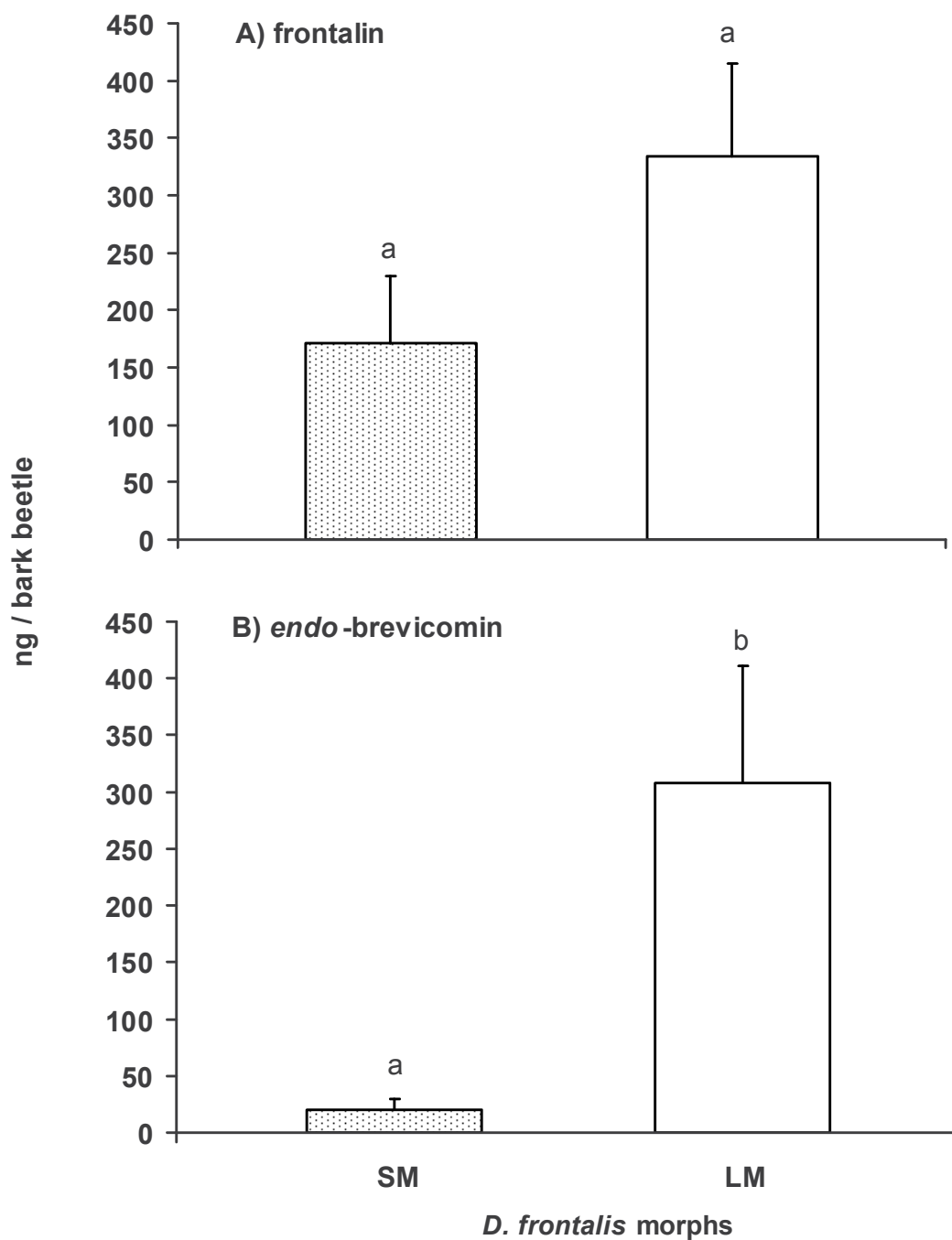


Figure 2. Comparison of pheromone production (ng / beetle) between small morph (SM) and large morph (LM) females of *D. frontalis* from Lagunas de Montebello National Park, Chiapas, Mexico. Bars with the same letter are not significantly different. A) *Mann-Whitney test*, $U=0.140$, $\alpha=0.05$; B) *Mann-Whitney test*, $U=0.001$, $\alpha =0.05$.

TABLE 1. PHEROMONE ENANTIOMERIC RATIOS PRODUCED BY *D. FRONTALIS* OF SMALL MORPHS FROM LAGOS DE MONTEBELLO NATIONAL PARK, CHIAPAS, MÉXICO

| extraction technique | | Enantiomeric ratio (+)%: (-)% (± SE) | | | | | |
|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|---------------|----------------|-------|------------|----|
| | | NS/TI | female | | NS/TI | male | |
| frontalin | "gallery aeration" | 15/15 | 4.7 (0.5)a | 95.8 (0.5)a | 5/5 | 0 | 0 |
| | "beetle aeration" | 12/12 | 5.6 (0.6)a | 94.4 (0.6)a | 6/5 | 0 | 0 |
| <i>endo</i> -brevicomín | "gallery aeration" | 9/15 | 100 (0) | ND | 5/3 | 100 (0) | ND |
| | "beetle aeration" | 10/12 | 100 (0) | ND | 6/5 | 100 (0) | ND |

Means associated with the same latter were not significantly different, *Mann-Whitney test* $U=0.457$; $P=0.05$.

NS/TI= Number of insect where compounds was detected/ Number of insects sampled.

ND = Not detected

TABLE 2. ENANTIOMERIC RATIO OF PHEROMONES FROM TWO SIZE MORPHS OF A *D. FRONTALIS* POPULATION IN LAGOS DE MONTEBELLO NATIONAL PARK, CHIAPAS, MÉXICO

| | Enantiomeric ratio (+)%: (-)% (\pm SE) | | | | | |
|------------------------|---|---------------|----------------|-------|---------------|----------------|
| | NI/NS | SM | | NI/NS | LM | |
| frontalin | 12/12 | 4.6 (0.6)a | 95.4 (0.6)a | 12/12 | 3.9 (0.6)a | 96.1 (0.6)a |
| endo-brevicomín | 9/12 | 100 (0) | ND | 12/12 | 100 (0) | ND |

Means associated with the same letter were not significantly different, *Mann-Whitney test* $U=0.932$; $\alpha =0.05$.

NI/NS= Number of insect where compounds was detected/ Number of insects sampled

ND = Not detected

List of Suggested Reviewers w/ Email Addresses

Reviewers List

| | |
|--------------------|--|
| John Borden | borden@sfu.ca |
| C. Wayne Berisford | berisford@bugs.ent.uga.edu |
| Désirée Vanderwel | d.vanderwel@uwinnipeg.ca |