



El Colegio de la Frontera Sur

**Respuesta olfativa de *Anastrepha striata* Schiner (Diptera:  
Tephritidae) a volátiles de frutos de *Psidium guajava* y *Citrus  
*sinensis****

TESIS

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

por

**Edvin Díaz Santiz**

Junio 2014

## **Dedicatoria**

### ***A Dios***

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

### ***A mis padres***

Enrique Díaz Hernández y Dora María Santiz Morales por haberme apoyado en todo momento, por cada uno de sus consejos, sus valores, y por la motivación constante y enseñarme que todo debe de ser tomado con compromiso, dedicación y esfuerzo.

A mis hermanos, familiares, amigos y a quienes se han sumado a mi vida para hacerme compañía con sus sonrisas de ánimo.

## **Agradecimientos**

A El Colegio de la Frontera Sur por permitirme realizar mis estudios de maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca Nacional para realizar mis estudios de posgrado (número de becario 270032).

Al Dr. Edi A. Malo Rivera, director de esta Tesis, por darme la oportunidad de realizarla y mostrar una constante disponibilidad para el trabajo, brindar su ayuda y consejos; y por estar siempre atento a mis consultas.

Al Dr. Julio Rojas, Dr. Leopoldo Cruz López y M. en C. Emilio Hernández Ortiz quienes siempre tuvieron la disponibilidad de dar su opinión sobre este proyecto. Su ayuda en la escritura de parte de la tesis fue muy importante.

Al M. en C. Antonio Santiesteban Hernández por el apoyo brindado en la identificación de compuestos y en el uso de equipo de laboratorio utilizado. Así como al Técnico Armando Virgen Sánchez por su apoyo y consejos en la realización de los experimentos.

A la técnico Yovani Margoth García García del laboratorio de colonización y cría de moscas de la fruta de la Subdirección de Desarrollo de Métodos del Programa Moscafrut, (SAGARPA-IICA) por proporcionarme moscas de *A. striata* y por su disponibilidad y apoyo técnico en el manejo de insectos.

Al M. en C. Javier Valle Mora por la disponibilidad y apoyo en el análisis estadístico de este proyecto de investigación.

A los compañeros del Laboratorio de Ecología Química de insectos quienes me han brindado una apreciable amistad y hacer de este proyecto un ambiente de armonía, así como sus comentarios sobre el proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1- Material biológico.....	5
2.2- Respuesta de moscas a los volátiles de frutos hospederos.....	6
2.3- Colecta de volátiles .....	6
2.4- Análisis Cromatografía de Gases acoplada a Electroantenografía (CG- EAD)....	7
2.5- Análisis Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	8
2.6- Cuantificación de compuestos antenalmente activos en volátiles de frutos.....	8
2.7 Prueba con extractos de frutos y compuestos sintéticos en jaulas de campo.....	8
2.8 Análisis estadístico.....	9
3. RESULTADOS.....	10
3.1 Respuesta de <i>A. striata</i> a frutos de guayaba.....	10
3.2 Respuesta de <i>A. striata</i> a frutos de naranja.....	11
3.3 Análisis electrofisiológico y químico de los extractos.....	12
3.4 Respuesta a extracto de guayaba y mezcla sintética.....	15
3.5 Respuesta a extracto de naranja y linalol.....	16
4. DISCUSION.....	17
5. CONCLUSIONES.....	18
6. LITERATURA CITADA.....	19
7. ANEXO.....	26

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Captura promedio (+ E. E.) de hembras (vírgenes y apareadas) de <i>Anastrepha striata</i> en trampas Multilure cebada con frutos de guayaba.....	10
<b>Figura 2.</b> Captura promedio (+ E. E.) de hembra (vírgenes y apareadas) de <i>Anastrepha striata</i> en trampas Multilure cebada con frutos de naranja.....	11
<b>Figura 3.</b> Respuesta antenal de hembras apareadas por CG-EAD en: A) extractos de guayaba. B) mezcla de compuestos sintéticos.....	12
<b>Figura 4.</b> Respuesta antenal de hembras apareadas por CG-EAD en: A) extractos de naranja. B) mezcla de compuestos sintéticos.....	13
<b>Figura 5.</b> Captura promedio (+ E. E.) de hembras apareadas de <i>Anastrepha striata</i> en trampas Multilure cebadas con extracto de guayaba y mezcla sintética.....	15
<b>Figura 6.</b> Captura promedio (+ E. E.) de hembras apareadas de <i>Anastrepha striata</i> en trampas Multilure cebada con naranja y linalol.....	16

## INDICE DE CUADROS

Pág.

<b>Cuadro 1.</b> Cantidad promedio ( $\pm$ E.E) de compuestos contenidos en los extractos de <i>Psidium guajava</i> y <i>Citrus sinensis</i> obtenida mediante una curva de calibración por CG.....	14
---	----

## Resumen

Se evaluó la respuesta olfativa de hembras vírgenes y apareadas de *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae) a volátiles de frutos hospederos. La respuesta de las moscas a volátiles de frutos hospederos fue evaluada usando trampas Multilure cebadas con frutos no infestados de guayaba (*Psidium guajava* L.) y naranja dulce (*Citrus sinensis* L.), en pruebas de no elección en jaulas de campo, usando como control una trampa Multilure sin fruto. Los resultados indicaron que las moscas fueron igualmente atraídas a los volátiles de frutos de guayaba o naranja cuando fueron comparadas contra el control. Los volátiles emitidos por los frutos hospederos fueron capturados por aireación dinámica y analizada por cromatografía de gases acoplada a electroantenografía (CG-EAD) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Los compuestos antenalmente activos en los extractos de guayaba fueron identificados como butirato de etilo, (Z)-3-hexenol, hexanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo y octanoato de etilo, mientras que el linalol fue identificado como el único compuesto antenalmente activo en los extractos de naranja. La actividad biológica de los compuestos sintéticos identificados fue evaluada contra los extractos de frutos con hembras apareadas en pruebas en jaulas de campo. Los resultados mostraron que las hembras apareadas de *A. striata* responden de manera similar tanto al extracto de guayaba o la mezcla de seis componentes de guayaba, o al extracto de naranja y al linalol, lo que sugiere que los compuestos identificados son los responsables de la atracción.

**PALABRAS CLAVE:** *Anastrepha striata*, volátiles, trampa Multilure, CG-EAD, CG-MS, atracción.

## Introducción

La selección de hospederos por insectos fitófagos, puede ser considerada como un "comportamiento de elección" (Browne, 1977). Existen dos criterios para esta selección, la cual se basa en que los insectos pueden "elegir" únicamente después del contacto con la planta, esto referido a la frecuencia con que las diferentes hospederas son visitados por los fitófagos. El otro criterio implica que los insectos perciben características de la planta a una distancia determinada y por lo tanto tienen la opción de "elegir" (Visser, 1988). Esta capacidad de localizar y reconocer las plantas hospederas es esencial para la supervivencia de los insectos, y es facilitada por el uso de señales olfativas (Pickett, et al., 1992; Pickett and Glinwood, 2008), estímulo visual, gustativo y táctil, así como la humedad y la intensidad de la luz del ambiente (Bernays and Chapman, 1994). Es así que la percepción por olfacción es un proceso de importancia para los insectos, debido a que está involucrado en patrones de comportamiento, como en la selección de alimento (Libert, et al., 2007), la percepción de sustancias tóxicas (Fuyama, 1978), el reconocimiento y elección de pareja (Billeter, et al., 2009) y sitio de oviposición (Hoffmann and O'Donnell, 1990; Jaenike, 1990).

Los órganos olfativos primarios en los insectos son las antenas, la unidad estructural y funcional de los órganos sensoriales son llamados sénsulos (Frazer, 1985), éstos proporcionan información importante de su ambiente externo; sus neuronas receptoras están localizadas muy cerca del sitio estimulado y están conectadas a su sistema nervioso central (SNC) (Nation, 2002). El proceso de olfacción consiste en la adsorción de las moléculas de los volátiles sobre la superficie cuticular de las antenas (Kanaujia and Kaissling, 1985), éstas se difunden al interior de la superficie



cuticular de los pelos sensoriales a través de los poros microscópicos presentes en la cutícula. Para difundir la molécula del volátil en la linfa del sensillum, la molécula se une a la proteína enlazante (Vogt and Riddiford, 1981) y es transportada a través de la linfa acuosa al receptor en la membrana dendrítica de las neuronas receptoras olfativas (Vogt and Riddiford, 1981; Vogt, 2003; Xu, et al., 2005), las cuales están conectados a su SNC. El sistema olfativo de los insectos presenta una alta sensibilidad y poder discriminatorio de olores, como ocurre con las abejas que pueden distinguir entre muchos olores estructuralmente similares (Laska, et al., 1999). Las moscas de la fruta de la familia Tephritidae pueden detectar y responder a volátiles liberados por las plantas hospederas a distancia (Aluja and Prokopy, 1992). La olfacción es un sentido importante que está involucrado en los mecanismos implicados en la localización de diferentes recursos por parte de insectos fitófagos, lo que permite entender las interacciones entre plantas e insectos (Murlis, et al., 1992).

Actualmente se ha enfatizado más en la importancia de la percepción olfativa de algunos insectos hacia sustancias volátiles provenientes de las plantas que sirven para orientación hacia los sitios de oviposición (Renwick and Chew, 1994). Algunos tefrítidos son atraídos a compuestos volátiles de frutas (Robacker and Fraser, 2002, 2003). Por ejemplo se ha reportado el papel de los compuestos volátiles de frutas como atrayentes potenciales para la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* Wiedeman (Prokopy, et al., 1996, Warthen, et al., 1997, Prokopy, et al., 1998).

En la Mosca Mexicana de la fruta, *A. ludens*, se han realizado estudios en la identificación de volátiles de hospederos como: chapote amarillo, *Sargentia greggii* S. Watson (Robacker, et al., 1992), naranja agria, *Citrus aurantium* L. (Rasgado, et al., 2009), zapote blanco, *Casimiroa edulis* Oerst (González, et al., 2006), y guayaba, *P.*

*guajava* (Malo et al., 2005). En la captura de machos de *Rhagoletis pomonella* Walsh en huertos de manzana en Estados Unidos de Norte América se han utilizado trampas cebadas con una mezcla de acetato de hexilo, acetato de (E)-2-hexen-1-ol, butil-2-metilbutonato, hexanoato de propilo, propanoato de hexilo, hexanoato de butilo, y butanato de hexilo, estos compuestos identificados en manzana han mostrado buenos resultados para monitorear esta plaga (Fein, et al., 1982, Zhang, et al., 1999).

El modelo de estudio utilizado en este trabajo fue *A. striata*, que tiene importancia económica, ya que ataca una diversidad de hospederas como guayaba (*Psidium guajava* L.) (Weems and Fasulo, 2002) que es un frutal de importancia económica, y naranja dulce, (*Citrus sinensis* L.), entre otras (Norrbom, 2003). Sin embargo no se ha realizado estudios sobre el proceso de olfacción de hembras de *A. striata* a volátiles de guayaba, que es la hospedera preferencial y naranja dulce considerada como una hospedera secundaria. Por lo que desconocemos si la hembra de esta mosca es atraída a compuestos comunes presentes en ambos frutos hospederos o si es atraído a diferentes compuestos característicos de cada fruto hospedero.

El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta de hembras vírgenes y apareadas de *A. striata* a guayaba y naranja dulce, así como identificar los compuestos antenalmente activos liberados por dichos frutos. Así como evaluar la mezcla de compuestos volátiles identificados en ambos frutos en jaulas de campo.

## **Materiales y Métodos**

### **Material Biológico**

Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios de Ecología Química de Insectos de El Colegio de la Frontera Sur, en Tapachula, Chiapas. Se obtuvieron pupas de *A. striata* proporcionadas por el laboratorio de Colonización y Cría de Moscas de la Fruta de la Subdirección de Desarrollo de Métodos del Programa Moscafrut, (SAGARPA-IICA). Los adultos emergidos (un día de edad) fueron separados por sexo, 400 moscas fueron colocados en cada jaula de plexiglás de 30x30x40 cm y fueron alimentados con una mezcla de sacarosa más proteína hidrolizada enzimáticamente (MB Biochemicals, Aurora, OH, EUA) en proporción de 3:1 y se les proporciono agua en un bebedero (Frascos de plástico de 250 ml y algodón). Así mismo, se utilizaron hembras vírgenes y apareadas para la realización de este estudio, las hembras apareadas fueron obtenidas al introducirlas en una jaula de plexiglás de 30x30x40 cm con machos de *A. striata* a los cuales se les proporcionó de dos hembras vírgenes de nueve días de edad por macho. Una vez apareados se separaron las hembras de los machos para las respectivas evaluaciones.

Los frutos utilizados para la evaluación tanto en jaulas de campo como en la colecta de volátiles fueron cortados de árboles ubicados en los alrededores de Tapachula (frutos de naranja: 15° 00'40.9'' N, 92°11'30.7'' W; guayaba: 14° 52'27.3'' N, 92°16'47.1'' W), y depositados en bolsas de plástico y transportados al laboratorio. Para evitar que los frutos fueran dañados por insectos, se protegieron con bolsas de malla mosquitera. Los frutos de guayaba utilizados en las pruebas tuvieron un promedio de 15.4 °Brix y en naranja un promedio de 14.9 °Brix.

## **Respuesta de moscas a los volátiles de frutos hospederos**

En este estudio se determinó la respuesta de hembras vírgenes y apareadas de *A. striata* por frutos no infestados de guayaba y naranja dulce. Para ello se puso un fruto completo (cortados dos horas antes de la evaluación,) como cebo en trampas Multilure, que fueron colocadas en una jaula de campo (2.8 m diámetro x 2 m de altura). En cada jaula de campo solo se introdujo una trampa Multilure con un fruto dentro de ella (guayaba o naranja) y se tuvo como control una trampa Multilure sin fruto. Se utilizaron ocho jaulas de campo de manera simultánea y cada jaula constituyó una repetición. La prueba consistió en liberar 25 hembras vírgenes de *A. striata* de 8 a 12 días de edad en cada una de las jaulas de campo en un horario de 08:00 a 19:00 h, el mismo día se contaba el número de moscas capturadas en cada trampa. La prueba con hembras apareadas se realizó de la misma manera que para las hembras vírgenes solo que las evaluaciones se realizaron con hembras apareadas de 10 a 12 días de edad. Se realizaron para el fruto de guayaba un total de dieciséis replicas con hembras vírgenes y nueve replicas con hembras apareadas, para evaluación con frutos de naranja se realizaron un total de catorce replicas con hembras vírgenes y nueve replicas con hembras apareadas.

## **Colecta de volátiles**

Los compuestos volátiles fueron colectados mediante la técnica de aireación dinámica, que consistió en utilizar una cámara de aireación de vidrio en la cual se colocaron los frutos hospederos cortados dos horas antes de esta evaluación y libres de ataque por insectos. Los volátiles se colectaron haciendo pasar un flujo de aire de 0.5 L/min

previamente purificado por un filtro de carbón activado proveniente de una bomba de vacío. Los volátiles fueron capturados en una pequeña columna de vidrio conteniendo adsorbente súper Q. Al final de cada captura (después de 24 h), los volátiles se extrajeron del adsorbente con 400 µl de diclorometano (grado HPLC), y almacenados en pequeños viales a -20°C hasta su análisis.

### **Análisis Cromatografía de Gases acoplada a Electroantenografía (CG- EAD)**

Con la finalidad de encontrar compuestos antenalmente activos el análisis químico de los extractos de guayaba y naranja dulce se realizó mediante CG-EAD. Para ello se determinó la respuesta antenal de 10 hembras apareadas a volátiles de hospederas. Se usó un Cromatógrafo de Gases (Shimadzu GC-2010 Plus, Tokio, Japón) acoplado a un Electroantenograma (Syntech). El equipo cuenta con una columna capilar no polar Factor Four VF-5ms de 30 metros de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, con un detector de ionización de flama (FID), y un inyector split/splitless, utilizando como gas acarreador Hidrogeno a un flujo de 2.0 ml/min. El análisis se realizó mediante un programa de temperatura inicial de 50 °C durante 2 minutos, con un incremento de 5 °C/min, hasta llegar a una temperatura final de 250 °C permaneciendo a esta temperatura por 10 minutos. El criterio para considerar a los compuestos antenalmente activos se basó en considerar los que mostraron actividad antenal y que se presentaron en más del 50% de las evaluaciones realizadas con antenas de hembras apareadas. Los compuestos identificados (sintéticos) fueron inyectados (100 ng) en forma de mezcla e individuales en el GC-EAD para confirmar la respuesta antenal en hembras apareadas. En esta evaluación se utilizaron 10 antenas de hembras apareadas (una antena de hembra por cada evaluación).

### **Análisis Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)**

Se identificaron los compuestos antenamente activos en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (CG Varian 3800 / EM Varian 2200). El equipo cuenta con una columna capilar no polar Factor Four VF-5ms de 30 metros de longitud y 0.25 mm de diámetro interno. El análisis se realizó mediante un programa de temperatura inicial de 50 °C durante 2 minutos, con un incremento de 5 °C/min, hasta llegar a una temperatura final de 250 °C permaneciendo a esta temperatura por 10 minutos. El espectro de masas se obtuvo por impacto electrónico, y la identificación de los compuestos volátiles se realizó por comparación de los tiempos de retención y los datos espectrales de cada compuesto con la base de datos NIST-92 & NIST-98. Posteriormente, la confirmación se realizó por comparación del tiempo de retención y su respectivo espectro de masas de estándares auténticos.

### **Cuantificación de compuestos antenamente activos en volátiles de frutos**

Para conocer la concentración de los compuestos identificados presentes en los extractos, se realizaron curvas de calibración para cada uno de los compuestos antenamente activos haciendo uso de un Cromatógrafo de Gases (Shimadzu GC-2010 Plus, Tokio, Japón), inyectando concentraciones conocidas de cada compuestos para tener una curva de calibración. El análisis se realizó usando las mismas condiciones descritas en el análisis de CG-EAD.

### **Prueba con extractos de frutos y compuestos sintéticos en jaulas de campo**

Previamente se preparó la mezcla de sintéticos antenamente activa de cada hospedera, formulada de acuerdo a la concentración determinada en los extractos, y se

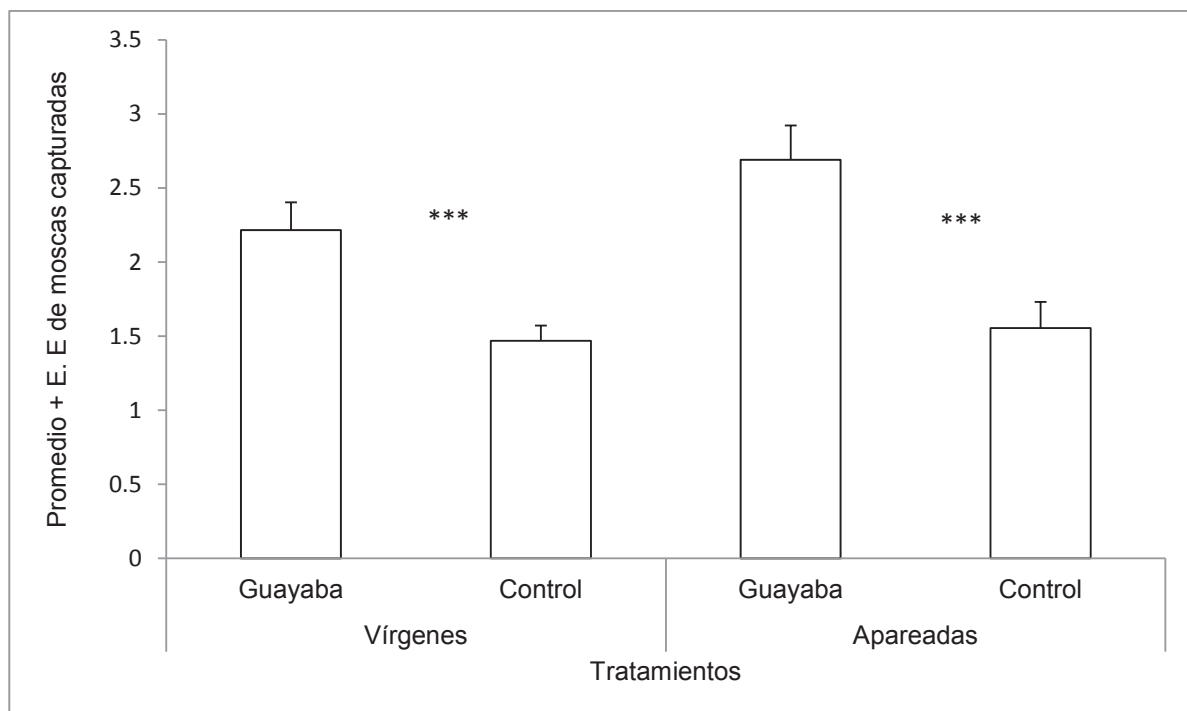
evaluó en jaulas de campo usando septos de hule y trampas Multilure para determinar la respuesta de las moscas a cada mezcla de los compuestos sintéticos y al extracto obtenido de los frutos por aireación dinámica. La prueba consistió en colocar en una trampa multilure un septo de hule con 100  $\mu$ l del extracto del fruto (guayaba o naranja), y una trampa Multilure con un septo cargado con 100  $\mu$ l con la mezcla sintética formulada de acuerdo a la concentración determinada en los extractos del fruto (Cuadro 1), las cuales fueron colocadas en una jaula de campo. Se utilizaron ocho jaulas de campo de manera simultánea y cada jaula constituyó una repetición. Se liberaron 25 hembras apareadas de *A. striata* de 10-12 días de edad en cada una de las jaulas de campo en un horario de 08:00 h a, 19:00 h, el mismo día se contaba el número de moscas capturadas en cada trampa. Se realizaron un total de ocho replicas para hembras apareadas

### **Análisis estadístico**

El número de capturas de hembras vírgenes y apareadas fueron analizados con el software R versión 2.14.1 (2011-12-22). El número de capturas de hembras vírgenes y apareadas obtenidas de las pruebas de no elección en jaulas de campo fueron analizados para determinar si cumplían con los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad. Debido a que no se cumplían con los supuestos, los datos fueron transformados con  $\sqrt{(x+1)}$  para estabilizar la varianza y normalidad y se analizaron mediante un ANOVA bifactorial. El número de capturas de hembras apareadas de las evaluaciones de compuestos sintéticos y extractos de frutos obtenidos en jaulas de campo fueron analizadas mediante una prueba t- Student.

## RESULTADOS

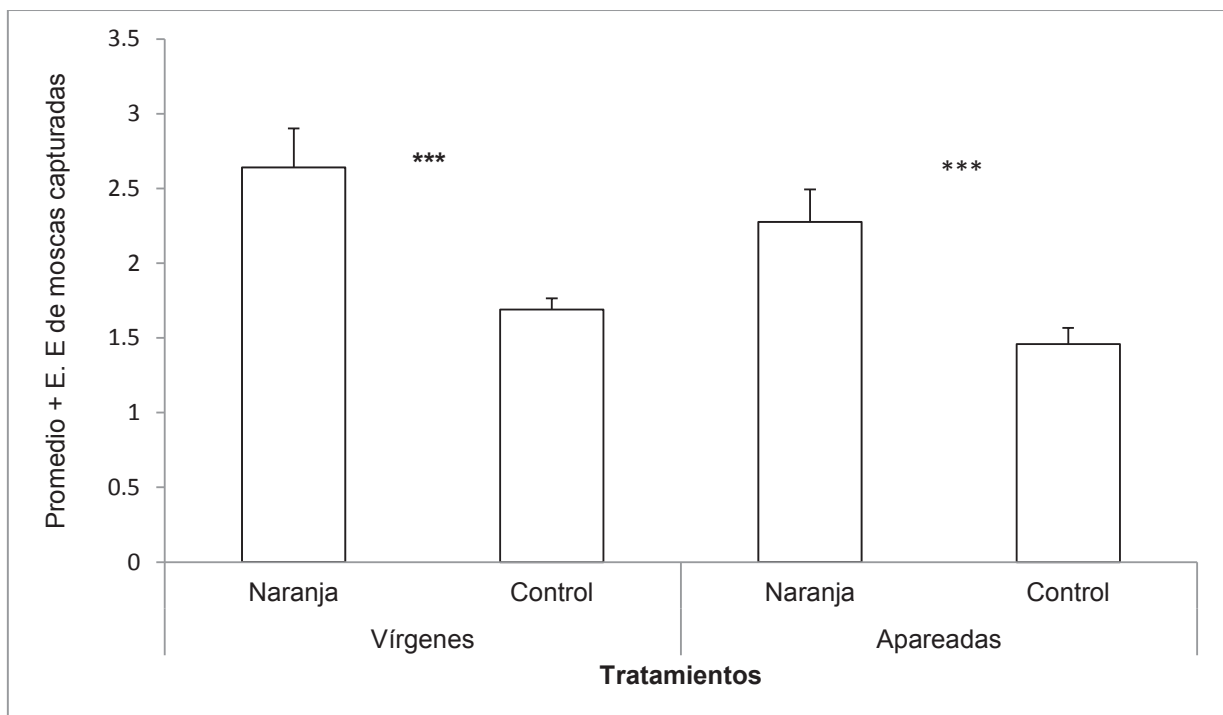
**Respuesta de *A. striata* a frutos de guayaba.** Los resultados del ANOVA bifactorial muestran que el tratamiento evaluado (fruto vs control) afectó significativamente la respuesta de hembras ( $F = 26.4$ ; g.l. = 1, 46;  $P < 0.001$ ). Sin embargo, el estado fisiológico de las hembras (vírgenes o apareadas) no influyó en la respuesta ( $F = 2.42$ ; g.l. = 1, 46;  $P > 0.05$ ). La interacción tratamiento X estado fisiológico no fue significativa ( $F = 1.17$ ; g.l. = 1, 46;  $P > 0.05$ ). Los resultados muestran que las trampas cebadas con frutos de guayaba capturaron más hembras (vírgenes y apareadas) que trampas sin fruto (Figura 1).



**Fig. 1.** Captura promedio (+ E. E.) de hembras (vírgenes y apareadas) de *Anastrepha striata* en trampas Multilure cebada con frutos de guayaba. \*\*\* Denota diferencia estadística significativa a  $P < 0.001$ .



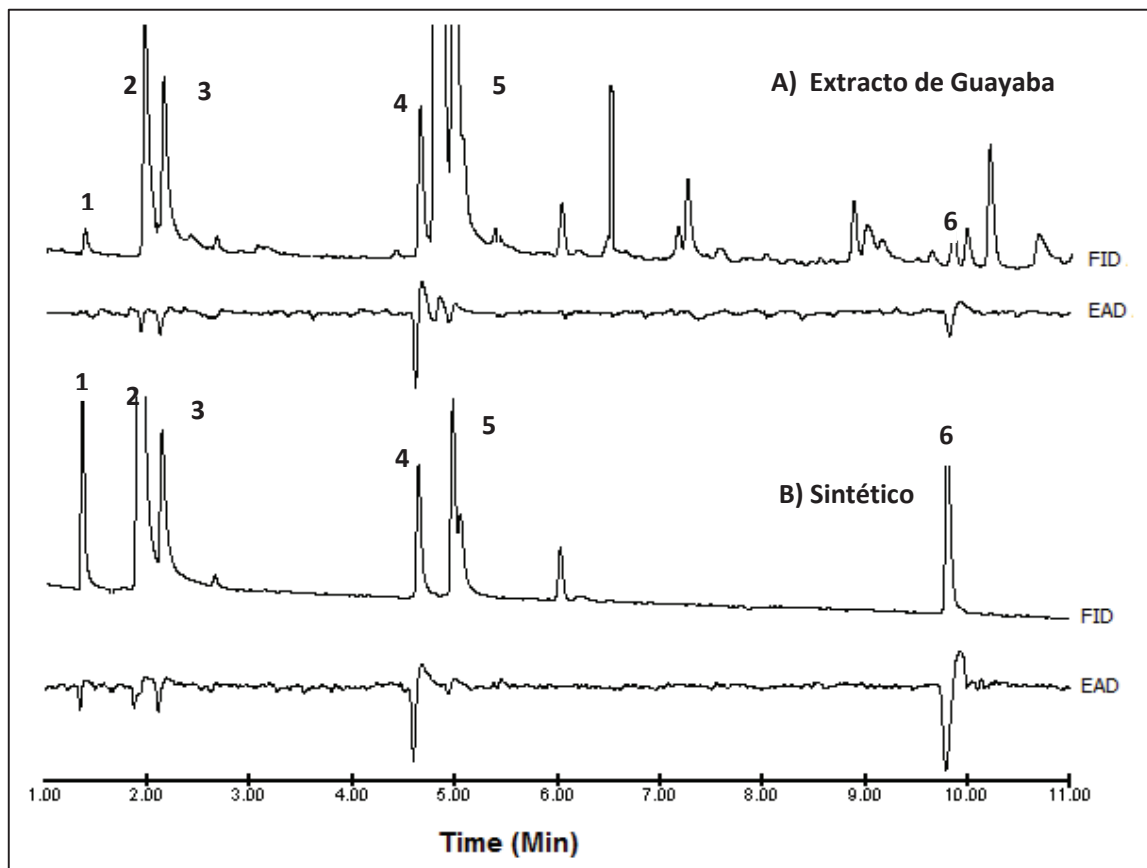
**Respuesta de *A. striata* a Frutos de Naranja.** Los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticas en los tratamientos utilizados ( $F = 21.9$ ; g.l. = 1, 42;  $P < 0.001$ ). En relación al estado fisiológico, no existen diferencia estadística (vírgenes o apareadas) ( $F = 2.29$ ; g.l. =1, 42;  $P > 0.05$ ). Así como la interacción estado fisiológico X tratamiento ( $F = 0.11$ ; g.l. = 1, 42;  $P > 0.05$ ). En la figura 2, podemos observar los resultados de hembras totales (vírgenes y apareadas) en donde encontramos que las moscas prefieren significativamente al fruto de naranja que al control. Como el análisis estadístico de los resultados de la evaluación de *A. striata* a frutos de guayaba y naranja en jaula de campo mostraron que en ambos frutos no hay diferencias entre el estado fisiológico, decidimos trabajar con hembras apareadas.



**Fig. 2.** Captura promedio (+ E. E.) de hembras (vírgenes y apareadas) de *Anastrepha striata* en trampas Multilure cebada con frutos de naranja. \*\*\* Denota diferencia estadística significativa a  $P \leq 0.001$ .

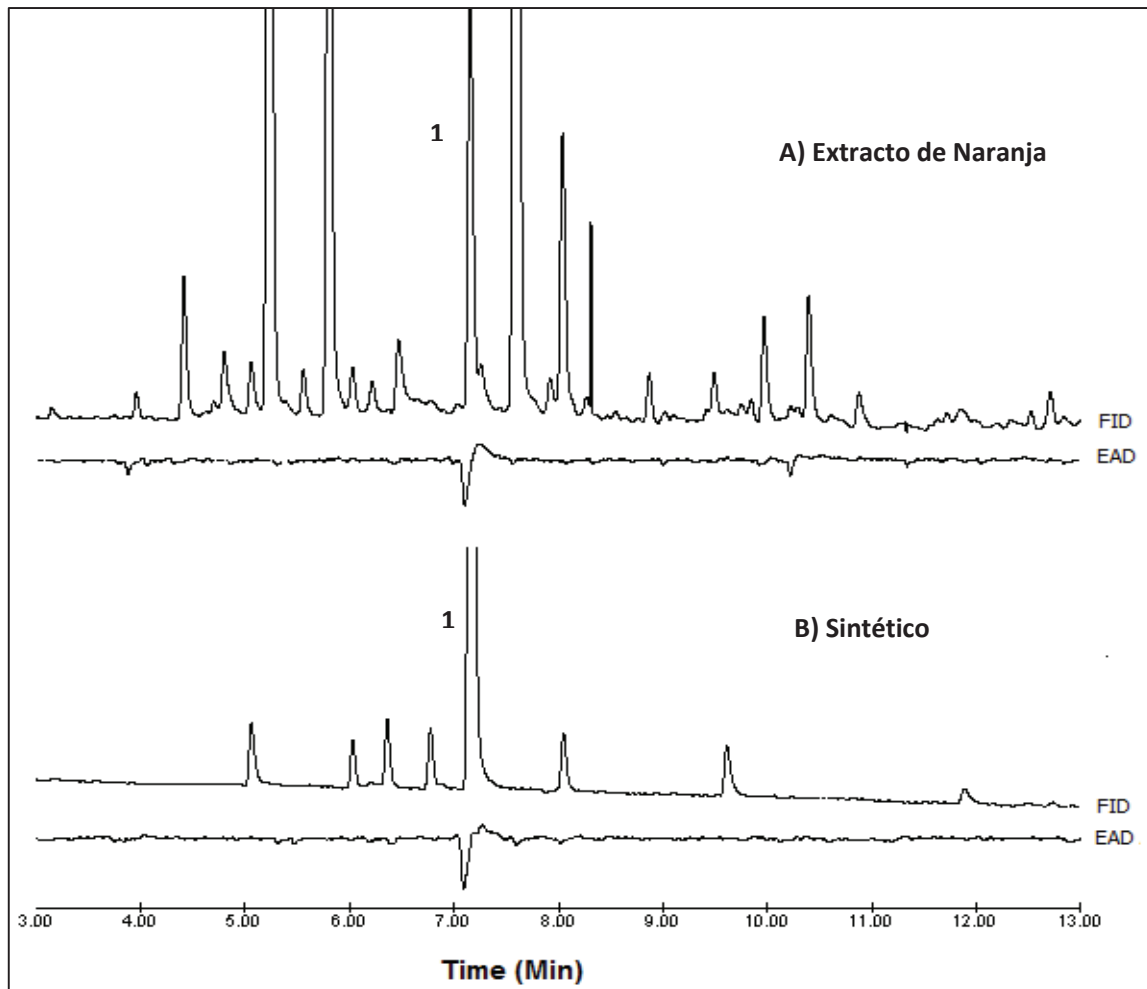
### Análisis Electrofisiológico y Químico de los Extractos

El análisis de CG-EAD de extractos de frutos de guayaba reveló que hay seis compuestos antenalmente activos en hembras apareadas de *A. striata*. Los compuestos fueron identificados por CG-EM como butirato de etilo, (Z)-3-hexenol, hexanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo y octanoato de etilo. La actividad antenal de los compuestos en hembras apareadas fue confirmada mediante la respuesta por CG-EAD a 100 ng inyectados de la mezcla de compuestos sintéticos (Fig. 3).



**Fig. 3.** Respuesta antenal de hembras apareadas por CG-EAD en: A) Extractos de guayaba. B) Mezcla de compuestos sintéticos, en donde 1) Butirato de etilo, 2) (Z)-3-Hexenol, 3) Hexanol, 4) Hexanoato de etilo, 5) Acetato de hexilo, 6) Octanoato de etilo. Los picos considerados como antenalmente activos fueron aquellos que presentaron ocurrencia por arriba del 50% de las evaluaciones de CG-EAD. En total se evaluó 10 antenas de hembras apareadas con extracto de frutos de guayaba y 10 con mezcla de sintéticos.

De los extractos de frutos de naranja obtenidos por aireación dinámica solo el linalol provocó una respuesta antenal consistente (Fig. 4). esta respuesta se confirmó mediante la inyección de 100 ng de compuesto sintético.



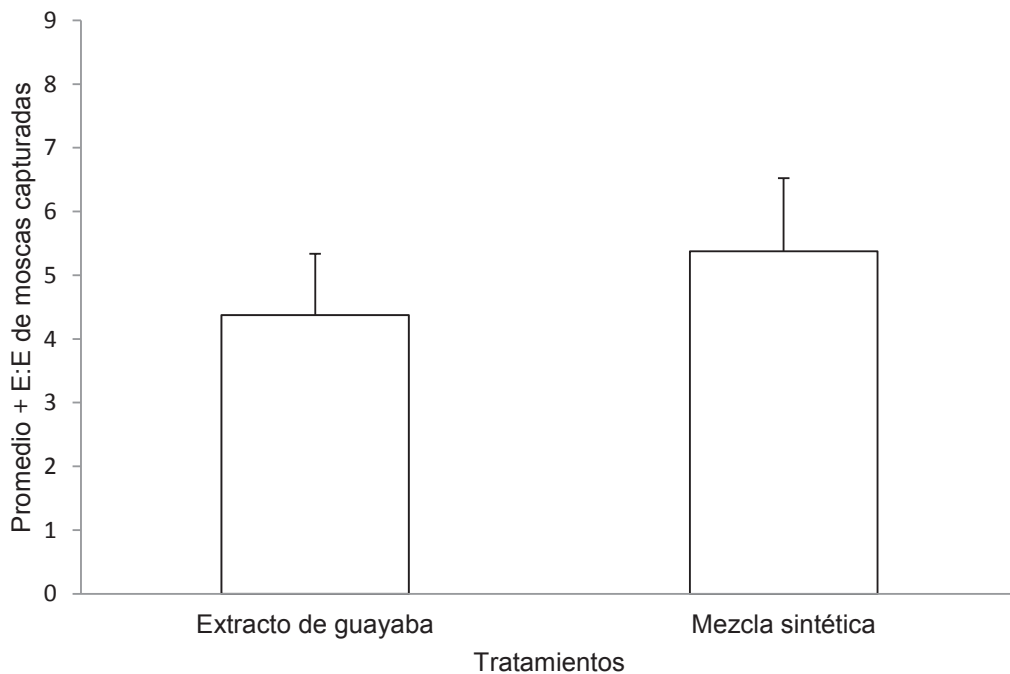
**Fig. 4.** Respuesta antenal de hembras apareadas por CG-EAD en: A) Extractos de naranja. B) compuesto sintético, en donde: 1) linalol. Los picos considerados como antenalmente activos fueron aquellos que presentaron ocurrencia por arriba del 50% de las evaluaciones de CG-EAD . En total se evaluó 10 antenas de hembras apareadas con extracto de frutos de naranja y 10 con linalol.

La determinación de las concentraciones de cada uno de los compuestos identificados en los extractos, mostró que en volátiles de guayaba el acetato de hexilo está en mayor cantidad, seguido por hexanoato de etilo y Z-3-hexen-1-ol. Además que en volátiles de naranja solo encontramos al linalol (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Cantidad promedio ( $\pm$  E.E) de compuestos contenidos en los extractos de *Psidium guajava* y *Citrus sinensis* obtenida mediante una curva de calibración por CG (N = 7).

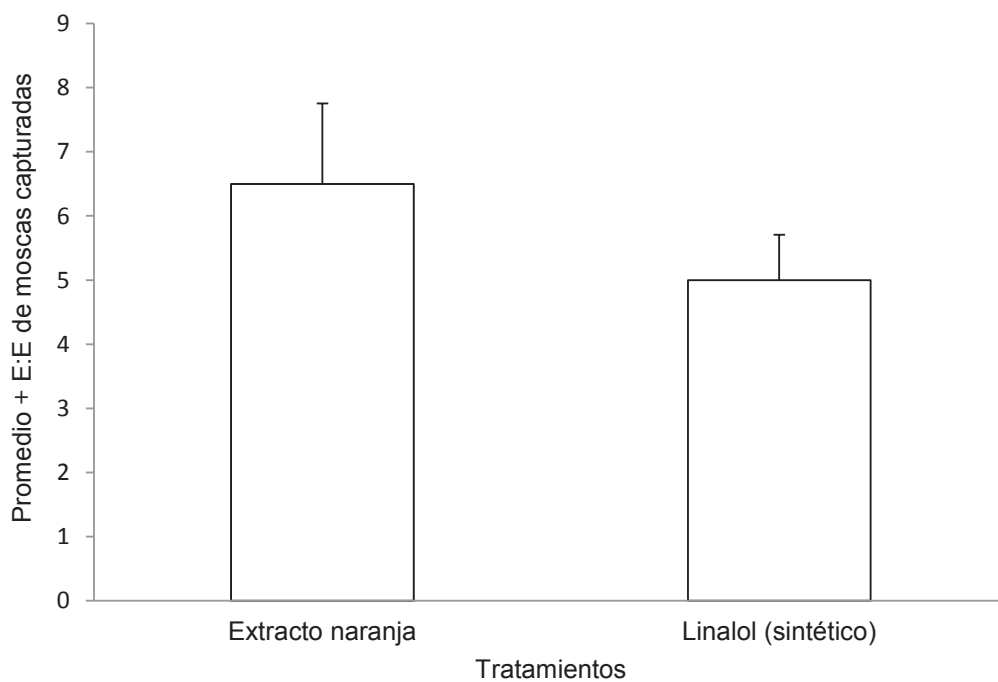
	<b>Compuestos</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>l) (Promedio <math>\pm</math> E.E)</b>
<b>Guayaba</b>	Butirato de etilo	5.43 $\pm$ 1.61
	Z-3-Hexen-1-ol	37.26 $\pm$ 15.39
	Hexanol	15.93 $\pm$ 3.68
	Hexanoato de etilo	49.65 $\pm$ 7.11
	Acetato de hexilo	288.94 $\pm$ 39.66
	Octanoato de etilo	15.98 $\pm$ 4.41
<b>Naranja</b>	Linalol	24.51 $\pm$ 4.21

**Respuesta a extracto de guayaba y mezcla sintética.** En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos en jaulas de campo, al evaluar el extracto de frutos de guayaba contra la mezcla de compuestos sintéticos preparada en base a como se determinó en el extracto, y no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $t = 0.67$  g.l. = 14;  $P > 0.05$ ).



**Fig. 5.** Captura promedio (+ E. E.) de hembras apareadas de *Anastrepha striata* en trampas Multilure cebadas con extracto de guayaba y mezcla sintética. (Prueba  $t$ ,  $P > 0.05$ ).

**Respuesta a extracto de naranja y linalol.** En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos al evaluar extracto de frutos de naranja comparado contra linalol (compuesto sintético) y no hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $t = 1.04$ , g.l.= 11;  $P > 0.05$ ).



**Fig. 6.** Captura promedio (+ E. E.) de hembras apareadas de *Anastrepha striata* en trampas Multilure cebada con extracto de naranja y linalol (Prueba  $t$ ,  $P > 0.05$ ).

## Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los volátiles liberados por frutos hospederos (guayaba o naranja) atraen a hembras vírgenes y apareadas de *A. striata* en jaulas de campo. La orientación de un insecto se sugiere que puede ser debido a los compuestos volátiles liberados por la hospedera (Metcalf, 1987). Otros factores como el estado fisiológico (vírgenes y apareadas) de *A. striata* no afectaron la captura de moscas por trampas multilure cebadas con frutos de guayaba o naranja. La atracción de hembras vírgenes de *A. striata* por el fruto, puede ser debido al comportamiento de alimentación. Además la atracción por el fruto puede relacionarse con el hecho de que algunos componentes de la feromona sexual producida por los machos de *A. striata* está formada por hexanoato de etilo, linalol y octanoato de etilo (Heath, et al., 2000). Estos volátiles, previamente han sido identificados en olores de los frutos de guayaba (Malo, et al., 2005) y en el presente trabajo. Las hembras apareadas posiblemente se aproximan al fruto para ovipositar, ya que se sabe que seleccionan un sitio adecuado para oviposición mediante estímulos olfativos y visuales (Prokopy and Papaj, 2001). Tales estímulos incluyen la forma, el tamaño y el color apropiado del hospedero, así como la composición físico-química de la superficie y la pulpa del fruto (Prokopy and Roitberg, 1984).

En la evaluación por GC-EAD de volátiles de guayaba determinamos seis compuestos identificados como butirato de etilo, (Z)-3-hexenol, hexanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo y octanoato de etilo, que fueron activos en hembras apareadas. Por el contrario en volátiles de naranja solo encontramos un compuesto identificado como linalol. En ambas hospederas encontramos diferentes compuesto volátiles atractivos a hembras apareadas de *A. striata*. Esto posiblemente se pueda deber a que las larvas

de *A. striata* tiene preferencia a guayaba y en menor intensidad a la naranja dulce (*Citrus sinensis* L.) (Norrbon, 2003).

En un estudio realizado con extractos de frutos de guayaba, se determinaron ocho compuestos antenalmente activos para *A. ludens*, que fueron identificados como butirato de etilo, (E)-3-hexenol, (Z)-3-hexenol, hexanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, butirato de (Z)-3-hexenilo y octanoato de etilo (Malo, et al., 2005). De los 8 compuestos identificados por Malo, et al. (2005), seis fueron encontrados en el presente trabajo como atractivos para *A. striata*. Además, de los compuestos identificados en el presente estudio, el hexil acetato fue reportado atractivos para *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Hwang, et al., 2002). También es un compuesto aislado de frutos de manzana y que forma parte de la mezcla atrayente utilizada en el manejo de *Ragoletis pomonella* Walsh en los Estados Unidos de Norteamérica (Zhang, et al., 1999).

En volátiles de frutos de naranja solo se encontró antenalmente activo al linalol. Este compuesto juega un papel importante como estímulo de insectos fitófagos en pruebas de EAG (Visser, 1986). Además ha sido encontrado antenalmente activo en hembras *A. ludens* a volátiles de naranja agria *C. aurantium* (Rasgado, et al., 2009) y de sapote blanco *Casimiroa edulis* Oerts (González, et al., 2006) en túnel de vuelo, GC-EAD y jaulas de campo.

La captura de *A. striata* en jaula de campo con la mezcla de compuestos sintéticos fue similar al número de capturas con extractos de frutos. Estos resultados indican que los compuestos antenalmente activos en la mezcla de frutos de guayaba y/o naranja actúan como un estímulo olfativo y son los responsable de dicha atracción.



## Conclusiones

1. En este trabajo se encontró que los volátiles liberados por frutos de guayaba o naranja son los responsables de la atracción de *A. striata* en jaulas de campo. Otros factores como el estado fisiológico (vírgenes y apareadas) de *A. striata* no afectaron la captura.
2. En volátiles de frutos de guayaba se encontró que los compuestos antenalmente activos en hembras fueron butirato de etilo, (Z)-3-hexenol, hexanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo y octanoato de etilo. En volátiles de naranja se encontró que solo el linalol es un compuesto antenalmente activo.
3. Los compuestos antenalmente activos presentes en frutos de guayaba y/o naranja actúan como un estímulo olfativo y son los responsable de dicha atracción de hembras apareadas de *A. striata* en jaulas de campo

A manera de recomendación se podrían realizar estudios posteriores comparando los compuestos sintéticos determinados en este trabajo combinados con estímulos visuales que podrían incrementar la atracción y captura de *A. striata* en condiciones naturales. Además sería pertinente realizar estudios electroantenográficos con insectos silvestres, y asimismo realizar estudios más puntuales, como a nivel neuronal, sobre el estímulo que provoca cada uno de los compuestos volátiles encontrados como atractivos para dicha especie.

## Literatura citada

- Aluja, M. and Prokopy, J. 1992. Host search behavior by *Rhagoletis pomonella* flies: Inter-tree movement patterns in response to wind-borne fruit volatiles under field conditions. *Physiological Entomology*, 17, 1-8.
- Bernays, E. A. and Chapman, R. F. 1994. Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman and Hall. New York. 312pp
- Billeter, J. C., Atallah J., Krupp J. J., Millar J. G. and Levine J. D. 2009. Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 461, 987-991.
- Browne, B. L. 1977. Host-related responses and their suppression: some behavioral considerations. In Shorey H. H. and McKelvey J. J. Jr., Ed. *Chemical Control of Insect Behaviour: Theory and Application*. Wiley, New York, pp. 117-127.
- Fein, B.L., Reissig, W.H. and Roelofs, W.L 1982. Identification of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 1473-1487.
- Frazer, J.L. 1985. Nervous system: sensory system. In: John Wiley and Sons. Ed. Blum M.S. *Fundamentals of Insect Physiology*. New York, pp 598.
- Fuyama, Y. 1978. Behavior genetics of olfactory responses in *Drosophila*. II. An odorant-specific variant in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*, 8, 399-414.
- González, R., Toledo, J., Cruz-Lopez, L., Virgen, A., Santiesteban, A. and Malo, E.A., 2006. A new blend of white sapote fruit volatiles as potential attractant to

*Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99, 1994 - 2001.

Heath, R.R., Landolt, P.J., Robacker, D.C., Dueben, B.D. and Epsky, N.D. (2000).

Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior.

En: Aluja, M. and Norrbon, A.L. (Eds). *Fruit flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution of Behaviour*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp 793-809.

Hoffmann, A. A. and O'Donnell S. 1990. Heritable variation in resource use in

*Drosophila* in the field. En *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*.

Barker J. S. F., Starmer W. T. y McIntyre R. (eds.). Plenum Press. New York.

Hwang, J. S., Yen, Y. P. Chang, M. C. and. Liu, C. Y. 2002. Extraction and identification

of volatile components of guava fruits and their attraction to oriental fruit fly,

*Bactrocera dorsalis* (Hendel), *Plant Protection Bulletin* (Taipei) 44, 279-302.

Jaenike, J. 1990. Factors maintaining genetic variation for host preference in

*Drosophila*. En *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. Barker J. S.

F., Starmer W. T. y McIntyre R. (eds.). Plenum Press. New York.

Kanaujia, S, and Kaissling K-E. 1985. Interactions of pheromone with moth antennae:

Adsorption, desorption and transport. *Journal of Insect Physiology*, 31, 71-81.

Laska, M., Galizia, C.G., Giurfa, M., and Menzel, R. 1999. Olfactory discrimination ability

and odor structure-activity relationships in honeybees. *Chemical Senses*, 24, 429-

438.

Libert, S., Zwiener J., Chu X., Vanvoorhies W., Roman G. and Pletcher S. D. 2007.

- Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors. *Science*, 315, 1133-1137.
- Malo, E.A., Cruz-López, L., Toledo, J., Mazo, A.D., Virgen, A., and Rojas, J.C., 2005. Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to guava volatiles. *Florida Entomologist*, 88, 364–371.
- Metcalf, R.L. 1987. Plant Volatiles as insect attractants. CRC Critical Reviews in *Plant Sciences*, 5, 251-301.
- Murlis, J., Elkinton, J. S. and Cardé, R. T. 1992. Odour plumes and how insect use them. *Annual Review of Entomology*, 37, 505-532.
- Nation, J.L. 2002. Insect physiology and biochemistry. CRC Press LLC. Florida. 485.
- Norrbom, A.L. 2003. *Anastrepha striata* Schiner. The Diptera site.<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Anastrep/striata.htm> (23 November 2009).
- Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. and Hardie, J. 1992. The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology*, 37, 67-90.
- Pickett, J.A. and Glinwood, R.T. 2008. Chemical ecology. In: Van Emden H. F. and Harrington R. H. Eds. *Aphids as Crop Pests*, CABI, Wallingford, Connecticut, 235-260.
- Prokopy, R. J. and Roitberg, B. D. 1984. Foraging behavior of true fruit flies. *American Scientist*, 72, 41-49.

- Prokopy, R. J., Poramarcom, R., Sutantawong, M., Dokmaihom, R., and Hendrichs, J. 1996. Localization of mating behavior of released *Bactrocera dorsalis* flies on host fruit in an orchard. *Journal Insect Behavior*, 9, 133-142.
- Prokopy, R. J., Hu, X. P., Jang, E. B., Vargas, R. I., and Warthen, J. D. 1998. Attraction of mature *Ceratitidis capitata* females to 2-heptanone, a component of coffee fruit odor. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1293-1304.
- Prokopy, R.J. and Papaj. D.R. 2001. Behavior of flies of the genera *Rhagoletis*, *Zonosemata*, and *Carpomya* (Trypetinae: Carpomyia), pp. 219-252. In M. Aluja and A. L. Norrbom (eds.), *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rasgado, M.A., Malo, E.A., Cruz-López, L., Rojas, J.C., and Toledo, J. 2009. Olfactory Response of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to *Citrus aurantium* Volatiles. *Journal of Economic Entomology*, 102, 585–594.
- Renwick, J.A.A. and Chew, F.S. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 39, 377–400.
- Robacker, D. C., Warfield, W. C., and Flath, R. A. 1992. A four-component attractant for the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), from host fruit. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1239-1254.
- Robacker, D. C., and Fraser. I. 2002. Attraction of Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to grapefruit: enhancement by mechanical wounding and experience with grapefruit. *Journal of Entomological Science*, 15, 399-413.

- Robacker, D. C., and Fraser I, 2003. Relative attractiveness of oranges and grapefruits to Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a wind tunnel. *Journal of Entomological Science*, 38, 566-575.
- Visser, J. H. 1986. Host Odor Perception in Phytophagous Insects. *Annual Review of Entomology*, 31, 121-144.
- Visser, J. H. 1988. Host-plant finding by insects: orientation, sensory input and search patterns. *Journal of Insect Physiology*, 34, 259-268.
- Vogt, R. G., and Riddiford, L. M. 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293,161-163.
- Vogt, RG. 2003. Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. In Blomquist, G. and Vogt, R.G. (eds), *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology. The Biosynthesis and Detection of Pheromones and Plant Volatiles*. Elsevier Academic Press, London, 391- 445.
- Weems, H. V., Jr. and Fasulo, T. R. 2002. *Guava Fruit Fly, Anastrepha Striata* Shiner (Insecta: Diptera: Tephritidae), Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Warthen, J. D., Lee, C.J., Jang, E. B., Lance, D. R., and Mcinnis, D. O. 1997. Volatile, potential attractants from ripe coffee fruit for female Mediterranean fruit fly. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1891-1900.
- Xu P-X, Atkinson R, Jones DNM, and Smith DP. 2005. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45, 193-200.

Zhang, A., Linn, C., Wright, S. Prokopy, R., Reissig, W. and Roelofs. W. 1999.  
Identification of a new blend of apple volatiles attractive to the apple maggot,  
*Rhagoletis pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1221-1232.

## ANEXO

**Artículo enviado a la revista Insect Science, para su publicación.**

**Manuscript ID:** INS-2014-06-240

**Title:** Olfactory response of *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) to guava and sweet orange volatiles

**Authors:** Díaz-Santiz, Edvin  
Malo, Edi  
Rojas, Julio  
Cruz, Leopoldo  
Hernández-Ortiz, Emilio

**Date Submitted:** 29-Jun-2014



## **Insect Science**

### **Olfactory response of *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) to guava and sweet orange volatiles**

Edvin Diaz-Santiz<sup>1</sup>, Julio C. Rojas<sup>1</sup>, Leopoldo Cruz-Lopez<sup>1</sup>, Emilio Hernández-Ortiz<sup>2</sup> and  
Edi A. Malo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Grupo de Ecología de Artrópodos y Manejo de plagas. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antigua Aeropuerto km 2.5, Tapachula, Chiapas CP 30700, México*

<sup>2</sup>*Programa Moscafrut SAGARPA-IICA, Subdirección de Desarrollo de Métodos. Camino a los Cacahotales S/N, Metapa de Domínguez, Chiapas C. P. 30860. México.*

Correspondence: Edi A. Malo, Grupo de Ecología de Artrópodos y Manejo de plagas. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antigua Aeropuerto km 2.5, Tapachula, Chiapas CP 30700, México.  
Email: [emr@ecosur.mx](mailto:emr@ecosur.mx)

**Abstract** The olfactory response of virgin and mated *Anastrepha striata* Schiner females (Diptera: Tephritidae) to guava (*Psidium guajava* L.) and sweet orange (*Citrus sinensis* L.) volatiles was evaluated in this study. Behavioral responses to guava and sweet orange volatiles were evaluated using multilure traps baited with healthy guava and sweet orange fruits in non-choice tests in field cages. The results showed that flies were attracted to guava and sweet orange volatiles when these fruits were compared with the control (a multilure trap without fruits). Fruit volatiles were sampled by a dynamic headspace technique and analyzed by gas chromatography coupled with electroantennography (GC-EAD). The antennal active compounds in guava volatile extracts were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as ethyl butyrate, (Z)-3-hexenol, hexanol, ethyl hexanoate, hexyl acetate, and ethyl octanoate. Linalool was identified as the only antennal active compound in sweet orange extracts. The biological activity of the synthetic compounds, compared to the fruit extracts, was determined with mated females in field cages. The results showed that *A. striata* mated females responded equally to guava volatile extracts and the synthetic blend formed with six components found to be active in guava and to sweet orange extracts and linalool. This result suggests that the compounds identified mediate the attraction of *A. striata* to guava and orange fruits.

**Key words** *Anastrepha striata*, guava and sweet orange volatiles, multilure traps, GC-EAD, GC-MS, attraction.

## Introduction

The ability to locate and recognize host plants is essential for the survival of insects and their progeny. Insects use visual, olfactory, gustatory and tactile cues as well as humidity and light intensity for host-habitat, host-finding and host acceptance (Pickett *et al.*, 1992; Bernays & Chapman, 1994; Pickett & Glinwood, 2008).

Olfactory systems have evolved great sensitivity and discriminatory power; for example, honeybees can distinguish between many pairs of structurally similar odorants (Laska *et al.*, 1999). The tephritid fruit fly species are able to detect and respond to host volatiles from long distances (Aluja & Prokopy, 1992).

Currently, the importance of insect olfactory perception of volatiles released by host plants has been emphasized. These volatiles can be used by insects for orientation to oviposition sites (Renwick & Chew, 1994). For instance, several studies have reported that Medfly, *Ceratitis capitata* Wiedemann, is attracted to host fruit volatiles (Prokopy *et al.*, 1996, Warthen *et al.*, 1997, Prokopy *et al.*, 1998). *Anastrepha ludens* males and females are attracted to different host volatiles, including yellow chapote, *Sargentia greggii* S. Watson (Robacker *et al.*, 1992); bitter orange, *Citrus aurantium* L. (Rasgado *et al.*, 2009); white sapote, *Casimiroa edulis* Oerst (González *et al.*, 2006); and guava, *P. guajava* (Malo *et al.*, 2005). *Rhagoletis pomonella* Walsh males are caught by traps baited with a blend of hexyl acetate, (E)-2-hexen-1-ol acetate, butyl-2-methylbutanoate, propyl hexanoate, hexyl propanoate, butyl hexanoate, and hexyl butanoate. This blend is currently used for monitoring this pest in apple orchards in the USA (Fein *et al.*, 1982, Zhang *et al.*, 1999).

*Anastrepha striata* Schiner is an insect that attacks a diversity of economically importance fruits, such as guava (Weems & Fasulo, 2002), mangoes (*Mangifera indica*

L.), black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.) and sweet orange (*Citrus sinensis* L.), among other fruits (Norrbom, 2003). However, guava is considered the main host fruit of *A. striata*, whereas other fruits are considered secondary hosts. Despite the economic importance of *A. striata*, no study thus far has investigated the role of olfaction during the host-location behavior of this fruit fly species. Consequently, it remains unknown if females are attracted to common volatiles present in all host fruits or if they are attracted to different volatiles characteristic of each host fruit.

In this study, we first determined the behavioral responses of *A. striata* virgin and mated females to guava and sweet orange; secondly, we located the antennal active volatiles by GC-EAD and identified them by GC-MS; and finally, we tested the biological activity of a synthetic blend against the respective extracts in field cages.

## **Material and Methods**

### *Insects*

*Anastrepha striata* pupae were obtained from the MOSCAFRUT mass-rearing facility (SAGARPA-IICA) located in Metapa de Domínguez, Chiapas. Insects were reared on an artificial diet (Artiaga-López *et al.*, 2004). Pupae were placed in wire rod cages (30 cm high X 30 cm wide X 40 cm deep) covered with tulle cloth (mosquito net type) until the adults emerged. Cages were kept at  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  R.H., and a photoperiod of L12:D12 h. Newly-emerged adults were separated by sex in glass containers (30 X 30 X 40 cm); approximately 400 flies were placed in each container. Flies were fed *ad libitum* with a mixture of hydrolyzed protein (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) and sugar (ratio 1:3), and water was provided in test tubes covered with cotton wicks. Virgin and mated females, 8-12 days old, were used in all experiments. Mated females were obtained by

placing two *A. striata* mature virgin females and one male in a cage (30 x 30 x 40). After mating, the females were placed in separate cages.

### *Fruits*

We used for testing in the field cage and volatile collection mature guava (we measured the Brix degree from three fruits with a refractometer (Pal- $\alpha$  ATAGO, Tokyo, Japan, and the mean values was 15.4 Brix degree) and mature sweet orange (14.9 Brix degree) fruits collected from trees in the gardens of houses located near Tapachula, Chiapas, Mexico, and transported in plastic bags to the laboratory. Immature fruits were enclosed in tulle cloth bags to protect them against any insect damage and to obtain healthy fruits for the experiments.

### *Behavioral Responses of A. striata to fruit volatiles*

The response of *A. striata* mated and virgin females to guava and sweet orange fruits was evaluated in the field cages. A healthy mature guava or sweet orange was placed inside of a multilure trap (Better World Manufacturing, Fresno, CA, USA). Another multilure trap without fruit was used as the control. Fruits were cut 2 h before being used in the assays. The experiment was performed in clear cylindrical nylon screen field cages (2.8 m diameter x 2 m high) placed in the "Rancho el Refugio," Tapachula, Chiapas. We used eight field cages simultaneously, and each cage was considered a replicate. The traps were hung randomly, but equally spaced. Each test was started by releasing 25 *A. striata* virgin (8-12 d old) or mated (10-12 d old) females into each field

cage at 08:00 h, and the number of flies captured by each trap was recorded 11 h later (19:00 h). In total, we performed in guava sixteen replicates for virgin female and nine for mated females, and fourteen for virgin females and nine for mated females in sweet orange.

### *Collection of volatiles*

The volatile collection technique used in this study has been described elsewhere (Cruz-López *et al.*, 2006) and consisted of a cylindrical glass aeration chamber (58 cm long x 18.5 cm i.d.). Healthy mature fruits were placed in this chamber (ca. 0.5 kg each replicate). A charcoal-filtered airstream (0.5 l per min) was maintained through the glass aeration chamber for 24 h. Fruit volatiles were collected on Super Q (50–80 mesh; Water Associates, Milford, MA, USA) packed between plugs of silanized glass wool in a Pasteur pipette. Fruit volatiles were eluted from the Super Q with 400 µl of dichloromethane (HPCL grade). The extracts were stored at -20 °C until analysis. Ten samples of each fruit (guava and sweet orange) were collected.

### *GC-EAD of fruit extracts*

GC-EAD analysis was performed to locate the antennal active components in guava and sweet orange fruit volatiles using a system described elsewhere (Malo *et al.*, 2005; Cruz-Lopez *et al.*, 2006). The GC (Shimadzu GC-2010 Plus, Tokyo, Japan) was equipped with a non-polar capillary column (Factor Four VF-5ms of 30 m by 0.25 mm i.d., Supelco, Toluca, Mexico), a flame ionization detector (FID), and a split/splitless

injector. The injector was operated in splitless mode. Hydrogen was used as a carrier gas at 2.0 ml/min. The GC was coupled to an electroantennogram (NL 1200, Syntech, Hilversum, The Netherlands). The oven temperature was programmed at 50 °C for 2 min and then increased 5 °C /min to 250 °C and held for 10 min. At the end of the capillary column, a splitter fused silica Y connector (Supelco Analytical, USA) distributed the effluent from the column to the FID and to a transfer line toward the EAG preparation (Arn *et al.*, 1975). The EAD preparations were made using the mated female head, which was cut off carefully, and a reference electrode was inserted into its base with a glass capillary filled with physiological saline solution (Malo *et al.*, 2004). The distal end of the antenna was inserted into the tip of the recording glass capillary electrode. The signals generated by the antenna and FID were passed through a high-impedance amplifier (NL 1200, Syntech, Hilversum, The Netherlands) and displayed on a monitor using Syntech version 2.6 software (1993-2003) for processing GC-EAD signals. A current of humidified pure air (0.7 liters/min) was constantly directed onto the antenna through a 10-mm-diameter glass tube by using a stimulus flow controller (CS-05, Syntech). Each replicate consisted of one fly antenna, and ten different antennae of mated females were used in this test. The criteria to consider a compound antennal active was based on considering those compounds that showed antennal activity in more of 50% of the sample injected. To confirm the antennal activity, a synthetic blend was injected (100 ng) with mated females in the GC-EAD.

### *Chemical analysis*

The antennal active compounds were identified using GC-MS equipment (CP-3800 gas chromatograph, Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a non-polar capillary column (Factor Four VF-5ms of 30 m by 0.25 mm i.d., Supelco, Toluca México) linked to a Varian Saturn 4D mass spectrograph (Varian 2200, Palo Alto, CA, USA). The injector was operated in splitless mode. Helium was used as the carrier gas at 1.0 ml/min. The oven temperature was programmed at 50 °C for 2 min and then 5 °C /min to 250 °C and held for 10 min. Ionization was by electron impact at 70 eV. We identified the compounds present in guava and sweet orange fruit extracts by comparing the retention time and the mass spectra of NIST-92 & NIST-98 databases; the results were confirmed with synthetic standards.

The amounts of compounds in the extracts were quantified using a calibration standard of each compound identified (1-100 ng) (Sigma-Aldrich, Toluca, México).

### *Behavioral responses of A. striata mated females to synthetic compounds*

The evaluations were performed in two-choice tests using multilure traps placed in field cages. In the first experiment, we evaluated the attractiveness of the six-component blend of guava, formulated according to the relative proportions of each compound in the natural extract of guava, against 100 µl of guava fruit extract. In the second experiment, we evaluated the attractiveness of 100 µl of linalool against 100 µl of orange extract. The conditions and bioassay technique used in these evaluations were similar to



those described above. We used eight field cages simultaneously, and each cage was one replicate.

### *Statistical analysis*

Data were analyzed using R version 2.14.1 (2011-12-22) software. The results of the response of *A. striata* to fruit volatiles in field cages were transformed  $\sqrt{x + 1}$  to meet the assumption of normality and homogeneity of variances. The data were then analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), considering physiological stage (virgin or mated) as the first factor and the treatments (fruit or control) as the second factor. Data of the guava or sweet orange extracts against the synthetic blend tested in the field cage were analyzed using t-tests.

## **Results**

### *Behavioral responses of A. striata to fruit volatiles.*

The two-way ANOVA analysis of the number of females captured with multilure traps showed that the treatment (guava fruit vs control) significantly affected the capture ( $F = 26.4$ ;  $df = 1, 46$ ;  $P < 0.001$ ). However, the physiological stage (virgin or mated) ( $F = 2.42$ ;  $df = 1, 46$ ;  $P > 0.05$ ) and the treatment X physiological stage interaction ( $F = 1.17$ ;  $df = 1, 46$ ;  $P > 0.05$ ) did not affect the capture (Fig. 1a).

The two-way ANOVA analysis of the number of females captured with multilure traps showed that the treatment (orange fruit vs control) significantly affected the capture ( $F = 21.9$ ;  $df = 1, 42$ ;  $P < 0.001$ ). However, the physiological stage (virgin or mated) ( $F =$

2.29;  $df = 1, 42$ ;  $P > 0.05$ ) and the treatment X physiological stage interaction ( $F = 0.11$ ;  $df = 1, 42$ ;  $P > 0.05$ ) did not affect the capture (Fig. 1b).

#### *GC-EAD analysis of fruit extracts*

The GC-EAD analysis of the guava fruits showed six antennal active compounds in *A. striata* mated females. The compounds were identified as ethyl butyrate, (Z)-3-hexenol, hexanol, ethyl hexanoate, hexyl acetate and ethyl octanoate. The quantification of antennal active compounds in guava extracts showed that hexyl acetate was present in the highest quantity followed by ethyl hexanoate and (Z)-3-hexen-1-ol. The antennal activity of the synthetic compounds was confirmed by the response of mated females to 100 ng of injected synthetic blend (Fig. 2). The orange extracts showed antennal activity in mated females to one compound, identified as linalool (Fig. 3), and the GC-EAD mated female response was confirmed by 100 ng of injected synthetic linalool.

#### *Behavioral responses of A. striata mated females to synthetic compounds*

There were no differences in the number of mated females captured by traps baited with the synthetic blend of guava and traps baited with guava extracts ( $t = 0.67$ ;  $df = 14$ ;  $P > 0.05$ ) (Figure 4a). Additionally, mated females did not show any preference for the orange extracts or for the synthetic linalool ( $t = 1.04$ ;  $df = 11$ ;  $P > 0.05$ ) (Fig. 4b).

## Discussion

The results obtained in this work show that volatiles released by host fruits (guava or orange) attract *A. striata* virgin and mated females in field cages. Other factors, such as the physiological state (virgin and mated) of *A. striata*, did not affect the capture by multilure traps baited with guava or orange. The attraction of *A. striata* virgin females by the host fruit volatiles may be due to feeding behavior. Additionally, this attraction by the host fruit volatiles may be related to the fact that the sex pheromone components produced by the males of *A. striata* are composed of ethyl hexanoate, linalool and ethyl octanoate (Heath *et al.*, 2000); the esters were antennal active in guava fruits extracts, and linalool was antennal active in orange fruit extracts. Those types of compounds were also identified in guava fruit volatiles (Malo *et al.*, 2005), and in the present work. The fruits possibly attracted the mated females because they were searching for fruits on which to oviposit; females select fruits on which to oviposit using olfactory and visual stimuli (Prokopy & Papaj, 2001). The stimuli include the shape, size and the color of the host as well as the physicochemical composition of the peel and the pulp of the fruit (Prokopy & Roitberg, 1984).

We identified six compounds of guava volatiles that were antennal active to mated females of *A. striata* using GC-EAD and GC-MS. The compounds were identified as ethyl butyrate, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol, ethyl hexanoate, hexyl acetate and ethyl octanoate. In contrast, in orange volatile extracts, only linalool was identified. Different compounds that attract mated females of *A. striata* were identified in both hosts. It is possible that *A. striata* attacks mainly guava fruits and attacks sweet orange with lesser intensity (Norrbom, 2003). In guava fruit volatiles, eight antennal active compounds to *A.*

*ludens* were identified: ethyl butyrate, (E)-3-hexen-1-ol, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol, ethyl hexanoate, hexyl acetate, (Z)-3-hexenyl butyrate, and ethyl octanoate (Malo *et al.*, 2005). Of the eight compounds identified by Malo *et al.* (2005), six were found in the present work to be attractive to *A. striata*. Moreover, from the compounds identified in this work, hexyl acetate was attractive to *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Hwang *et al.*, 2002). This compound has also been isolated from apple fruit and is a component of the blend used to control *Ragoletis pomonella* Walsh in the USA (Fein *et al.* 1982).

In orange volatiles extracts, only linalool was antennal active to mated females of *A. striata*. This compound plays an important role in the EAG test as a stimulus of many phytophagous insects (Visser, 1986). It was also reported to be antennal active in females of *A. ludens* in *C. aurantium* volatile extracts (Rasgado *et al.*, 2009) and *Casimiroa edulis* Oerts (González *et al.*, 2006) in wind tunnel, GC-EAD and field cage tests. The capture of *A. striata* females in field cages with the guava synthetic blend was similar to the capture of guava volatile extracts. Similar results were found with sweet orange volatile extracts compared to linalool.

In conclusion, in this work, we found that the guava and sweet orange volatiles attracted mated *A. striata* females in field cages. The blend of volatiles in guava extracts were identified as ethyl butyrate, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol, ethyl hexanoate, hexyl acetate and ethyl octanoate. Linalool was identified as the unique antennal active compound in sweet orange extracts. These results suggest that the antennal active compounds present in the guava or orange fruits act as olfactory stimuli responsible for attraction and demonstrate that mated *A. striata* females use different volatiles.

## Acknowledgements

We thank Antonio Santiesteban and Armando Virgen for their technical assistance in laboratory, and during the field cage test. The Campaña Nacional Contra Moscas de la Fruta, Programa Moscamed-Moscafrut (SAGARPA-SENASICA) for providing the flies used in this study. Díaz- Santiz E. thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) for its financial support for postgraduate.

## References

- Aluja, M. and Prokopy, J. (1992). Host search behavior by *Rhagoletis pomonella* flies: Inter-tree movement patterns in response to wind-borne fruit volatiles under field conditions. *Physiological Entomology*, 17, 1-8.
- Arn, H., Standler, E. and Rauscher, S. (1975). The electroantennographic detector. A selective and sensitive tool in the gas chromatographic analysis of insect pheromones. *Z. Naturforsch*, 30, 722-725.
- Artiaga-López, T., Hernández, E., Domínguez-Gordillo, J., Moreno, D.S. and Orozco-Davila, D (2004) Mass-production of *Anastrepha obliqua* at the moscafrut fruit fly facility, Mexico. *Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance* (ed. by BN Barnes), pp. 389-392. Isteg Scientific Publications, Irene, South Africa.
- Bernays, E. A. and Chapman, R. F. (1994). *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. Chapman & Hall. New York. 312pp.

- Cruz-López, L., Malo, E.A., Toledo, J., Virgen, A., del Mazo, A. and Rojas, J.C (2006). A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. *Journal of Chemical Ecology* 32: 351–365.
- Fein, B.L., Reissig, W.H. and. Roelofs, W.L. (1982). Identification of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 1473-1487.
- González, R., Toledo, J., Cruz-Lopez, L., Virgen, A., Santiesteban, A. and Malo, E.A. (2006). A new blend of white sapote fruit volatiles as potential attractant to *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99, 1994-2001.
- Heath, R.R., Landolt, P.J., Robacker, D.C., Dueben, B.D. and Epsky, N.D. (2000). Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior. En: Aluja, M. and Norrbom, A.L. (Eds). *Fruit flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution of Behaviour*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 793-809 pp.
- Hwang, J. S., Yen, Y. P. Chang, M. C. and. Liu, C. Y. (2002). Extraction and identification of volatile components of guava fruits and their attraction to oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), *Plant Protection Bulletin* (Taipei) 44, 279-302.
- Laska, M., Galizia, C.G., Giurfa, M., and Menzel, R. (1999). Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees. *Chemical Senses*, 24, 429-438.
- Malo, EA, Cruz-López, L, Castrejón, V.R, Rojas J.C. (2004). Antennal sensilla and electrophysiological response of male and female *Spodoptera frugiperda*

- (Lepidoptera: Noctuidae) to conspecific sex pheromone and plant odors. *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 1273-1284.
- Malo, E.A., Cruz-López, L., Toledo, J., Mazo, A.D., Virgen, A., and Rojas, J.C. (2005). Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to guava volatiles. *Florida Entomologist*, 88, 364-371.
- Norrbom, A.L. (2003). *Anastrepha striata* Schiner. The Diptera site. <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/Anastrep/striata.htm> (23 November 2009).
- Pickett, J.A., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M. and Hardie, J. (1992). The chemical ecology of aphids. *Annual Review of Entomology*, 37, 67-90.
- Pickett, J.A. and Glinwood, R.T. (2008). Chemical ecology. In: Van Emden H. F. and Harrington R. H. Eds. *Aphids as Crop Pests*, CABI, Wallingford, Connecticut, 235-260.
- Prokopy, R. J. and Roitberg, B. D. (1984). Foraging behavior of true fruit flies. *American Scientist*, 72, 41-49.
- Prokopy, R. J., Poramarcom, R., Sutantawong, M., Dokmaihom, R., and Hendrichs, J. (1996). Localization of mating behavior of released *Bactrocera dorsalis* flies on host fruit in an orchard. *Journal Insect Behavior*, 9, 133-142.
- Prokopy, R. J., Hu, X. P., Jang, E. B., Vargas, R. I., and Warthen, J. D. (1998). Attraction of mature *Ceratitis capitata* females to 2-heptanone, a component of coffee fruit odor. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1293-1304.
- Prokopy, R.J. and Papaj, D.R. (2001). Behavior of flies of the genera *Rhagoletis*, *Zonosemata*, and *Carpomya* (Trypetinae: Carpomyia), pp. 219-252. In M. Aluja and A. L. Norrbom (eds.), *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Rasgado, M.A., Malo, E.A., Cruz-López, L., Rojas, J.C., and Toledo, J. (2009). Olfactory Response of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to *Citrus aurantium* Volatiles. *Journal of Economic Entomology*, 102, 585-594.
- Renwick, J.A.A. and Chew, F.S. (1994). Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, 39, 377-400.
- Robacker, D. C., Warfield, W. C. and Flath, R. A. (1992). A four-component attractant for the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), from host fruit. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1239-1254.
- Visser, J. H. (1986). Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31, 121-144.
- Weems, H. V., Jr. and Fasulo, T. R. (2002). Guava Fruit Fly, *Anastrepha striata* Shiner (Insecta: Diptera: Tephritidae), Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Warthen, J. D., Lee, C.J., Jang, E. B., Lance, D. R., and Mcinnis, D. O. (1997). Volatile, potential attractants from ripe coffee fruit for female Mediterranean fruit fly. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1891-1900.
- Zhang, A., Linn, C., Wright, S. Prokopy, R., Reissig, W. and W. Roelofs. (1999). Identification of a new blend of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1221-1232.



## Figure legends

Fig. 1. Mean captures (+ SE) of virgin and mated females of *Anastrepha striata* in Multilure traps against control. A) Baited with guava fruit. B) Baited with sweet orange fruit. \*\*\* Denotes statistically significant difference at  $P < 0.001$ .

Fig. 2. Antennal response of mated females of *Anastrepha striata* by GC-EAD: A) Guava volatiles extracts. B) Synthetic blend, where 1) Ethyl butyrate, 2) (Z)-3-Hexenol, 3) Hexan-1-ol, 4) ethyl hexanoate, 5) hexyl acetate, 6) ethyl octanoate. The antennal active peaks were only those that was repeated over 50% of the sample injected. In total, we evaluated 10-mated females' antennae to guava volatile extracts and 10 to synthetic blend.

Fig. 3. Antennal response of mated females of *Anastrepha striata* by GC-EAD: A) Sweet orange volatile extracts. B) Synthetic compound, where 1) linalool. The antennal active peak was only those that was repeated over 50% of the sample injected. In total, we evaluated 10-mated female antennae to sweet orange volatile extract and 10 to linalool.

Fig. 4. Mean captures (+ SE) of mated females of *Anastrepha striata* in Multilure traps. A) Baited with guava extract against synthetic blend. B) Baited with sweet orange extract against linalool. (t-test,  $P > 0.05$ ).

Fig 1

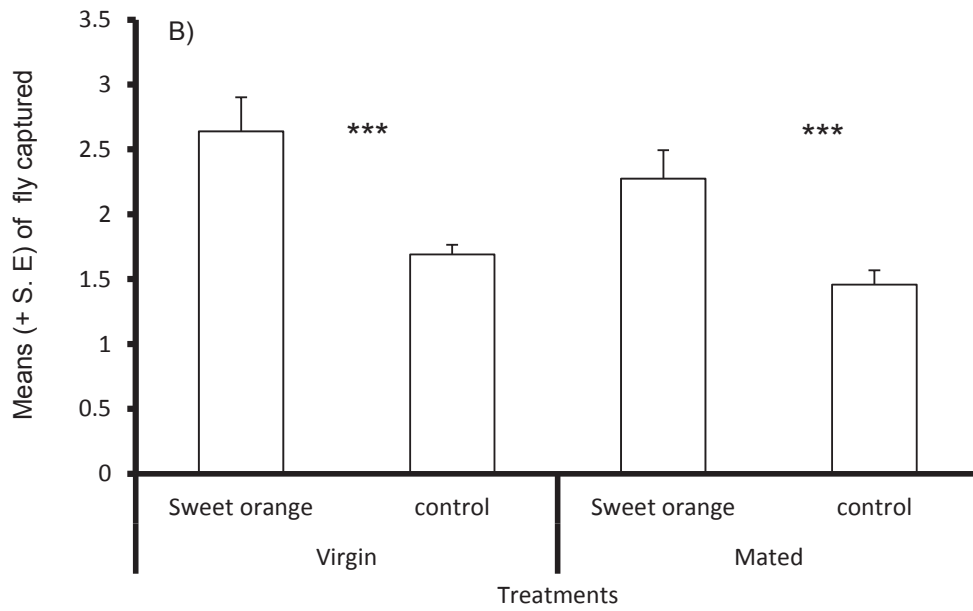
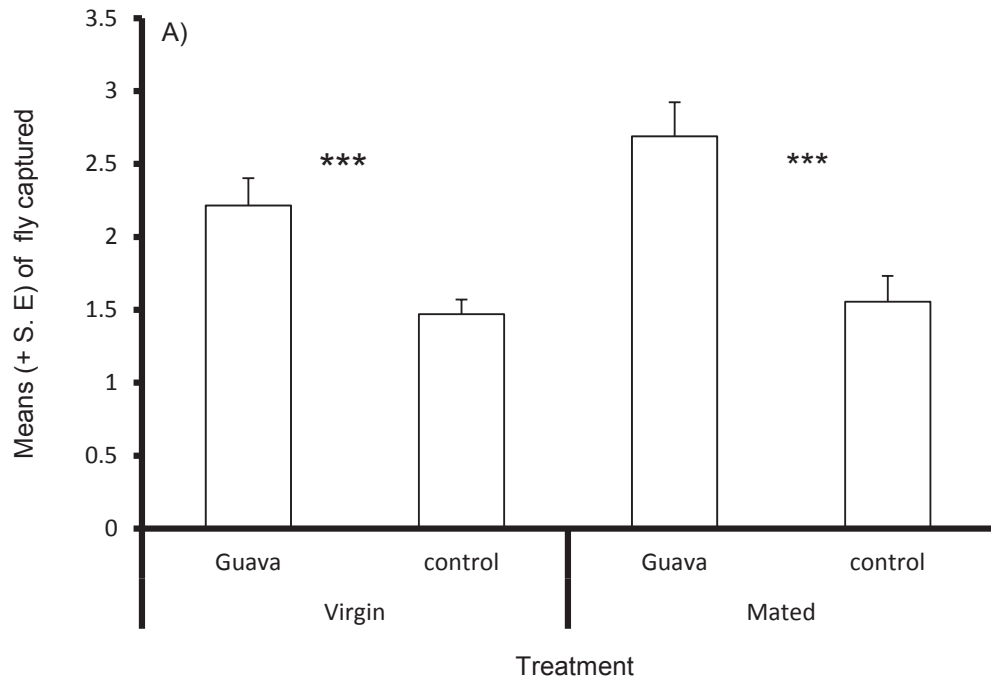


Fig. 2

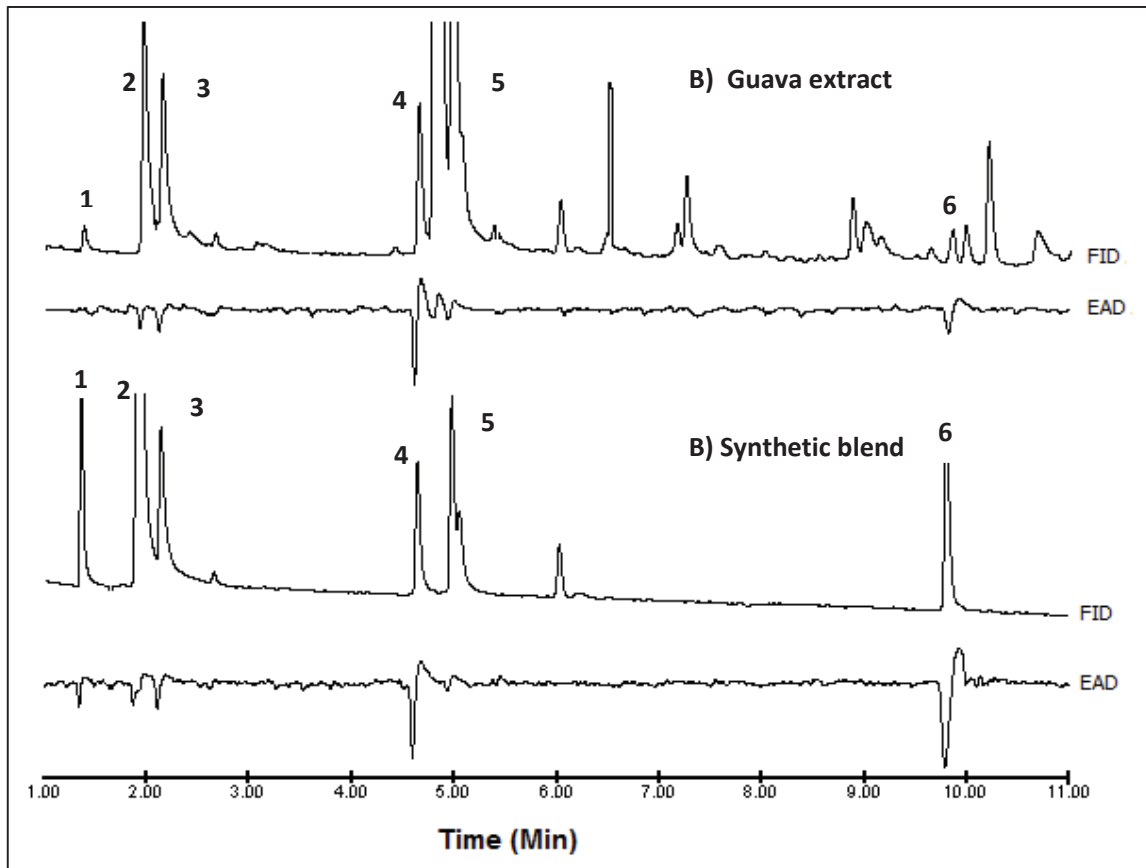


Fig. 3

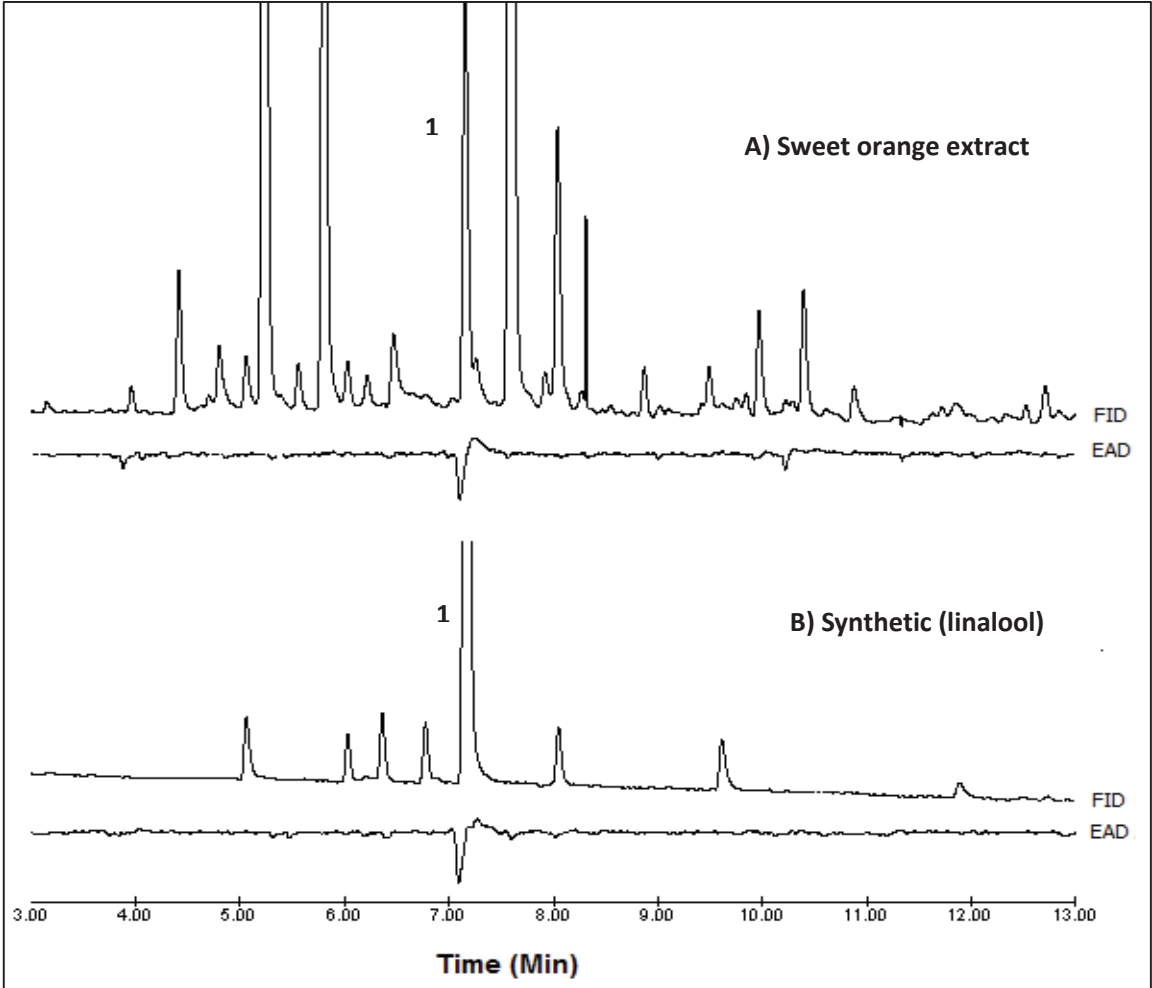


Fig. 4

