

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Señales químicas entre el escarabajo-plaga *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) y la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Valentina VIDAL MEDINA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2021

Señales químicas entre el escarabajo-plaga *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) y la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Valentina VIDAL MEDINA

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Química

Directores:

Alicia A. Romero Frías M.Sc. Dr.Sc.

César A. Sierra M.Sc. Ph.D.

Línea de Investigación:

Ecología Química

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas

Grupo de Investigación en Macromoléculas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2021

All life is linked together in such a way that no part of the chain is unimportant. Frequently, upon the action of some of these minute beings depends the material success or failure of a great commonwealth.

John Henry Comstock

Dedico

A la memoria de mi abuelito porque nunca en la vida olvidaré su consejo “dos horas antes de medianoche valen más que cuatro después”.

A mi madre, María Yolanda Medina, por ser el mejor ejemplo de vida, fortaleza, constancia, apoyo y amor incondicional.

A mi padre, José María (Chepe) Vidal, por transmitirme su amor por la ciencia y siempre regar mi matita de la curiosidad hacia todo.

A mi hermano, Esteban Vidal, por siempre ayudarme y guiarme a ver las cosas desde otra perspectiva y tenerme tanta paciencia.

A mi abuelita, por querer que le explique cada vez con mayor profundidad sobre mi investigación para poder contar con orgullo lo que hace su nieta.

Agradecimientos

A las siguientes entidades por su apoyo financiero, el cual permitió el desarrollo de esta investigación:

- **Centro de Investigación en Palma de Aceite (CENIPALMA).** Programa de Enfermedades y Plagas.
- **Federación Nacional de Cultivadores de Palma (FEDEPALMA).** Fondo de Fomento Palmero.
- **Vicerrectoría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Universidad Antonio Nariño (UAN/VCTI).** Proyecto código 201822 “Evaluación de sustancias atrayentes con base en la ecología química del escarabajo-plaga *Strategus aloeus* para su manejo en cultivos de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)”.
- **Dirección de Investigación de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia.**

A quienes facilitaron la realización de esta tesis de maestría:

- A mi directora **Alicia Romero**, Decana de la Facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño, por ser mi guía, mentora, consejera y una inspiración y ejemplo como persona, mujer y científica. Gracias por su tiempo, conocimientos, apoyo, confianza y paciencia a lo largo de mi formación y mis altos y bajos en este camino.
- A mi director **César Sierra**, profesor titular y líder del Grupo de Investigación en Macromoléculas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, por seguir enseñándome a nunca bajar los brazos, perder el positivismo ni la tranquilidad y por siempre confiar en mí y en mis capacidades personales, académicas y profesionales.
- Al doctor **Alex Bustillo**, investigador emérito, al doctor **Anuar Morales**, líder de Entomología, y a **Rosa Aldana**, investigadora de Cenipalma, por permitirme formar parte del Centro de Investigación, ayudarme a crecer académica y profesionalmente, y por suministrarme los insectos y las palmas, así como compartir conmigo su conocimiento en el área de la entomología y la agroindustria.
- A la profesora **Carolina Chegwin** del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por recibirme y poner a mi disposición la infraestructura de su laboratorio.
- Al profesor **Edgar Daza** del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme instalarme y establecer las colonias de *S. aloeus* en su laboratorio.
- Al profesor **Jorge Molina**, director del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes y a **Melanie Ramírez**, candidata a Doctora en Ciencias, pertenecientes al Centro de Investigaciones en Microbiología Parasitología Tropical

(CIMAT) de la Universidad de los Andes, por poner a mi disposición la infraestructura de su laboratorio para las pruebas electrofisiológicas y compartir conmigo su conocimiento a este respecto.

- A todo el **Grupo de Investigación de Química de Hongos Macromicetos Colombianos** de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia por acogerme siempre como una de ellos.
- Al **Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas**, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño, en especial a **Ángela Rodríguez**, por sus aportes en el estudio de los semioquímicos de los insectos plaga de la familia taxonómica Scarabaeidae y a **Laura Arias**, por sus aportes en la evaluación comportamental del *S. aloeus*, por sus risas y apoyo constante a lo largo de esta investigación.
- A **Laura Valencia**, candidata a Magister en Ciencias e integrante del Grupo de Química Teórica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, por su contribución con la realización del análisis de agrupamiento y por su constante apoyo.
- A todo el **Grupo de Investigación de Macromoléculas** del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por ser una familia de cual amo ser parte, en especial a **Ana Yuri Viviana, Diana Peña, Elsa Arias y Andrés Rodríguez**, por ser el regalo más lindo que me deja esta etapa y por ser luciérnagas que con su luz me iluminaron y acompañaron en todo este camino.
- A mis amigas del alma y cómplices de vida **Martha Cruz y Mayra Aguirre**, por haberme acompañado y contribuido a resolver y sobrellevar todas las pruebas de salud, académicas y afectivas que se presentaron a lo largo de esta etapa, llenándome siempre de amor, luz, fuerzas y apoyo incondicional para llegar hasta el final.
- A mis amigos **Juli, Alejo, Miguel, Mishell, Albert, Erika, Camila, Perdo, Chucho, Evajuliana, Ximena, Negri y Paola**, por brindarme su compañía, sus consejos personales, académicos y profesionales, y darme ánimos en las pruebas sobrellevadas a lo largo de este proceso y por siempre, con cariño, escucharme sobre mis “bichos”.
- A mis monstruos del alma **Cuba y Kirchhoff**, por ser mis motores de amor, mis guardianes de vida y compañeros en cada segundo, idea, palabra, risa, lágrima, anochecer y amanecer.
- A toda mi **Familia** por su entusiasmo, orgullo y motivación para seguir adelante.

Resumen

En Colombia, el cultivo de palma de aceite ha representado, desde 1960, uno de los cultivos agroindustriales de mayor importancia debido a su gran productividad. Actualmente, el país es el cuarto productor de aceite de palma a nivel mundial, y el primero en América, con más de 550 mil hectáreas de palma sembrada. Colombia cuenta con cuatro zonas palmeras, de las cuales la zona oriental representa el 41% del total de hectáreas sembradas. Tal como suele suceder en el campo agrícola, este cultivo, y principalmente el de la zona oriental, se ve afectado por enfermedades y plagas, entre las cuales se encuentra el *Strategus aloeus*, comúnmente conocido como escarabajo torito. Considerando las serias repercusiones económicas resultantes de la infestación de los cultivos por este insecto, en el 2015 el ICA declaró esta especie como plaga de control oficial.

Una de las tácticas del Manejo Integrado de Plagas (MIP) consiste en el control etológico a través del uso de semioquímicos o compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que actúan como modificadores del comportamiento de la plaga. Para el *S. aloeus*, la feromona reportada por Rochat *et al.* (2000) no ha sido efectiva en campo. Por lo tanto, persiste la necesidad de seguir estudiando los semioquímicos de esta especie.

Este estudio se realizó con el objetivo de identificar los semioquímicos responsables de las interacciones en el sistema hospedero-huésped, constituido por la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) y el insecto-plaga *Strategus aloeus*. Para tal fin, la investigación cubrió las siguientes etapas: extracción de los volátiles liberados por la planta hospedera y por los individuos machos de *S. aloeus*; separación, análisis e identificación de los VOCs mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; y, validación de algunos VOCs mediante la evaluación de la respuesta electrofisiológica y comportamental de los insectos frente a los compuestos identificados.

Mediante las extracciones por *Headspace* Micro Extracción en Fase Sólida (HS-MEFS) y *Headspace* Dinámico (HSD) se identificaron 45 VOCs liberados por la palma de aceite (*E. guineensis*), alimento y hospedero natural del *S. aloeus*. Entre los cuales se identificaron la 2-butanona y la 3-pentanona, cetonas previamente reportadas por Rochat *et al.* (2000) como constituyentes de la feromona del insecto, lo que indicó su participación en la interacción interespecífica. Por medio de la extracción directa con hexano de las glándulas, en los insectos adultos de *S. aloeus* se identificaron el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, el 4-metiloctanoato de etilo y el acetato de *sec*-butilo como VOCs macho-específicos de esta especie. La respuesta comportamental de insectos adultos de ambos sexos de *S. aloeus* frente a estos tres compuestos, solos o en mezcla, demostró su atracción significativa, lo que sugiere su participación en la interacción intraespecífica, es decir, como feromona de la especie.

Los semioquímicos identificados en la interacción *Elaeis guineensis*- *Strategus aloeus* representan una alternativa para ser incorporados en el MIP de esta plaga en cultivos de palma de aceite, por lo que se recomienda su evaluación en campo.

Palabras clave: Semioquímicos; *Elaeis guineensis* Jacq.; *Strategus aloeus*; MIP.

Abstract

The oil palm has been one of the most important agro-industrial crops in Colombia since 1960, due to its high productivity. Currently, the country is the fourth largest palm oil producer in the world, and the first in the Americas, with more than 550,000 hectares of plantations. Colombia has four palm-growing zones, of which the eastern zone accounts for 41% of the total planted area. As is often the case in the agricultural field, this crop, and mainly in the eastern zone, is affected by diseases and pests, including the *Strategus aloeus*, commonly known as the bull beetle. The serious economic repercussions resulting from *S. aloeus* infestation led ICA, in 2015, to declare this species as subject to official control.

One of the tactics of Integrated Pest Management (IPM) consists of ethological control through the use of semiochemicals or volatile organic compounds (VOCs) that act as pest behavior modifiers. For *S. aloeus*, the pheromone reported by Rochat *et al.* (2000) has not been effective in the field. Thus further study of the semiochemicals of this species is required.

This study was designed to identify the semiochemicals responsible for interactions in the oil palm (*Elaeis guineensis*) host-host system with the pest insect *Strategus aloeus*. To this end, the research covered the following stages: extraction of volatiles released by the host plant and by male *S. aloeus* individuals; separation, analysis and identification of VOCs by gas chromatography coupled with mass spectrometry; and, validation of some VOCs by evaluating the electrophysiological and behavioral response of insects to the identified compounds.

In Headspace Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME) and Dynamic Headspace (DHS) extractions 45 VOCs released by oil palm (*E. guineensis*), a food source and natural host of *S. aloeus*, were identified. Among them, 2-butanone and 3-pentanone, ketones previously reported by Rochat *et al.* (2000) as constituents of the insect pheromone, were identified, indicating their participation in the interspecific interaction. By direct hexane extraction from glands, 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol, ethyl 4-methyloctanoate and *sec*-butyl acetate were identified as male-specific VOCs in adult *S. aloeus* insects. The behavioral response of adult *S. aloeus* insects of both sexes to these three compounds alone or in mixture showed their significant attraction, suggesting their involvement in intraspecific interaction, i.e., as a pheromone specific to the specie.

The semiochemicals identified in the *Elaeis guineensis*-*Strategus aloeus* interaction constitute an alternative for incorporation in the IPM of this pest in oil palm crops, hence their evaluation in the field is recommended.

Keywords: Semiochemicals; *Elaeis guineensis* Jacq.; *Strategus aloeus*; IPM.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVIII
Glosario y Abreviaturas	XIX
Introducción	1
Contenido	
1. Estado del arte	3
1.1 Los semioquímicos - Generalidades	3
1.2 Etapas del estudio de semioquímicos	4
1.2.1 Muestreo de VOCs	5
1.2.2 Identificación de VOCs	8
1.2.3 Evaluación de la respuesta de los insectos frente a los VOCs	9
1.3 Los semioquímicos en el control etológico del Manejo Integrado de Plagas	10
1.4 La palma de aceite (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	13
1.4.1 Generalidades del cultivo	13
1.4.2 Taxonomía y Morfología de la palma de aceite	15
1.5 El escarabajo-plaga <i>Strategus aloeus</i>	16
1.5.1 Generalidades	16
1.5.2 Biología, ecología y comportamiento	17
1.5.3 Manejo y control	18
2. VOCs liberados por la palma de aceite (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	20
2.1 Antecedentes	20
2.1.1 Biosíntesis de los VOCs en plantas	20
2.1.2 VOCs identificados en las palmas	22
2.1.3 Cairomonas en el manejo de escarabajos	23
2.2 Metodología	25
2.2.1 Obtención de la muestra	25
2.2.2 Extracción de los VOCs de la planta	26
2.2.3 Análisis e identificación de los VOCs extraídos	29
2.3 Resultados y discusión	31
2.3.1 Perfil de volátiles del estípote de la palma de aceite	31
2.3.2 Efecto de la infestación de <i>S. aloeus</i> en el perfil de volátiles de la palma de aceite	36
2.3.3 Perfil de volátiles de los sistemas 1 y 2	39

2.4	Conclusiones.....	41
3.	Identificación de los VOCs liberados por insectos adultos de <i>Strategus aloeus</i>.....	43
3.1	Antecedentes.....	43
3.1.1	Feromonas de escarabajos.....	44
3.1.2	Semioquímicos para el manejo de <i>Strategus aloeus</i> en cultivos de palma de aceite 46	
3.2	Metodología.....	46
3.2.1	Obtención de los insectos.....	46
3.2.2	Extracción de los VOCs de machos y hembras de <i>Strategus aloeus</i>	48
3.2.3	Análisis e identificación de los VOCs extraídos.....	51
3.3	Resultados y discusión.....	52
3.3.1	Colonias de <i>S. aloeus</i> establecidas bajo condiciones de laboratorio.....	52
3.3.2	VOCs liberados por <i>S. aloeus</i>	54
3.4	Conclusiones.....	64
4.	Evaluación de la respuesta del <i>S. aloeus</i> frente a VOCs.....	67
4.1	Antecedentes.....	68
4.2	Metodología.....	68
4.2.1	Evaluación preliminar de respuestas electrofisiológicas del <i>S. aloeus</i> frente a VOCs 69	
4.2.2	Respuestas de comportamiento del <i>S. aloeus</i> frente a los VOCs.....	70
4.3	Resultados y discusión.....	73
4.3.1	Evaluación preliminar de respuestas electrofisiológicas del <i>S. aloeus</i> frente a VOCs de su hospedero y de conespecíficos.....	73
4.3.2	Respuestas de comportamiento del <i>S. aloeus</i> frente a potenciales constituyentes de su feromona.....	74
4.4	Conclusiones.....	76
5.	Conclusiones generales y perspectivas.....	77
5.1	Conclusiones.....	77
5.2	Perspectivas.....	77
5.3	Presentaciones en Congresos.....	77
	Bibliografía.....	80

Lista de figuras

Figura 1-1. Estructura de la terminología actual de los tipos de semioquímicos. Adaptado de Dicke <i>et al.</i> (1988). En azul las clases de semioquímicos diferenciadas por el criterio de su origen y en verde por el beneficiario de la comunicación.	4
Figura 1-2. Diagrama de flujo del enfoque convencional de ecología química. Adaptado de Barbosa <i>et al.</i> (2019).	5
Figura 1-3. Montaje empleado para la recolección de VOCs por <i>Headspace</i> - Micro Extracción en Fase Sólida (HS-MEFS).	6
Figura 1-4. Montaje empleado para la recolección de VOCs por <i>headspace</i> dinámico (HSD). ..	7
Figura 1-5. Tácticas de control consideradas como componentes de un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP). Adaptado de Barrera <i>et al.</i> (2008).	11
Figura 1-6. Ejemplar de <i>Elaeis guineensis</i> del campo experimental de la zona Oriental de Cenipalma "Palmar de las Corocoras". Fotografía: Dr. E. Daza.	13
Figura 1-7. Mapa de los núcleos palmeros en Colombia. Adaptado de Fedepalma (2013).	14
Figura 1-8. Morfología general de la palma de aceite <i>Elaeis guineensis</i> . Tomado de Bauer <i>et al.</i> (2020). a) palma completa, b) bulbo y raíces, c) inflorescencia, d) hojas, e) fruto, f) estípite. 15	
Figura 1-9. Taxonomía y fotografía de <i>Strategus aloeus</i> (macho). Fotografía: V. Vidal-Medina.	16
Figura 1-10. Plan corporal de <i>Strategus aloeus</i> (Scarabaeidae: Dynastinae: Oryctini) a) vista dorsal, b) vista ventral. Adaptado de Sanabria (2012).	16
Figura 1-11. Estadios de desarrollo del <i>Strategus aloeus</i> . Tomado de Rodríguez (2019). ⁹⁵ ...	17
Figura 1-12. Daño de la palma de aceite ocasionado por el <i>S. aloeus</i> provocando el volcamiento y la muerte de palmas jóvenes. Foto: A. Ulloa.	18
Figura 2-1. Descripción general de las cuatro rutas biosintéticas principales de los VOCs de plantas. Los precursores de los VOCs originados en el metabolismo primario (representado en el cuadro azul). Las cuatro vías biosintéticas principales presentadas por las flechas que se originan del cuadro azul: vía shikimato/fenilalanina, vía del ácido mevalónico (MVA), vía del fosfato de metileritritol (MEP) y vía de la lipoxigenasa (LOX) conducen a la emisión de los tipos de VOCs presentados en las nubes moradas. Las flechas apiladas ilustran la participación de múltiples reacciones enzimáticas. DAHP : ácido 3-desoxi-7-fosfo-D-arabinoheptulosónico; DMAPP : pirofosfato de dimetilalilo; E4P : eritrosa 4 fosfato; FPP : pirofosfato de farnesilo; GGPP : pirofosfato de geranilgeranilo; GPP : pirofosfato de geranilo; IPP : pirofosfato de isopentenilo; NPP : pirofosfato de nerilo; PEP : fosfoenolpiruvato; Phe : fenilalanina. Tomado y traducido de Dudareva <i>et al.</i> (2013). ¹⁰	21
Figura 2-2. Muestras naturales empleadas para la caracterización de los trozos estípite de la palma de aceite (Sistema 1): a) bulbo de estípite de <i>Elaeis guineensis</i> de 10 meses, y b) bulbo de estípite de palma de aceite menor de 2 años. Foto: V. Vidal-Medina.	26
Figura 2-3. Montaje de extracción de los VOCs de trozos de estípite de <i>Elaeis guineensis</i> mediante HS-MEFS. Foto: V. Vidal-Medina.	27
Figura 2-4. Montaje de extracción de los VOCs de trozos de estípite de <i>Elaeis guineensis</i> mediante HSD. Foto: V. Vidal-Medina.	28

Figura 2-5. Montaje de HSD para las palmas de aceite plantadas sana e infestada con machos de <i>Strategus aloeus</i> : a) Vista frontal de los montajes, b) Palma infestada con machos de <i>S. aloeus</i> , c) Vista superior del montaje. Foto: V. Vidal-Medina.	29
Figura 2-6. Evidencias de la infestación a) de la palma joven y consumo total del bulbo b) por individuos machos de <i>S. aloeus</i> procedentes de campo después de 2 meses. Foto: Dra. A. Romero-Frías.....	36
Figura 3-1. Individuos de <i>Strategus aloeus</i> procedentes de campo. Izquierda: Macho, Derecha: Hembra.....	43
Figura 3-2. Estructuras químicas de los componentes identificados de feromonas de agregación de escarabajos de la subfamilia Dynastinae, tribu Oryctini.	46
Figura 3-3. Características de dimorfismo sexual de <i>Strategus aloeus</i> (Scarabaeidae: Dynastinae: Oryctini) a) pigidio de hembra, b) pigidio de macho, c) vista frontal de parámero de macho, d) vista lateral de parámero de macho. Adaptado de Sanabria (2012).	47
Figura 3-4. Cabeza y pronoto de machos de <i>Strategus aloeus</i> . Adaptado de Sanabria (2012).	47
Figura 3-5. Diferencia en tamaño y morfología de insectos adultos de <i>Strategus aloeus</i> : Hembra (izquierda). Macho (derecha). Foto: V. Vidal-Medina.	48
Figura 3-6. Montaje empleado para la extracción de los VOCs liberados por <i>Strategus aloeus</i> mediante HS-MEFS. Foto: V. Vidal-Medina.	49
Figura 3-7. Montaje empleado para la extracción de los VOCs liberados por <i>Strategus aloeus</i> mediante HS-MEFS. Foto: V. Vidal-Medina.	50
Figura 3-8. Partes del insecto diseccionadas para la extracción de VOCs directa con solvente de individuos de <i>S. aloeus</i> procedentes de campo a) Últimos segmentos abdominales de una hembra adulta y b) glándula de un macho adulto. Foto: Dra. A. Romero-Frías.....	51
Figura 3-9. Distribución de tamaño de insectos a) machos y b) hembras de <i>Strategus aloeus</i> . Quitar el título de las gráficas, dejar sólo la letra.....	53
Figura 3-10. Distribución de la duración de adultos a) machos y b) hembras de <i>Strategus aloeus</i> . Quitar el título de las gráficas, dejar sólo la letra.....	54
Figura 3-10. Cromatogramas de los VOCs detectados en los extractos en hexano de glándulas de machos a) y de los últimos segmentos abdominales de hembras b) procedentes de campo, analizados en una columna TG-1, mostrando el acetato de <i>sec</i> -butilo macho-específico (2). El número corresponde con el señalado en la Tabla 3-2	59
Figura 3-11. Cromatogramas de los VOCs detectados en los extractos en hexano de glándulas de machos a) y de los últimos segmentos abdominales de hembras b) procedentes de campo, analizados en una columna TG-1, mostrando dos compuestos macho-específicos (23 : 4-metiloctanoato de etilo) y (26 : 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol). Los números corresponden con los señalados en la Tabla 3-2	60
Figura 3-12. Espectros de masas por ionización electrónica del a) compuesto mayoritario 26 detectado en el extracto directo con solvente de las glándulas de individuos machos de <i>S. aloeus</i> identificado como 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol y b) patrón comercial.....	61
Figura 3-13. Espectro de masas por ionización electrónica del a) compuesto 23 detectado en el extracto hexanoico de las glándulas de individuos machos de <i>S. aloeus</i> identificado como 4-metiloctanoato de etilo (Oryctalure) y b) patrón comercial.....	62
Figura 3-14. Espectro de masas por ionización electrónica del a) compuesto 1 detectado en el extracto hexanoico de las glándulas de individuos machos de <i>S. aloeus</i> y en los extractos hexanoicos por HSD de los VOCs liberados por individuos machos al espacio de cabeza e identificado como acetato de <i>sec</i> -butilo y b) patrón comercial.	64
Figura 4-1. Insectos adultos machos y hembras de <i>Strategus aloeus</i> en el bulbo cortado del estípite de la palma de aceite <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. Foto: V. Vidal-Medina.....	67

Figura 4-2. Antena de <i>Strategus aloeus</i> fijada entre dos electrodos mediante gel conductor de electricidad. Foto: V. Vidal-Medina.....	69
Figura 4-3. Olfatómetro de dos vías utilizado en la evaluación de la respuesta de <i>S. aloeus</i> frente a las fuentes de olor macho-específicos. Foto: V. Vidal-Medina. Ojalá puedas ajustar está imagen.....	71
Figura 4-4. Electroantenogramas obtenidos para dos individuos machos de <i>S. aloeus</i> en respuesta de pulsos de aire, 2-butanona, 3-pentanona y acetato de <i>sec</i> -butilo.....	73
Figura 4-5. Electroantenogramas obtenidos para una hembra de <i>S. aloeus</i> en respuesta de pulsos de aire, 2-butanona, 3-pentanona y acetato de <i>sec</i> -butilo.....	74
Figura 4-6. Porcentaje de machos y hembras de <i>S. aloeus</i> que responden a fuentes de olor provenientes de sus conoespecíficos machos. En cada bioensayo el asterisco (*) indica que la elección es significativa estadísticamente según se establece por la prueba binomial de chi-cuadrado con el 95% de confiabilidad.....	75

Lista de tablas

Tabla 1-1. Ejemplos de productos comerciales a base de feromonas empleados para el control etológico en el MIP. Adaptado de Borrero <i>et al.</i> (2018).	12
Tabla 2-1. Ejemplos de VOCs que actúan como kairomonas de escarabajos (Coleoptera: Scarabaeidae).....	24
Tabla 2-2. Búsqueda dirigida de los compuestos reportados por Rochat <i>et al.</i> en los extractos de VOCs liberados por trozos estípites de la palma de aceite <i>Elaeis guineensis</i>	31
Tabla 2-3. Cantidades relativas de los VOCs detectados en el estípite de palma de aceite <i>Elaeis guineensis</i> menores de 2 años.	33
Tabla 2-4. Características de adsorción de los materiales adsorbentes empleados para la caracterización de VOCs liberados por el estípite de <i>Elaeis guineensis</i> . ^{43,149}	35
Tabla 2-5. VOCs detectados en palmas de aceite <i>Elaeis guineensis</i> menor de 2 años sana (S) e infestada (I)......	37
Tabla 2-6. VOCs caracterizados en el estípite de <i>Elaeis guineensis</i> previamente reportados para palmas de géneros pertenecientes a la familia Arecaceae.....	39
Tabla 3-1. VOCs liberados por individuos de campo y de cría de <i>Strategus aloeus</i> extraídos mediante HS-MEFS, HSD y extracción directa con solvente.....	56
Tabla 4-1. Control y estímulos olfativos probados para los bioensayos de <i>S. aloeus</i>	72
Tabla 4-2. Pruebas chi-cuadrado de las respuestas olfatométricas.....	75

Glosario y abreviaturas

Aleloquímico: Semioquímico mediante el cual organismos de una especie afectan el crecimiento, salud, comportamiento o población biológica de organismos de una especie diferente (excluyendo sustancias utilizadas únicamente como alimentos por la segunda especie).¹

Cairomona: Mensaje químico transespecífico (aleloquímico) para el cual el beneficio adaptativo recae sobre el receptor y no sobre el emisor.²

Conespecífico: Organismo miembro de la misma especie.

CAR: Carboxeno.

EM: Espectro de Masas.

Estípite: Estructura de soporte en plantas arecáceas que puede comportarse como tallo o tronco cuando este se encuentra ausente de ramificaciones laterales.³

Feromona: Semioquímico mediante el cual organismos de una especie afectan el crecimiento, salud, comportamiento o población biológica de organismos de la misma especie.²

GC: Cromatografía de gases, *Gas Chromatography*, por sus siglas en inglés.

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés.

DVB: Divinilbenceno.

Headspace: Técnica analítica que permite determinar de manera indirecta el perfil volátil de muestras líquidas y sólidas mediante el análisis de la fase de vapor encontrada en el espacio de cabeza en equilibrio termodinámico con la muestra de estudio.⁴

HSD: *Headspace* o espacio de cabeza dinámico.

HS-MEFS: *Headspace* Micro-Extracción en Fase Sólida.

IE: Ionización Electrónica.

IR: Índice de Retención.

IR_{exp}: Índice de Retención experimental.

IR_{lit}: Índice de Retención de literatura.

Infestación: Invasión de un organismo vivo por agentes u organismos parásitos externos o internos que causa estragos y molestias en los campos cultivados.⁵

Meristemo: Tejido vegetal joven o embrionario y poco diferenciado -constituido por células pequeñas en continua división- responsable del crecimiento vegetal y dando origen a otros tejidos y órganos especializados.^{5,6}

MIP: Manejo Integrado de Plagas. Sistema de ayuda en la toma de decisiones para seleccionar y usar tácticas de control de plagas, solas o coordinadas con armonía, basadas en un análisis costo-beneficio, con el fin de manejar las poblaciones de plagas.⁷

ND: No detectado.

PDMS: Polidimetilsiloxano.

Plaga: Cualquier especie, raza, biotipo vegetal o animal, o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales.⁸

Semioquímico: Compuesto químico involucrado en la interacción química entre organismos individuales.⁹

Std: Estándar, *Standard*, por sus siglas en inglés.

VOCs: Compuestos orgánicos volátiles, *Volatile Organic Compounds*, por sus siglas en inglés. Compuestos de bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente.¹⁰

Introducción

La investigación en ecología química puede permitir que esta área del conocimiento, multidisciplinaria, avance manteniendo el equilibrio entre la ciencia básica -mediante la generación de información sobre los mecanismos de relación química entre los organismos inter e intraespecíficos- y las ciencias aplicadas, para fines de un manejo de los recursos bióticos más adecuado y menos dañino para el ambiente.¹¹

Desde 1960, la palma de aceite ha representado uno de los cultivos agroindustriales nacionales de mayor importancia en Colombia, ocupando territorios previamente utilizados en otro tipo de cultivos. Actualmente, Colombia es el cuarto productor de aceite de palma en el mundo y el primero en América. A nivel nacional este cultivo representa un sector significativo para la economía y para la sociedad colombiana.¹²⁻¹⁴ Uno de los principales retos que enfrenta el sector palmero mundial está asociado con la presencia de varias enfermedades y plagas. En Colombia, el cultivo de palma de aceite se ve ampliamente afectado por distintas enfermedades y por insectos plaga tales como el escarabajo rinoceronte *Strategus aloeus*.^{15,16} El cultivo extensivo de la palma de aceite implica, por razones económicas, tecnológicas y de sanidad, que se acuda a procedimientos de renovación de las plantaciones. Dichos procesos generan acumulación de desechos de estípites de palmas enfermas o en estado avanzado de edad, lo cual favorece la aparición de enfermedades y genera, además, la proliferación del insecto-plaga *Strategus aloeus*. El daño generado por el escarabajo rinoceronte, *S. aloeus*, es generalmente ocasionado en las noches por individuos machos. Inicialmente, estos individuos perforan verticalmente el suelo que circunda al bulbo del estípite de palmas jóvenes, no mayores de 2-4 años, y construyen una galería; enseguida, proceden a hacer una perforación lateral hasta penetrar el bulbo de la palma de aceite y alcanzar el meristemo.¹⁷ Las palmas afectadas son entonces susceptibles a volcamientos y pudriciones debidas a las heridas dejadas por el insecto o incluso morir como consecuencia de la destrucción total o parcial del sistema radical y del meristemo del bulbo.^{16,18,19}

Con el fin de controlar y manejar la plaga de *S. aloeus*, se ha implementado un manejo integrado que comprende estrategias de control biológico, químico y cultural.^{16,20} Sin embargo, la práctica de control más utilizada consiste en la aplicación de insecticidas en las galerías, en ocasiones diluidos con agua y jabón, con el fin de reducir su dosis.²¹ No obstante, el uso de insecticidas implica un amplio rango de efectos negativos. Por ejemplo, a nivel ambiental, estos compuestos químicos contribuyen a la contaminación del agua, el suelo y el aire; en la flora, aumentan la fitotoxicidad y pueden generar cambios fisiológicos; en la fauna, pueden resultar en problemas fisiológicos como infertilidad e incrementar la mortalidad de distintas especies silvestres, insectos benéficos, polinizadores, predadores y parásitos, e incluso pueden propiciar el desarrollo de resistencia de las plagas; finalmente, en seres humanos, pueden incrementar problemas de salud según su toxicidad.^{22,23}

Considerando lo anterior, se ha visto la necesidad de investigar en el desarrollo de estrategias alternativas en el MIP del *S. aloeus*. Entre las alternativas para tal fin, se encuentra el control etológico, el cual busca poner en juego la conducta instintiva de los insectos plaga y la comunicación tanto entre individuos conespecíficos, como con su entorno, para lograr una manipulación del comportamiento y regulación de poblaciones. El uso de semioquímicos que median la interacción entre organismos representa un mecanismo específico y, por ende, reviste gran importancia en el control etológico.^{24,25}

Con el fin de proporcionar una estrategia complementaria y alternativa a las usadas para el manejo y control de *Strategus aloeus*, el Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma) de Colombia, conjuntamente con la Unidad de Fitofarmacia & Mediadores Químicos (INRA), el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD), de Francia, y el Instituto de Investigación de Cocoa y Coco, de Nueva Guinea, en el año 2000, llevaron a cabo la identificación de los componentes de la feromona de agregación del *Strategus aloeus*. En esta, Rochat *et al.* (2000) reportaron tres compuestos orgánicos altamente volátiles como constituyentes de la feromona de agregación macho específica de *S. aloeus*,²⁶ pero desafortunadamente estos compuestos no produjeron en campo el fenómeno de agregación esperado.²⁷ Lo que condujo al planteamiento de la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen otros semioquímicos del insecto-plaga que no fueron identificados en la investigación anteriormente mencionada?

Para dar respuesta a la pregunta de investigación, se planteó como objetivo identificar las señales químicas producidas por el escarabajo-plaga *Strategus aloeus* y la palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. que sirvieran como base en una propuesta para el manejo integrado de este insecto. El cumplimiento de este objetivo implicó la identificación de los compuestos orgánicos volátiles que podrían mediar las interacciones entre la planta y el insecto, así como la evaluación de la respuesta de los insectos frente a los compuestos identificados bajo condiciones de laboratorio.

Para facilidad de lectura y comprensión, este documento se presenta de la siguiente manera. Para comenzar, en el capítulo 1 se dan a conocer los conceptos generales involucrados en la ecología química del *S. aloeus* y el cultivo de la palma de aceite *E. guineensis*. En los dos capítulos siguientes, se presenta la identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, *Volatile Organic Compounds*, por sus siglas en inglés) de la palma de aceite y del *S. aloeus*, respectivamente. En el capítulo 4, se describe la evaluación de las respuestas electrofisiológicas y de comportamiento del *S. aloeus* frente a algunos de los compuestos identificados en los capítulos previos. Finalmente, se proponen unas conclusiones generales y las perspectivas que surgen de los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de la investigación.

Esta tesis de maestría se encuentra enmarcada dentro de un proyecto interinstitucional liderado por la Universidad Antonio Nariño y fue realizada con el apoyo financiero de las siguientes entidades: el Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma), el Fondo de Fomento Palmero de Fedepalma, la Vicerrectoría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Universidad Antonio Nariño, y la Dirección de Investigación de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia.

1. Estado del arte

En este primer capítulo se presenta una revisión bibliográfica de los conceptos básicos necesarios para el desarrollo de la investigación.

Para comenzar, se explican, definen y ejemplifican los tipos de interacciones ecológicas inter e intraespecíficas mediadas por semioquímicos. De otra parte, se describe cómo se realiza el estudio químico de estos compuestos orgánicos volátiles y su uso potencial en el manejo integrado de plagas.

Asimismo, teniendo en cuenta que el sistema objeto de investigación corresponde a la palma de aceite *Elaeis guineensis* y al escarabajo rinoceronte *Strategus aloeus*, se presentan algunas características fisiológicas y agronómicas del cultivo, al igual que características biológicas y ecológicas del insecto-plaga.

1.1 Los semioquímicos - Generalidades

Los insectos viven en un mundo de olores.²⁸ Su percepción de las señales químicas emitidas por el entorno biótico y abiótico es principalmente olfativa. Gracias a ello pueden interactuar con el entorno y optimizar su supervivencia encontrando hospederos, fuentes de alimento y apareamiento, o evadiendo predadores.⁹

Las señales químicas responsables de las interacciones ecológicas entre organismos de la misma especie o de especies distintas, se denominan semioquímicos o infoquímicos.^{9,29}

Los semioquímicos liberados al medio ambiente por un emisor pueden encontrar el epitelio olfativo del receptor, enlazarse con proteínas específicas de unión a odorantes (OBPs, *Odorant Binding Proteins*, por sus siglas en inglés), desencadenar una señal eléctrica, la cual es transducida al sistema nervioso central en donde se activa la percepción del estímulo inicial y, finalmente, generar un cambio en el comportamiento o en la fisiología del receptor.^{28,30,31}

La terminología actual de semioquímicos utiliza dos criterios principales:^{29,32}

- i) Si el organismo que es el origen del compuesto (emisor) y el receptor son conespecíficos o no; y,
- ii) Si es el emisor, el receptor o ambos quienes se benefician de la interacción que está mediada por el compuesto.

Existen diferentes clases de semioquímicos basados en los anteriores criterios (**Figura 1-1**). De acuerdo con el primer criterio, los semioquímicos se denominan feromonas cuando la sustancia química liberada por un individuo origina en otro de la misma especie un cambio en su fisiología, biología o comportamiento.^{24,33} Cuando la sustancia media la comunicación entre individuos de distinta especie, se denominan aleloquímicos.¹ Según el segundo criterio, el grupo de aleloquímicos se divide a su vez en alomonas, cairomonas y sinomonas, dependiendo

de si el beneficiario de la interacción es el emisor, el receptor o ambos.^{1,2,29,34} Por su parte, las feromonas también se dividen según su función y el efecto generado: feromonas de agregación, de alarma, disuasorias de la oviposición, de reconocimiento del hospedero, de rastro, sexuales, de reclutamiento y jerarquización.³⁵

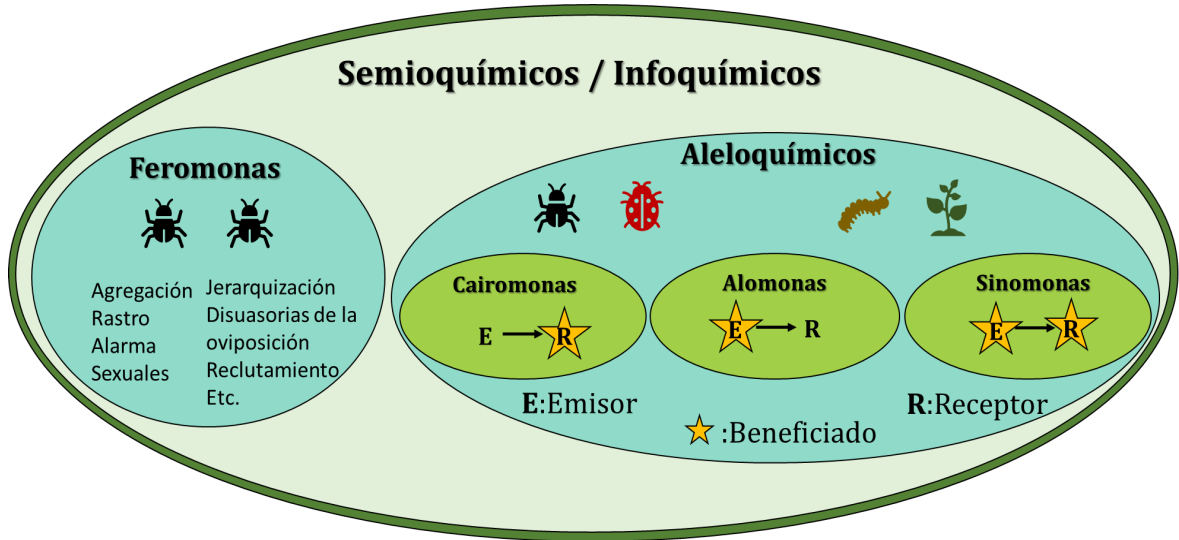


Figura 1-1. Estructura de la terminología actual de los tipos de semioquímicos. Adaptado de Dicke *et al.* (1988). En azul las clases de semioquímicos diferenciadas por el criterio de su origen y en verde por el beneficiario de la comunicación.

Es común que un mismo agente químico pueda tener diferentes funciones en dos o más tipos de interacciones entre distintos organismos.^{1,2,29,36} Por ejemplo, una sustancia química puede actuar entre dos organismos conespecíficos como feromona y entre uno de estos organismos y un tercero de otra especie como aleloquímico.³⁷⁻³⁹

En ecología química, el estudio de semioquímicos y su participación en las interacciones intraespecíficas -actuando como feromonas- o en interacciones interespecíficas -actuando como aleloquímicos- constituye uno de los campos de investigación de mayor desarrollo e interés tanto en la conservación ambiental como en el control de plagas.⁴⁰

Para el 2021, a través de la base de datos Scopus, se evidenció que del total de publicaciones científicas relacionadas con semioquímicos y con ecología química, el 47% está relacionado con la agricultura, campo para el cual se desarrolla la presente investigación.⁴¹

1.2 Etapas del estudio de semioquímicos

El estudio de semioquímicos se puede delimitar a través de distintos pasos experimentales (**Figura 1-2**). Después de obtener evidencia de una interacción ecológica mediada por semioquímicos, las siguientes etapas principales para el estudio de estos VOCs -resaltadas en el diagrama- incluyen su muestreo, identificación y validación como mediadores de la comunicación entre organismos.

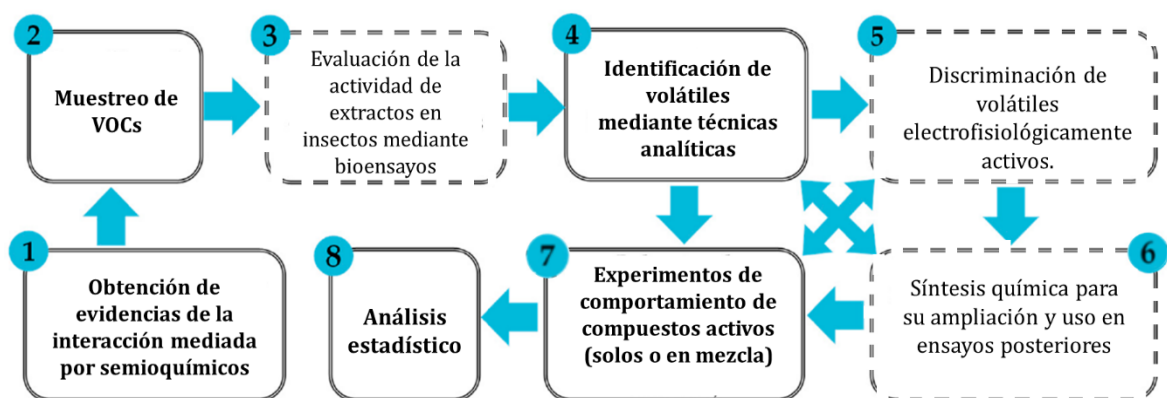


Figura 1-2. Diagrama de flujo del enfoque convencional de ecología química. Adaptado de Barbosa *et al.* (2019).

Cabe recordar que las metodologías y condiciones para cada una de estas etapas se plantean de acuerdo con la pregunta de investigación que se pretende responder. Así, en esta sección se presenta una breve revisión de los métodos empleados en la presente investigación para la extracción, separación, análisis e identificación de los VOCs procedentes de organismos vegetales y animales.

1.2.1 Muestreo de VOCs

La toma de muestras de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que actúan como semioquímicos puede realizarse mediante dos tipos de técnicas analíticas de muestreo dependiendo de las características químicas y físicas (composición, volatilidad, estabilidad, polaridad, etc.) y de los sistemas a evaluar (tipo de semioquímico, especie y cantidad de muestra): la captura o atrapamiento de aire o espacio de cabeza, y la extracción (que por lo general emplea solventes).⁴²

Debido a la dificultad que representa la alta volatilidad de los semioquímicos y la baja concentración en la cual son liberados, se emplean técnicas para su recolección *in situ* dentro de las cuales está el *headspace* o espacio de cabeza. Estas corresponden a extracciones no destructivas que pueden ser estáticas o dinámicas y permiten evidenciar un perfil volátil más real de los medios ambientes aéreos circundantes de los sistemas ecológicos de estudio durante un período de tiempo definido.^{43,44}

Cabe aclarar que el espacio de cabeza o *headspace* corresponde al vapor sobre una fase condensada que rodea un organismo y contiene los volátiles liberados por este.⁴⁵ Así, el principio básico de la captura de VOCs por *headspace* consiste en confinar el organismo de estudio, o parte de este, dentro de un recipiente o bolsa especial y capturar los VOCs liberados sobre materiales sorbentes (por ejemplo, polímeros porosos, fibras poliméricas activas o materiales recubiertos) de manera pasiva o dinámica. Una vez recolectados, dichos compuestos son desorbidos mediante disolventes orgánicos o protocolos térmicos. Estas técnicas de muestreo de semioquímicos permiten la obtención de extractos con bajos niveles de contaminantes, lo cual representa una gran ventaja.

A continuación se describen tres técnicas empleadas para el muestreo de los VOCs: *Headspace*-Micro Extracción en Fase Sólida (HS-MEFS), *Headspace* Dinámico (HSD) y extracción asistida con solvente (SAE).

▪ **Headspace-Micro Extracción en Fase Sólida (HS-MEFS)**

La extracción por HS-MEFS corresponde a una de las variantes utilizadas para la captura de VOCs en el espacio de cabeza de manera pasiva (**Figura 1-3**). Para esta técnica suelen utilizarse fibras inertes recubiertas de distintos tipos poliméricos de adsorbentes.

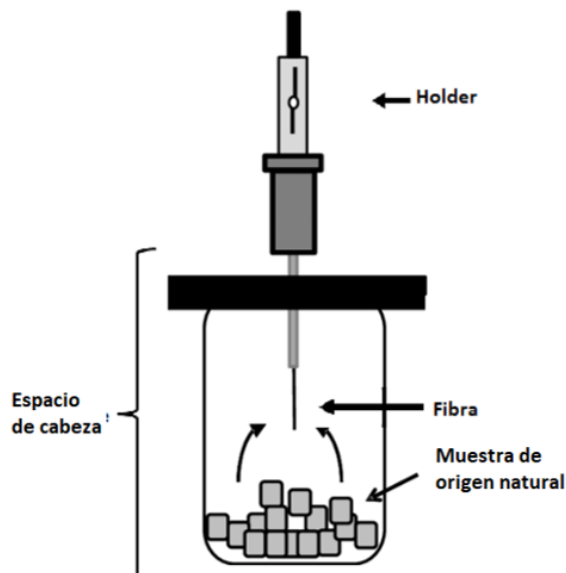


Figura 1-3. Montaje empleado para la recolección de VOCs por *Headspace-* Micro Extracción en Fase Sólida (HS-MEFS).

Al ser una técnica de muestreo estática, se requiere un equilibrio entre el espacio de cabeza y el material adsorbente. Así, los metabolitos volátiles presentes en la fase de vapor se acumulan de manera pasiva en el material, por adsorción, de acuerdo con las afinidades entre el material y el analito.

La fibra polimérica se encuentra contenida dentro de la aguja de una jeringa modificada y los volátiles son capturados al exponer la fibra en el espacio de cabeza y esperar que se alcance el equilibrio mencionado. Posteriormente, la fibra es retraída y analizada directamente en el cromatógrafo de gases por desorción térmica de los metabolitos inicialmente adsorbidos. En consecuencia, se trata de una técnica de extracción libre de solvente, lo cual elimina las interferencias inherentes de los solventes que pueden intervenir en el análisis de semioquímicos (impurezas de los solventes, pérdida de muestra, y coelución y enmascaramiento entre solvente y analitos).

La HS-MEFS constituye un método rápido y útil para la captura de VOCs que se encuentran a muy bajas concentraciones (del orden de los ppb). Ha sido empleada para el estudio de diferentes tipos de muestras: alimentos en diferentes condiciones, aire, suelo, aguas, materiales, organismos y sistemas biológicos; empleando plantas completas, flores, raíces, tejidos e insectos vivos o sus secreciones.^{25,43,45,46}

Aunque existen reportes de análisis cuantitativos empleando HS-MEFS, debido a la dificultad de reproducibilidad que se ha evidenciado para esta técnica en sistemas biológicos, la HS-MEFS se realiza principalmente con fines cualitativos.⁴⁷

A pesar de las ventajas propias de esta técnica de recolección de VOCs libre de solventes, el principal inconveniente es que en el *headspace* estático se puede acumular humedad y, al tratarse de un sistema cerrado, ver aumentada la temperatura. Estas condiciones pueden interferir con los procesos fisiológicos normales y afectar la emisión de volátiles, y la adsorción o saturación de la fibra.⁴⁸

- **Headspace dinámico (HSD)**

La extracción mediante *headspace* dinámico (HSD, **Figura 1-4**) es la técnica más empleada para el análisis de volátiles de plantas o parte de estas, sanas o atacadas por insectos.⁴⁹⁻⁵²

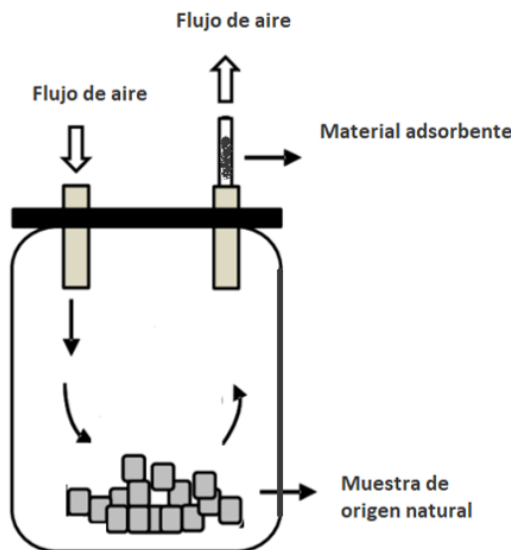


Figura 1-4. Montaje empleado para la recolección de VOCs por *headspace* dinámico (HSD).

En HSD, el flujo de aire continuo que pasa a través del recipiente -en el cual se encuentra contenida la muestra de estudio- ayuda a extraer y concentrar los VOCs en la fase adsorbente empacada ya que los metabolitos volátiles son arrastrados y dirigidos hacia ella, y el espacio de cabeza de la muestra aumenta al tratarse de un sistema dinámico. Este flujo de aire transportador de volátiles puede conseguirse utilizando una bomba de vacío y/o un compresor, que va a empujar o succionar el aire del sistema.⁴³ Es importante asegurarse de que el aire que se inserta en las cámaras de *headspace* esté limpio para evitar interferencias de impurezas en los posteriores pasos analíticos de separación, análisis e identificación de los extractos.

Por lo general, los volátiles capturados en el material adsorbente se eluyen posteriormente utilizando disolventes orgánicos de baja polaridad. Esta desorción de VOCs con solventes, tiene como principal ventaja la posibilidad de almacenar los VOCs disueltos para análisis posteriores, empleo en bioensayos, y mezcla para aumentar las concentraciones. Sin embargo, presenta los inconvenientes que conlleva el uso de solventes, tal como se mencionó previamente.

- **Extracción asistida con solventes (SAE)**

La extracción asistida con solventes (SAE, *Solvent-Assisted Extraction*, por sus siglas en inglés) constituye una forma práctica y rápida de obtener los semioquímicos volátiles de organismos

que poseen glándulas o reservorios especializados para su almacenamiento y/o producción. Las feromonas de insectos, por lo general, han sido aisladas mediante extracciones asistidas con solventes empleando bien sea insectos completos o secciones de estos. Entre mayor conocimiento haya sobre la morfología del insecto y sobre el tipo de semioquímico esperado, se puede llevar a cabo una extracción con mayor selectividad y menor contenido de impurezas.

El principio básico de los métodos de extracción con solvente consiste en poner en contacto el material biológico de interés con un solvente orgánico que extraerá los compuestos orgánicos contenidos en la muestra. El método SAE empleado con mayor frecuencia es la extracción sólido-líquido, o maceración, en el cual el disolvente penetra la matriz del material biológico y disuelve los metabolitos de acuerdo con las características de solubilidad de los compuestos y los solventes implicados.⁵³⁻⁵⁶ La efectividad de la extracción depende en gran parte de la selección del solvente orgánico. Para los VOCs, los solventes que suelen emplearse corresponden a solventes orgánicos de baja polaridad como el hexano y el pentano o el éter etílico y el diclorometano de mayor polaridad. El empleo de estos solventes orgánicos de alta volatilidad permite la concentración de los extractos a bajas temperaturas.⁵⁷

La SAE presenta varias desventajas tales como la degradación de los metabolitos y la coextracción de impurezas no volátiles que hacen que los extractos sean más complejos. Adicionalmente, aunque las feromonas producidas por insectos se han aislado con mayor frecuencia mediante la extracción de insectos enteros o de sus glándulas, se ha reportado que, en ciertos insectos, por un lado, los semioquímicos son producidos y liberados inmediatamente y pueden no tener glándulas que los contengan o, por otro lado, dichas glándulas contienen precursores o inhibidores de los semioquímicos de interés. De ahí que lo anterior pueda dificultar el aislamiento y la purificación de los compuestos químicos activos.⁵⁸

1.2.2 Identificación de VOCs

Una vez realizado el muestreo de volátiles, la siguiente etapa principal en el estudio de semioquímicos es su identificación mediante técnicas analíticas. Para lograr la identificación de los VOCs contenidos en los extractos obtenidos es necesario llevar a cabo los siguientes procesos: separación, análisis y detección.

Por tratarse de extractos complejos con compuestos orgánicos volátiles de distintas características, la técnica analítica de separación y análisis empleada es la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography, por sus siglas en inglés*) equipada con fases estacionarias de distinta polaridad.⁴⁴ La GC es la técnica más utilizada debido a su gran sensibilidad, robustez, reproducibilidad y versatilidad.⁴⁵ En esta técnica, la separación de los metabolitos volátiles se da por la afinidad específica que existe entre el analito y el material interno de la columna y este proceso es optimizado mediante el control de la temperatura del sistema de análisis. Por lo general, al ser sistemas para los cuales el rango de VOCs puede ser variado, para tener un análisis más completo y proponer una identificación más veraz, se recomienda realizar el análisis de los extractos utilizando columnas apolares o de baja polaridad (DB-1, DB-5, etc.) y de alta polaridad (Carbowax, DB-Wax, etc.).

Después de que los constituyentes volátiles del extracto son separados por GC, estos son detectados y analizados. Para su detección la cromatografía de gases puede ser acoplada a distintos tipos de detectores. La selección del detector depende de la pregunta de investigación que se pretende responder, del tipo de muestras de estudio, de las propiedades físicas y químicas de los analitos de interés, y de la disponibilidad de equipos con la que se cuente. Los detectores de mayor utilidad en este tipo de estudios son el detector de espectrometría de

masas (MSD, *Mass Spectrometry Detector*, por sus siglas en inglés), para análisis cualitativo, ya que proporciona información estructural,⁵⁹ el detector por ionización en llama (FID, *Flame Ionization Detector*, por sus siglas en inglés), para análisis cuantitativo,²⁵ y el detector de electroantenografía (EAD, *ElectroAntenography Detector*, por sus siglas en inglés), para la detección de compuestos biológicamente activos.^{57,60}

En GC-MS existen dos estrategias fundamentales para la identificación de compuestos por espectrometría de masas. La primera corresponde al uso de patrones. Sin embargo, no siempre todos los patrones son accesibles o se encuentran disponibles. Otra etapa general para la identificación en GC-MS es la combinación de varios parámetros experimentales, a saber, los índices de retención (IR), en conjunto con espectros de masas experimentales y su comparación con aquellos de las bases de datos. Es altamente recomendable que los índices de retención sean obtenidos en columnas de polaridad ortogonal (polar y apolar) para alcanzar la identificación estructural de componentes en la mezcla. Con las estrategias anteriores, la identificación puede ser tentativa o preliminar, y confirmatoria. La confirmación (identificación inequívoca) requiere, en muchos casos, el uso de un estándar comercial o sintetizado.⁶¹

1.2.3 Evaluación de la respuesta de los insectos frente a los VOCs

En las investigaciones de ecología química, una de las etapas críticas es la validación de los semioquímicos identificados químicamente a partir de los compuestos orgánicos volátiles extraídos de los insectos de las especies de estudio. Así, al demostrar la actividad biológica de dichos VOCs mediante la evaluación de la respuesta de comportamiento de los insectos frente a los compuestos promisorios, se puede validar la identificación de estos como semioquímicos de la especie.

En la mayoría de los insectos, la percepción a través del olfato o quimiorrecepción, es uno de principales procesos de comunicación con su entorno, debido a que está directamente relacionada con patrones de comportamiento vitales como la alimentación, la cópula y la oviposición.⁶²⁻⁶⁴ De hecho, los insectos están equipados con distintos tipos de receptores sensoriales en las antenas, tales como las neuronas receptoras olfativas (NROs), que les permiten recibir y percibir los estímulos de su entorno. Se ha reportado que áfidos, lepidópteros y coleópteros fitófagos poseen un equipamiento completo de receptores olfativos mediante los cuales detectan los volátiles provenientes de las plantas y así son atraídos hacia ellas.⁶⁵

Existen distintos tipos y diseños de bioensayos que, poniendo en juego la sensible y selectiva percepción olfativa de los insectos, permiten estudiar, evaluar y medir la actividad biológica de los potenciales semioquímicos. Los principales tipos de bioensayos reportados se basan en respuestas conductuales de los organismos completos o en respuestas fisiológicas de órganos o de estructuras aisladas.⁴⁵

En el caso de la evaluación de las respuestas fisiológicas de estructuras olfativas frente a los diferentes estímulos a evaluar, la principal técnica empleada es la electroantenografía (EAG) descrita por primera vez en 1957. Para esta técnica se tiene en cuenta la habilidad de las antenas para producir potenciales eléctricos al ser estimuladas con VOCs.⁶⁶ A través de dos electrodos conectados a un órgano olfatorio recién extirpado, cabeza o incluso al individuo completo, se detecta y mide una diferencia de potencial eléctrico, la cual produce una corriente y se genera un electroantenograma.⁶⁷ Esta técnica ha sido empleada desde 1980 para detectar

compuestos provenientes de plantas hacia polinizadores, plagas y parasitoides, identificar constituyentes de feromonas en extractos complejos, medir y comparar las respuestas olfativas de insectos frente a distintos extractos y compuestos puros, y para determinar y caracterizar curvas de dosis-respuesta.⁴⁵

Cuando la EAG es instrumentalizada como técnica de detección y acoplada como segundo detector a técnicas de separación de compuestos orgánicos volátiles como la cromatografía de gases (GC-FID/EAD y GC-MS/EAD), se puede alcanzar un reconocimiento en tiempo real de los picos cromatográficos que generan una respuesta olfativa en extractos complejos.⁶⁸

Por todo lo anterior, la EAG es considerada como una herramienta fundamental y de gran utilidad para evidenciar que un VOC es detectado por el insecto. Sin embargo, que un VOC sea detectado por un insecto y genere en él una respuesta olfativa, no implica que este tenga un efecto comportamental en los individuos. Así, la EAG no proporciona información concreta del tipo de efecto comportamental que el compuesto evaluado puede llegar a producir en un insecto vivo.

Existen otro tipo de bioensayos en laboratorio que permiten evaluar las respuestas conductuales de los organismos vivos, y medir -mediante el uso de olfatómetros y túneles de viento- la atracción de los insectos hacia las fuentes de olor y la capacidad de percepción de los animales a diferentes VOCs dispersos en el aire.⁶⁹ Los bioensayos comportamentales son fundamentales para la identificación de compuestos biológicamente activos, y permiten determinar el tipo de respuesta que genera un VOC puro, disuelto o en mezcla, frente a las especies de estudio.

Se ha reportado una gran adaptabilidad y diversidad de diseños para los experimentos de evaluación comportamental con variaciones en los métodos de liberación de los VOCs, formas de minimización de la interferencia de otros factores que puedan alterar y sugestionar la respuesta de los insectos y cantidad de fuentes de olor. Las configuraciones más comunes para este tipo de bioensayos son los túneles de viento y los olfatómetros de una, dos o más vías.⁴⁵

Los olfatómetros de dos vías, también conocidos como olfatómetros en "Y" o en "T", son las configuraciones más populares utilizadas en ecología química para evaluar los efectos tanto atractivos como repulsivos. Consisten en dos reservorios independientes que están conectados a un punto convergente. Uno de los reservorios contiene el VOC a evaluar puro, en mezcla o en solución, y el otro el control. Antes del punto convergente se coloca el insecto para que elija entre las dos fuentes.

A pesar de que la evaluación y validación de la bioactividad de los VOCs liberados por hospederos y/o conespecíficos puede ser llevada a cabo mediante distintos tipos y diseños de bioensayos en laboratorio, es imperativo llevar a cabo pruebas de atracción en campo que presenten un panorama real del hábitat de las especies.

1.3 Los semioquímicos en el control etológico del Manejo Integrado de Plagas

Debido al uso excesivo e indiscriminado de pesticidas químicos una vez terminada la Segunda Guerra Mundial, sus efectos nocivos, como por ejemplo el aumento de insectos resistentes a pesticidas y daños al medio ambiente, se hizo cada vez más visible la necesidad de un manejo de plagas diferente, combinando varias estrategias.⁷⁰ Actualmente el Manejo Integrado de Plagas (MIP) se define como "[...] un proceso basado en decisiones, que involucra el uso

coordinado de múltiples tácticas para optimizar de buena manera ecológica y económica el control de todas las clases de plagas (insectos, patógenos, malezas, vertebrados).”⁷¹ (traducido de Prokopy RJ, 2003)

Entre las distintas tácticas empleadas en el MIP, se encuentran, entre otras, el control químico, el control etológico, el control biológico, el control cultural, el control fitogenético y el control físico-mecánico, que pueden ser agrupados en tres enfoques fundamentales para el MIP (Figura 1-5).

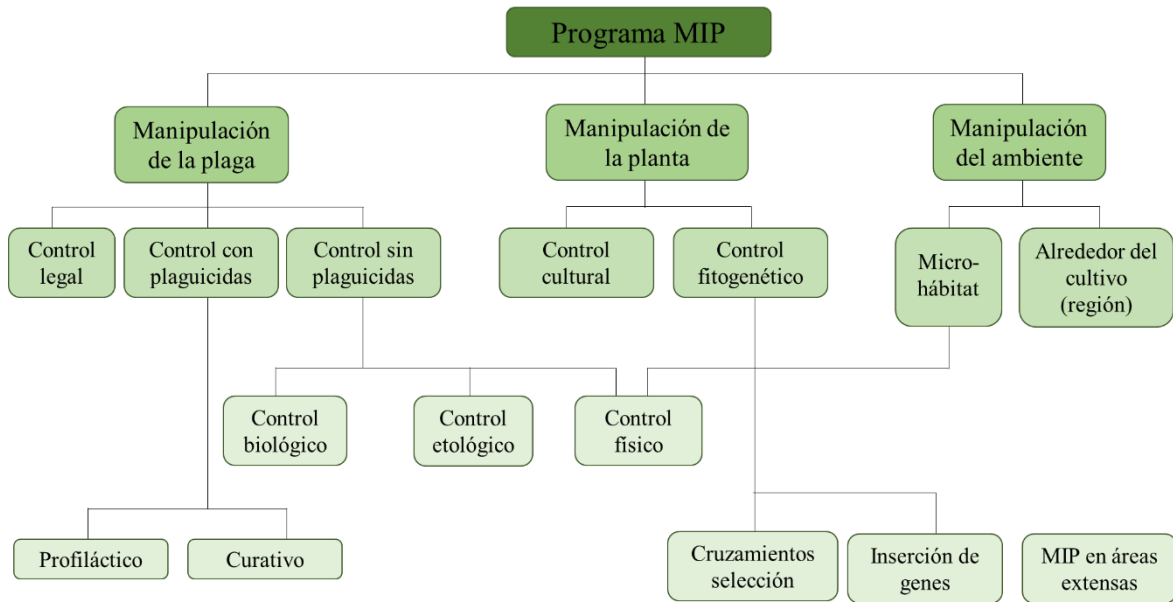


Figura 1-5. Tácticas de control consideradas como componentes de un programa de Manejo Integrado de Plagas (MIP). Adaptado de Barrera *et al.* (2008).

En la búsqueda de un MIP eficiente y eficaz, los investigadores tienen a su disposición valiosos conocimientos y hallazgos de la ciencia. La etología, por ejemplo, es una rama de la ciencia que consiste en el estudio del comportamiento de los animales. Y el control etológico corresponde a la utilización de métodos que aprovechan los despliegues comportamentales de los animales. Por su parte, como se señaló anteriormente, los semioquímicos son sustancias que pueden ser modificadoras de la fisiología, morfología y comportamiento de los organismos. En consecuencia, los semioquímicos son la principal herramienta en el control etológico debido a que esta táctica busca poner en juego la conducta instintiva de los insectos-plaga y la comunicación tanto entre individuos conespecíficos, como con su entorno. Lo anterior con el fin de lograr una manipulación del comportamiento, una regulación y un monitoreo de poblaciones.

Desde el punto de vista práctico, las aplicaciones del control etológico implican bien sea el uso de estímulos visuales como fuentes de luz, o estímulos químicos mediante el uso de semioquímicos en trampas. De hecho, la ecología química ha desempeñado un papel primordial en el desarrollo de estrategias sustentables para el manejo de plagas por medio de la identificación y síntesis de sus feromonas.⁷²⁻⁷⁴ Estas, solas o en conjunto con sustancias atrayentes, han sido ampliamente utilizadas en el MIP para el monitoreo de las poblaciones o como control directo de estas mediante el trameo masivo, interrupción de la cópula y atrayentes o repelentes con enfoques de *Attract-and-kill* y *Push, Pull, and Push-Pull*, ya que presentan la ventaja de ser especie-específicas.⁷³⁻⁷⁵ Por un lado, el monitoreo es de gran

utilidad para facilitar la toma de decisiones para planificar, de la forma más eficiente posible, de acuerdo con los umbrales de acción de la plaga previamente determinados, el uso de otras técnicas de control como insecticidas o controladores biológicos. Por otro lado, la interrupción de la cópula, uno de los métodos más usados, busca que el ambiente contenga grandes cantidades de las feromonas empleadas, de tal manera que los individuos de un sexo no logren encontrar sus potenciales parejas, y así nunca se dé la cópula. Finalmente, en el uso de feromonas para la captura masiva o como atrayentes, los sistemas de atracción son diseñados para retener una gran cantidad de individuos y se emplean como medidas de control tanto preventivas como correctivas.

Entre los semioquímicos que han tenido mayor éxito en el manejo de plagas se encuentran las feromonas sexuales de lepidópteros y las feromonas de agregación de coleópteros, principalmente curculiónidos. Entre las principales compañías productoras de productos comerciales, a base de feromonas, que se encuentran disponibles en el mercado internacional para coleópteros, ChemTica y Bio Controle, corresponden a compañías Latinoamericanas de Costa Rica y Brasil con alrededor de 200 y 18 productos comerciales, respectivamente (**Tabla 1-1**).

Tabla 1-1. Ejemplos de productos comerciales a base de feromonas empleados para el control etológico en el MIP. Adaptado de Borrero *et al.* (2018).

Espece	Orden	Función	Producto	Compañía productora
<i>Ips typographus</i>	Coleoptera	Captura masiva	P274-Lure	ChemTica
<i>Rhynchophorus palmarum</i>	Coleoptera	Captura masiva	P058-Lure (Rhyncolure)	ChemTica
<i>Hypothenemus hampei</i>	Coleoptera	Monitoreo/ Captura masiva	Bio Broca	Bio Controle
<i>Cosmopolites sordidus</i>	Coleoptera	Monitoreo	Cosmolure	Bio Controle
<i>Diabrotica virgifera</i>	Coleoptera	Captura masiva	DIVI	Pherobank

Adicionalmente, se ha reportado que las caïromonas, al ser combinadas con feromonas, incrementan la efectividad mediante efectos de sinergia, y han sido de gran utilidad en la implementación de trampas y atrayentes en el manejo integrado de plagas.^{63,73,76-78} Lo anterior probablemente se debe a que, por lo general, en los ambientes naturales, los insectos emiten feromonas cuando se posan sobre frutas, flores u hojas de plantas hospedadoras, los cuales a su vez liberan volátiles, lo que da como resultado una mezcla de olor mucho más diversa que es la que realmente resulta atrayente para los conespecíficos.⁶³

Por lo tanto, los semioquímicos representan una promisoría alternativa de control mediante la intervención en el comportamiento de los insectos-plaga, proporcionando una solución de baja o nula toxicidad para vertebrados e insectos benéficos. Además, emplea, por lo general, muy bajas concentraciones de compuestos de alta especificidad.⁷⁹ Sin embargo, el uso de semioquímicos todavía enfrenta muchos obstáculos. En el caso de América Latina, uno de los más importantes es el alto costo de la tecnología y los costos de producción de los semioquímicos en comparación con el precio de los plaguicidas químicos genéricos.^{25,72} Otra limitante para la correcta implementación de semioquímicos en el manejo de plagas es la falta de interés o adherencia por parte de los agricultores. Lo anterior, debido a la competencia de precios con los insecticidas químicos de bajo costo, a la falta de incentivos otorgados por los gobiernos para la implementación de nuevas tecnologías y al tiempo necesario para que los efectos sobre el control de las plagas sean visibles.

1.4 La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)

1.4.1 Generalidades del cultivo

El descubrimiento de la palma africana, palma de aceite o corozo, *Elaeis guineensis* Jacq., (Figura 1-6) data del siglo XV en las costas del Golfo de Guinea en África occidental. De ahí el origen de su nombre común. Fue introducida en Colombia en 1932. Esta especie es considerada como la oleaginosa más productiva del planeta. De hecho, una hectárea sembrada produce entre 6 y 10 veces más aceite que las demás especies vegetales como la soya, el girasol y el lino, ya que el 50% del contenido del fruto corresponde a aceite de pulpa y de palmiste.



Figura 1-6. Ejemplar de *Elaeis guineensis* del campo experimental de la zona oriental de Cenipalma "Palmar de las Corocoras". Fotografía: Dr. E. Daza.

En el territorio nacional, el cultivo de la palma de aceite se encuentra en 161 municipios de 21 departamentos. Está repartido en 4 zonas (Figura 1-7), con los siguientes porcentajes del área total sembrada: zona norte (24%), zona central (31%), zona suroccidental (4%) y zona oriental (41%).¹⁴

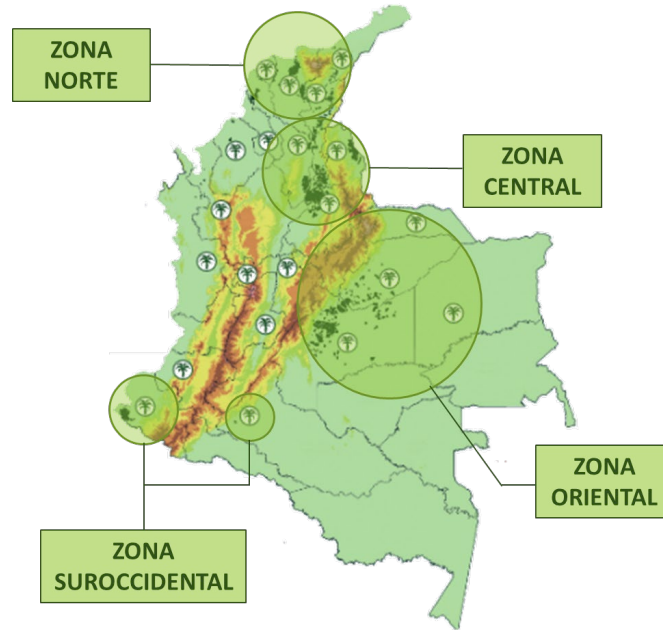


Figura 1-7. Mapa de los núcleos palmeros en Colombia. Adaptado de Fedepalma (2013).

A partir de la década de 1940, en Colombia, la palma de aceite se ha cultivado también en pastizales que antes eran de uso ganadero.⁸⁰ Desde 1960, la palma de aceite ha representado uno de los cultivos agroindustriales nacionales de mayor importancia, ocupando territorios previamente utilizados en otro tipo de cultivos, entre los cuales se encuentran cultivos ilícitos.^{12,13} En 1962 el área sembrada de palma de aceite era de 5 mil hectáreas. Veinte años después, aumentó a 103 mil hectáreas. En la actualidad, Colombia cuenta con 559.583 hectáreas sembradas y un valor estimado de la producción de 3,1 billones de pesos colombianos, posicionándose como el cuarto país productor de aceite de palma en el mundo después de Indonesia, Malasia y Tailandia, y el primero en América. Siendo así, este cultivo representa un sector significativo para la economía colombiana y genera un requerimiento de mano de obra tanto en la fase de campo, como en la fase productiva y de industrialización, lo que se ve reflejado en 185.000 puestos de trabajo entre directos e indirectos.^{14,81,82}

La importancia de los cultivos de palma a nivel mundial y principalmente en Colombia radica en que este cultivo genera múltiples posibilidades de uso. Lo anterior debido a que la gran mayoría de la estructura de la palma de aceite es aprovechable. De hecho, tanto el estípote como las hojas son empleados como materia prima en la elaboración de muebles y pulpa de papel. Además, como se mencionó previamente, el fruto es la parte de la palma de aceite de la cual se obtienen los aceites de palma y palmiste. Estos se emplean en la elaboración y comercialización de productos alimentarios como la margarina, el aceite de mesa y de cocina, y alimentos concentrados para animales; y, productos oleoquímicos como pinturas, detergentes, jabones y cosméticos. También se usa para biocombustibles, como el biodiésel, que puede utilizarse en motores de combustión de diésel, calefactores y generadores de electricidad. Aunado a lo anterior, del proceso de extracción del aceite de palma se obtienen diferentes productos derivados de la biomasa y subproductos de la oleoquímica, que se usan como fertilizantes.^{14,83,84}

Uno de los principales retos que enfrenta el sector palmero mundial está asociado con la presencia de varias enfermedades y plagas. En Colombia, el cultivo de palma de aceite se ve ampliamente afectado por enfermedades como la pudrición del cogollo (PC), el anillo rojo (AR)

y la marchitez letal (ML), y por insectos-plaga como *Rhynchophorus palmarum*, *Sagilassa valida* y *Strategus aloeus*.^{15,16}

1.4.2 Taxonomía y Morfología de la palma de aceite

La principal especie de palma de aceite de importancia agroindustrial es la palma africana, *Elaeis guineensis* Jacq. Se trata de una especie de planta tropical, que crece principalmente en climas cálidos y es considerada como la oleaginosa más productiva del planeta. Esta especie pertenece a la tribu Cocoseae, subfamilia Arecoideae, familia Arecaceae (antes conocida como Palmaceae) y del orden Arecales.^{85,86}

Enseguida se presenta la morfología general de la palma de aceite *E. guineensis* y sus distintas partes principales(Figura 1-8).⁸⁷



Figura 1-8. Morfología general de la palma de aceite *Elaeis guineensis*. Tomado de Bauer *et al.* (2020). a) palma completa, b) bulbo y raíces, c) inflorescencia, d) hojas, e) fruto, f) estípite.

Esta especie puede crecer hasta 30 metros de altura y sus frutos, producidos en forma de racimos y denominados inflorescencias pueden llegar a pesar hasta 40 kg. En las palmas, el tronco que no posee ramas, sino del cual crecen directamente las hojas y los racimos, es llamado estípite. Este órgano vegetal, tiene dos funciones principales. En primer lugar, proporciona sostén para las hojas, racimos e inflorescencias. Además, es un depósito estructural -para el sistema vascular que permite el transporte de agua y nutrientes- y de almacenamiento de carbohidratos y minerales.⁸⁸

El desarrollo del estípite incluye dos fases principales. La primera va desde que la palma joven -aproximadamente a los 10 meses- es trasplantada del vivero al cultivo hasta 3 años después del trasplante. La segunda, se cuenta a partir de los 4 años. En la primera fase, el estípite se engrosa para formar la base del tronco y no crece significativamente en altura; en la segunda, el crecimiento principalmente se da hacia lo alto rápidamente (0,3 a 0,6 m/año).⁸⁸

1.5 El escarabajo-plaga *Strategus aloeus*

1.5.1 Generalidades

El *Strategus aloeus* (L.), comúnmente llamado cucarrón torito o escarabajo rinoceronte, es un insecto que pertenece al orden Coleoptera, familia Scarabaeidae, subfamilia Dynastinae y tribu Oryctini, descubierto en 1758 por Linneo (**Figura 1-9**).⁸⁹



Figura 1-9. Taxonomía y fotografía de *Strategus aloeus* (macho). Fotografía: V. Vidal-Medina.

Los escarabajos adultos de la tribu Oryctini se caracterizan por tener el cuerpo grande y robusto, con mandíbulas anchas y muy expuestas, mentón ovalado que no cubre los palpos labiales, estructuras estriduladoras en el propigidio y protibias, con tres o cuatro dentículos grandes en su borde exterior (**Figura 1-10**). Adicionalmente presentan dimorfismo sexual muy acentuado y evidente ya que los machos presentan cuernos o fosetas en cabeza y pronoto, y las hembras tienen un margen lateral sencillo de los élitros femeninos.

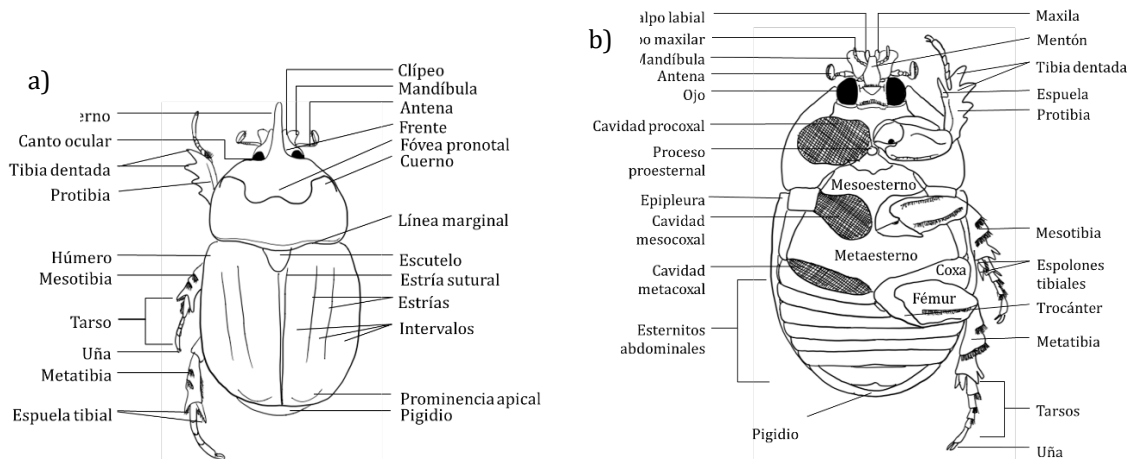


Figura 1-10. Plan corporal de *Strategus aloeus* (Scarabaeidae: Dynastinae: Oryctini) a) vista dorsal, b) vista ventral. Adaptado de Sanabria (2012).

El *S. aloeus* se distribuye geográficamente desde el nivel del mar hasta los 1.500 m.s.n.m, desde zonas de alta humedad hasta zonas secas.⁹⁰ Esta especie, considerada como la especie con mayor distribución en el género,⁸⁹ ha sido registrada desde el sur de los Estados Unidos, atravesando América Central, hasta Bolivia y Brasil.^{17,91} En Colombia, este insecto-plaga se encuentra en todas las zonas palmicultoras desde 1990. Sin embargo, genera mayores

consecuencias económicas en las zonas norte (Magdalena y Cesar) y oriental (Casanare y Meta).⁹²

En Colombia, tal como se señaló previamente, la actividad de los adultos de *S. aloeus* tiene efectos negativos sobre la economía del país, debido a que estos insectos, como barrenadores de estípite, afectan los cultivos de palma africana *Elaeis guineensis* (Jacq.) y de coco *Cocos nucifera* (L.). Adicionalmente, este insecto se constituye en un vector potencial del nematodo *Rhadinaphelenchus cocophilus* (Cobb), agente causal de la enfermedad del Anillo Rojo (AR).¹⁸

1.5.2 Biología, ecología y comportamiento

El ciclo de vida de *Strategus aloeus* tiene una duración de alrededor 11 meses (Figura 1-11).^{18,20,93} Las hembras depositan huevos ovalados y lisos, de color blanco, en grupos de entre 6 y 12 distribuidos en los estípites. Tras 15 días de postura, estos huevos eclosionan en larvas que presentan la forma característica de las chizas de la familia Scarabaeidae. Tienen forma en “C”, tres pares de patas bien diferenciadas y funcionales, cuerpo de color blanco, a excepción de las áreas próximas a los espiráculos y a la porción apical de las mandíbulas (color café rojizo). Estas larvas pasan por tres instares en un transcurso de 215-270 días. Al comienzo del primer instar, las larvas tienen una longitud de 10,6 mm. Al finalizar su tercer instar, su tamaño suele alcanzar los 8 cm. Las pupas de tipo exocrata (47,6 mm de longitud y 24,1 mm de ancho) presentan inicialmente un color naranja que se va oscureciendo a medida que transcurre su periodo pupal. Después de 22 a 27 días como pupas, emergen adultos de color negro que miden entre 4 y 6 cm. Los machos, aparte de presentar un mayor tamaño y dimorfismo sexual por la presencia de tres cuernos o protuberancias en la región torácica, presentan además tres categorías morfológicas mayores, menores e intermedias.⁹⁴ Por lo general, los machos adultos viven menos que las hembras (58 y 89 días respectivamente).

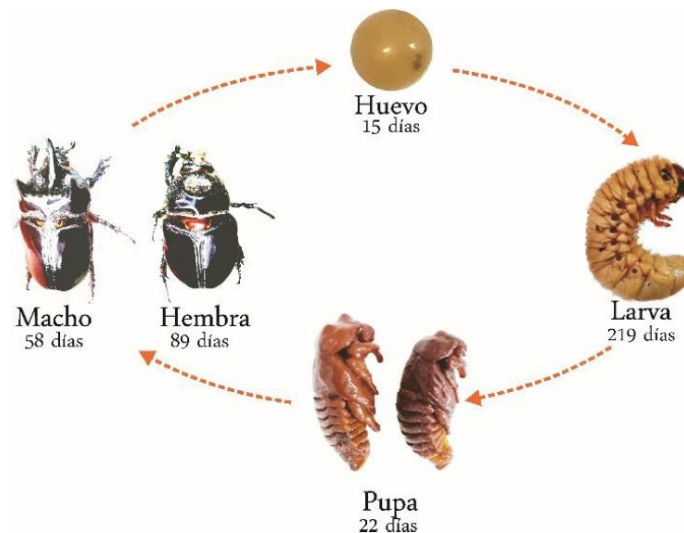


Figura 1-11. Estadios de desarrollo del *Strategus aloeus*. Tomado de Rodríguez (2019).⁹⁵

El daño generado por el escarabajo *S. aloeus*, es generalmente ocasionado en las noches por individuos machos. Inicialmente, estos ejemplares perforan verticalmente el suelo que circunda al bulbo del estípite de palmas jóvenes, no mayores de 2-4 años, y construyen una galería; enseguida, proceden a hacer una perforación lateral hasta penetrar el bulbo de la palma de aceite y alcanzar el meristemo.¹⁷ Adicionalmente, el *S. aloeus* ha sido reportado como

plaga de cultivos de algodón, de coco y de caña de azúcar. Las larvas han sido reportadas como barrenadoras de tejidos vivos de los tallos de palmas, agaváceas y cactáceas, así como de raíces de *Mangifera indica* (Anacardiaceae).⁸⁹ El régimen alimentario de los adultos es considerado como saprófago, debido a que consumen troncos en descomposición y habitan en suelos ricos en materia orgánica.⁹⁶

Las palmas de aceite afectadas por *S. aloeus*, son entonces susceptibles a volcamientos (**Figura 1-12**) y pudriciones debidas a las heridas dejadas por el insecto. Incluso pueden morir como consecuencia de la destrucción total o parcial del sistema radical y del meristemo del bulbo.^{16,18,19}



Figura 1-12. Daño de la palma de aceite ocasionado por el *S. aloeus* provocando el volcamiento y la muerte de palmas jóvenes. Foto: A. Ulloa.

Se ha reportado que, en campo, después de la llegada del macho a la palma y la construcción de la galería, el individuo inicia su despliegue de atracción a hembras conespecíficas alrededor de las 4:00 h, saliendo al extremo superior de la galería. Se ha observado que los machos se ubican con el abdomen hacia afuera y hacen movimientos de los tergitos, sugiriendo que se da lugar a la liberación de una feromona con la que atrae a la hembra para la cópula. Las hembras atraídas llegan a la galería y la cópula ocurre en el interior de esta, mientras la hembra se alimenta. Después de la cópula, la hembra busca madera o estípites de palma en descomposición para depositar sus huevos. Se cree que las hembras llegan a las galerías atraídas por la feromona emitida por el macho y por el aroma derivado de la fermentación que se produce por el daño del insecto en el bulbo de la palma.^{19,94} Adicionalmente, Arias (2019)⁹⁷ evaluó el ritmo de actividad de individuos de campo de *S. aloeus* en condiciones de laboratorio y reportó que entre las 2:00-5:00 h y las 14:00-18:00 h los individuos evaluados durante 5 días presentaron actividades de caminata, locomoción, alimentación y apareamiento demostrando mayor actividad entre de las 2:00-5:00 h y 15:00-18:00 h.

1.5.3 Manejo y control

Han sido reportadas las siguientes estrategias de manejo para *Strategus aloeus*:¹⁶

- Eliminar sitios de reproducción de las larvas de *S. aloeus*.

- Garantizar, en la renovación, la eliminación de los estípites cortando el material en trozos de menos de 15 cm y sin apilar cerca de los sitios de siembra para evitar la afectación a las palmas renovadas.

-Realizar monitoreos semanales en las palmas jóvenes menores a dos años de plantadas para detectar galerías en el suelo junto al estípite.

-Efectuar el manejo de adultos por medio de aplicación de insecticidas con Registro ICA o controladores biológicos promisorios.

-Proteger a los depredadores naturales como *Phileurus didymus*.

Con el fin de controlar y manejar la población de *Strategus aloeus*, se ha implementado un MIP que comprende estrategias de control biológico, químico y cultural.^{16,20}

De hecho, la utilización de microorganismos en programas de control biológico de las larvas se ha visto limitada debido a las características y condiciones de los sitios de alojo de estas, a saber, estípites en descomposición. Evaluaciones del hongo *Metarhizum sp.* como potencial controlador biológico han permitido alcanzar mortalidades de hasta el 90% de insectos en condiciones de laboratorio mediante pruebas de patogenicidad con el aislamiento M010.⁹⁸

Si bien el manejo y control del insecto-plaga de estudio se realiza mediante la implementación de distintas estrategias del MIP, la principal forma de manejo es a través del control químico por medio de la aplicación de insecticidas en las galerías, en ocasiones diluidos con agua y jabón, con el fin de reducir su dosis.⁹⁴ Los insecticidas como los carbamatos y los compuestos organofosforados que actúan a través del contacto y la ingestión y causan neurotoxicidad de los individuos, son el principal método de control de *S. aloeus*.^{17,18} Existen estudios que han demostrado la toxicidad hacia el *S. aloeus* con nuevos insecticidas (fipronil, imidacloprid, lambdacialotrina y tiametoxam) -registrados ante el ICA-,⁹⁹ que incluyen compuestos químicos que tienen un riesgo reducido y presentan menor toxicidad inmediata para los insectos-plaga que los insecticidas convencionales.¹⁰⁰ No obstante, el uso de insecticidas implica un amplio rango de efectos negativos. En efecto, a nivel ambiental, estos compuestos químicos contribuyen a la contaminación del agua, el suelo y el aire; en la flora, aumentan la fitotoxicidad y pueden generar cambios fisiológicos; en la fauna, pueden resultar en problemas fisiológicos como infertilidad e incrementar la mortalidad de distintas especies silvestres, insectos benéficos, polinizadores, predadores y parásitos, e incluso pueden propiciar el desarrollo de resistencia de las plagas; finalmente, en seres humanos, pueden incrementar problemas de salud según su toxicidad.^{22,23}

Habida cuenta de lo anterior, considerando los inconvenientes encontrados en el uso de las tácticas de control químico, cultural y biológico del *S. aloeus* se puede acudir como alternativa especie específica al control etológico. Así, los semioquímicos que median la interacción interespecífica en el sistema hospedero-plaga, a saber, palma de aceite africana y escarabajo rinoceronte, y aquellos que median la interacción intraespecífica del insecto-plaga, que pueden estar influyendo en el ataque del cultivo por parte del insecto, representan una alternativa en su MIP. Por ende, la presente investigación buscó extraer, detectar e identificar dichos semioquímicos.

2. VOCs liberados por la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)

El estípite de palmas de aceite jóvenes y los desechos de estípite resultantes de los procesos de renovación del cultivo son tanto hospederos, como fuente de alimento para colonias de *Strategus aloeus*. Lo anterior sugiere que estos hospederos pueden estar liberando algunos compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que podrían actuar como señales químicas para el escarabajo. En este capítulo se presenta la caracterización del perfil de VOCs liberados por el estípite de palmas de aceite *Elaeis guineensis* menores de 2 años, hospederos naturales del *S. aloeus*.

2.1 Antecedentes

Teniendo en cuenta que el primer nivel trófico de los ecosistemas está constituido por los vegetales, estos se encuentran altamente expuestos al ataque por herbívoros (virus, bacterias, hongos, insectos y vertebrados). Por lo anterior, la herbivoría ha ejercido una presión de selección, la cual se ha traducido en el desarrollo y aparición de una gran cantidad de mecanismos de defensa pasivos o inducidos por parte de las plantas de manera física, química y/o fenológica. Sin embargo, se ha evidenciado que varios metabolitos secundarios de las plantas inducidos o no, pueden resultar atrayentes para algunos depredadores. En el caso de plantas infestadas, algunos estudios sugieren que por lo general, los lepidópteros y los áfidos son repelidos, y los coleópteros atraídos, probablemente por metabolitos secundarios producidos a causa de la infestación.²⁵

De acuerdo con lo anterior, para el desarrollo de nuevas estrategias en el manejo de insectos-plaga, existen grandes posibilidades de encontrar VOCs que correspondan a metabolitos secundarios participantes en la interacción entre el hospedero y el insecto.¹⁰¹

2.1.1 Biosíntesis de los VOCs en plantas

Las plantas producen un amplio número de metabolitos secundarios. El 1% de estos corresponde a VOCs que, al ser liberados al ambiente, les sirven para comunicarse con su entorno. Más de 1700 VOCs han sido reportados para el aroma floral de alrededor de 90 familias y 38 órdenes de plantas.¹⁰² De acuerdo con su origen biosintético a partir de los iniciadores fosfoenolpiruvato (PEP) y eritrosa 4-fosfato (E4P), los compuestos orgánicos volátiles de las plantas se distribuyen principalmente en: terpenoides, derivados de ácidos grasos, fenilpropanoides/bencenoides y derivados de aminoácidos (**Figura 2-1**).¹⁰³

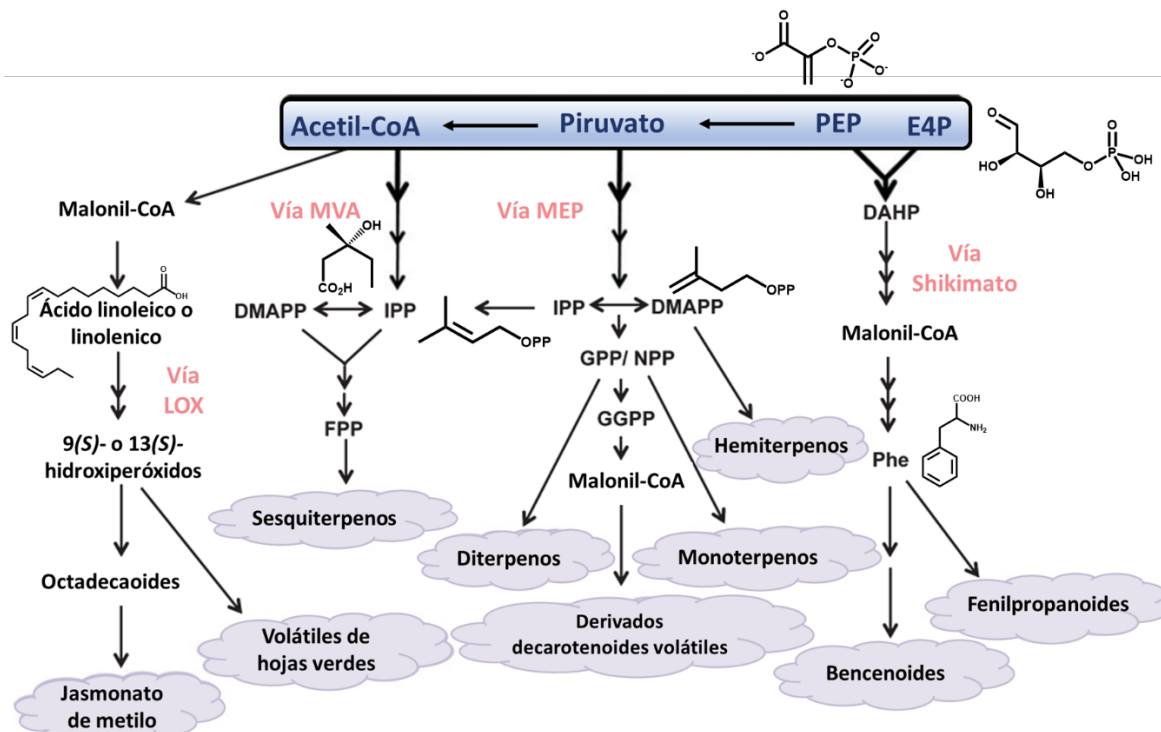


Figura 2-1. Descripción general de las cuatro rutas biosintéticas principales de los VOCs de plantas. Los precursores de los VOCs originados en el metabolismo primario (representado en el cuadro azul). Las cuatro vías biosintéticas principales presentadas por las flechas que se originan del cuadro azul: vía shikimato/fenilalanina, vía del ácido mevalónico (MVA), vía del fosfato de metileritritol (MEP) y vía de la lipoxigenasa (LOX) conducen a la emisión de los tipos de VOCs presentados en las nubes moradas. Las flechas apiladas ilustran la participación de múltiples reacciones enzimáticas. **DAHP**: ácido 3-desoxi-7-fosfo-D-arabinoheptulosónico; **DMAPP**: pirofosfato de dimetilalilo; **E4P**: eritrosa 4 fosfato; **FPP**: pirofosfato de farnesilo; **GGPP**: pirofosfato de geranilgeranilo; **GPP**: pirofosfato de geranilo; **IPP**: pirofosfato de isopentenilo; **NPP**: pirofosfato de nerilo; **PEP**: fosfoenolpiruvato; **Phe**: fenilalanina. Tomado y traducido de Dudareva *et al.* (2013).¹⁰

Los terpenoides corresponden a la clase más grande y diversa de VOCs de plantas provenientes de las rutas que producen los compuestos de cinco carbonos, a partir de pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP).^{10,104,105}

Por otro lado, los fenilpropanoides y bencenoides corresponden a los VOCs que contienen un anillo aromático. Constituyen el segundo grupo más grande de volátiles procedentes de plantas.¹⁰² Aún se desconocen algunas de las reacciones que producen los esqueletos básicos. Sin embargo, los iniciadores y precursores de estos compuestos corresponden a la fenilalanina y al ácido shikímico.

Ahora, el tercer grupo de volátiles de plantas proviene de la escisión oxidativa y descarboxilación del ácido linoleico o ácido linolénico, produciendo cetonas y aldehídos de cadenas más cortas, los cuales, a su vez, resultan ser precursores para la biosíntesis de volátiles. Esto mediante la ruta conocida como la ruta de los ácidos grasos/lipooxigenasa también conocida como la ruta biosintética de los volátiles de las hojas verdes.¹⁰¹ Los aldehídos y alcoholes C₆-C₉ saturados e insaturados son comúnmente conocidos como volátiles de hojas verdes. Se reporta que su síntesis por lo general se potencializa en los órganos verdes de las

plantas en respuesta a las heridas y también proporciona el aroma “verde fresco” de frutas y verduras.

Finalmente, los VOCs de plantas restantes, principalmente aquellos que contienen nitrógeno o azufre y son, por lo general, producidos por las flores y las frutas, se sintetizan mediante reacciones de escisión de aminoácidos como la alanina, valina, leucina, isoleucina o metionina, aminoácidos o precursores.^{10,105}

2.1.2 VOCs identificados en las palmas

Para el orden Arecaceae, dentro del cual las plantas se conocen comúnmente como palmas, existen varios reportes de los VOCs asociados principalmente a sus flores. En 1999, Ervik *et al.* realizaron la caracterización del aroma floral de 6 especies de palmas de la subfamilia Phytelephantoideae e identificaron los siguientes VOCs agrupados por tipos de compuestos:¹⁰⁶ *derivados de ácidos grasos* (acetato de isopropilo, butanoato de isopropilo, butanoato de 2-metilbutilo, acetato de butilo, isovalerato de isopropilo, hexanal, undecano, valerato de propilo, hexanoato de isopropilo y hexanol); *pirazinas* (2-metoxi-3-*sec*-butilpirazina); *bencenoides* (bencil metil éter, *p*-metilanisol, benzoato de etilo, acetato de 2-feniletilo, alcohol bencílico, anisaldehído, *p*-cresol, elemicin y *p*-metodibencil alcohol); *isoterpenoides* (mirceno, limoneno, 1,8-cineol, *cis*-ocimeno, *trans*-ocimeno, 4,8-dimetil-1,3-(*E*)-7-nonatrieno, linalool, *trans*-ocimenol); *sesquiterpenos* (α -cubebeno, α -copaeno, β -copaeno, cariofileno, alloaromadendreno, α -humuleno, germacreno, *cis*- α -farneseno, δ -cadineno, 4,8,12-trimetil-1,3-(*E*)-7-(*E*)-11-tridecatetraeno).

Por su parte, en Knudsen *et al.* (2000) reportaron la caracterización del aroma de las flores de 14 especies de palmas neotropicales pertenecientes a las familias Coryphoideae, Calamoideae, Ceroxyloideae y Arecoideae, y su posible relación con el tipo de insectos polinizadores de las mismas. Señalaron que las inflorescencias de estas palmas presentaron en su aroma un contenido considerable de compuestos químicos clasificados en cuatro clases principales: *derivados de ácidos grasos* (3-pentanona, dodecano, tridecano y pentadecano); *bencenoides* (*p*-dimetoxibenceno); *terpenoides* (mirceno, (*E*)-ocimeno, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, linanol, ipsdienona, (*E*)- β -farneseno, ipsdienol y (*E,E*)- α -farneseno); y, *compuestos nitrogenados* (2-metoxi-*sec*-butilpirazina e indol). Señalan además que la gran parte de estos VOCs son comunes en el aroma floral de la mayoría de las familias de plantas.¹⁰⁷ Finalmente, sugieren que la composición del aroma de las palmas parece estar más relacionada con la biología de polinización que con relaciones sistemáticas entre palmas. Lo anterior, indicando que el aroma de palmas polinizadas por coleópteros está dominado por uno o más compuestos estrechamente relacionados, principalmente hidrocarburos derivados de ácidos grasos. En cambio, para la polinización por parte de insectos voladores como abejas y sírfidos, el aroma de las palmas está constituido por una mayor diversidad de VOCs en bajas concentraciones. Por lo tanto, esta polinización podría estar mediada por señales visuales y no tanto por señales químicas.

Para algunas palmas de vino (*Attalea*) y palmas de guacamayo (*Acrocomia*), de importancia económica, se reportó que su aroma floral estaba constituido por el bencenoide 4-metilanisol, el monoterpeno D-limoneno, las pirazinas 2-isopropil-3-metoxipirazina y 2-(*sec*-butil)-3-metoxipirazina, y otros compuestos minoritarios.^{108,109}

Para las flores de *Geonoma macrostachys*, se reportaron los siguientes compuestos que variaron entre el día y la noche: *bencenoides* (metileugenol, eugenol, metilioeugenol); *monoterpenos* (mirceno, epoximirceno, ipsenona, ipsdienona, acetato de ipsdienilo, amitinol,

acetato de mircenilo, ipsdienol, (*Z*)-ocimeno, (*E*)-ocimeno, (*E*)-ocimenol, linalool; *sesquiterpenos* ((*E*)- β -farneseno, (*Z,E*)- α -farneseno, (*E,E*)- α -farneseno, óxido de (*E*)- β -farneseno, (*E*)-sesquifelandreno, (*E*)-nerolidol); *compuesto nitrogenado* (indol), y otros no elucidados.¹¹⁰

Con respecto a las hojas de palmas, para la palmera enana *Chamaerops humilis* se reportó el alcohol bencílico, el (*E*)- β -ocimeno, el benzoato de metilo, el linalool, el indol, sesquiterpenos, el 3-hexen-ol, el acetato de hexenilo, el acetaldehidobenceno, la vanillina, el nonanal, el 3-hexanol y el α -farneseno.¹¹¹ Finalmente, Jana *et al.* (2020) aislaron y caracterizaron funcionalmente bacterias rizosféricas de la palma datilera que producen los VOCs 2,3-butanediol y acetoina.¹¹²

Ahora, particularmente para la especie de interés, *Elaeis guineensis* (Jacq.), se ha reportado el isopreno (2-metil-1,3-butadieno) como protector de la fotosíntesis al haber estrés oxidativo liberado por las hojas de la palma de aceite.^{113,114} Adicionalmente, varias investigaciones han reportado para las inflorescencias de la palma de aceite africana el estragol (4-alilanisol) como compuesto orgánico volátil mayoritario y de gran importancia para el reclutamiento de polinizadores como el curculiónido *Elaeidobius kamerunicus* y responsable del olor anís.^{114,115} Además del estragol, Fahmi *et al.* (2016) reportaron los ácidos hexadecanoico, isoftálico, 9,12-octadecadienoico, el ácido (*Z,Z,Z*)-octadecatrienoico, el oleato de etilo, el eicosano, el heptadecano y el escualeno.¹¹⁶ Por su parte, Filho *et al.* (2019) reportaron el limoneno, el *p*-cimeno, el eucaliptol, la 2-isobutil-3-metoxipirazina, el anetol y el 7,8-dihidro- β -ionona, como VOCs liberados por inflorescencias de *E. guineensis*.⁵²

Hasta donde se ha logrado establecer, las caracterizaciones químicas de los VOCs llevadas a cabo para distintas especies de palmas y, particularmente para *Elaeis guineensis*, corresponden únicamente a los VOCs liberados por las inflorescencias y hojas de las plantas.

No obstante, en el 2019, Zainol Hilmi *et al.* reportaron algunos constituyentes liberados por el estípite de *E. guineensis* en la caracterización del perfil volátil del hongo *Ganoderma boninense*, agente principal causante de la pudrición del cogollo (PC). Los VOCs tentativamente identificados para los estípites no infestados fueron los siguientes: 2,3-butanediol, hexanal, furfural, *m*-xileno, *o*-xileno, heptanal, (*Z*)-2-heptenal, ácido hexanoico, 1,2,3-trimetilbenceno, 2-pentilfurano, octanal, 1,4-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno, limoneno, 2-etil-1,4-dimetilbenceno, 2-nonano, undeceno, nonanal, 1,2,3,4-tetrametilbenceno, (*E*)-nonenal, naftaleno, dodecano, decanal, 1,3-diterc-butilbenceno, 2-undecanona, tridecano, 1-metilnaftaleno, tetradecano y pentadecano.¹¹⁷

2.1.3 Cairomonas en el manejo de escarabajos


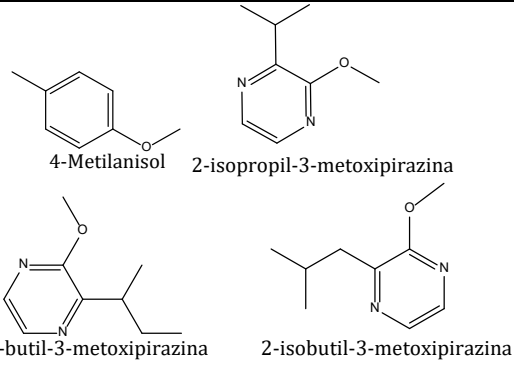

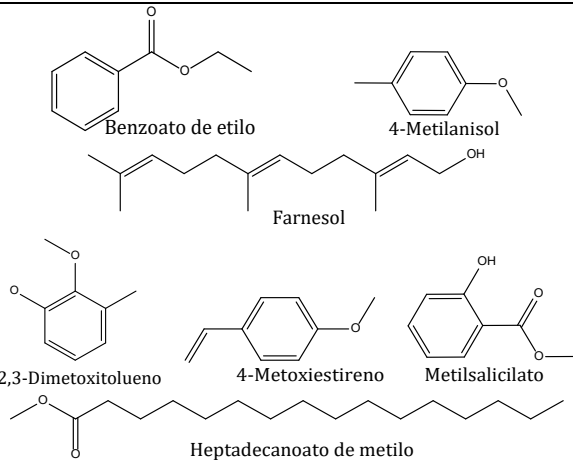
Las plantas producen, entre sus VOCs, compuestos que resultan ser señales de atracción para insectos herbívoros -actuando como cairomonas-. Gracias a dichos compuestos los insectos logran ubicar sus hospederos, sitios para oviposición y reproducción, y alimento.^{29,65,118} En el control etológico de insectos plaga, el ejemplo más exitoso del uso de compuestos que actúan como cairomonas, corresponde principalmente al empleo de cebos de proteína hidrolizada en estado de fermentación contra la mosca de la fruta.⁷⁴


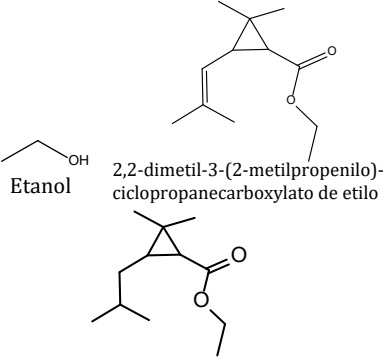
Para la mayoría de los insectos plaga, el uso de cairomonas de las plantas hospederas como únicos constituyentes de las trampas no ha resultado del todo atractivo por las altas concentraciones que deben emplearse para que sean competitivas contra las cairomonas naturales en los cultivos. Sin embargo, lo anterior no significa que este tipo de semioquímicos

no sean de gran importancia en el MIP. De hecho, se han reportado, principalmente para coleópteros, varios casos de interacción sinérgica entre las cairomonas y feromonas de agregación incrementando la atracción de estas últimas.^{75,119-122}

Existen varios reportes de cairomonas para coleópteros pertenecientes a la familia Scarabaeidae.^{95,123,124} Algunos ejemplos de estos son los siguientes: el escarabajo *Anomala octiescostata* hacia volátiles liberados por dientes de león *Taraxacum officinale*;¹²⁵ escarabajos peloteros hacia volátiles del estiércol de vertebrados;¹¹⁹ *Hoplia communis* hacia el constituyente mayoritario del aroma de *Rosa spp.*, 2-feniletanol;¹²⁶ *Popillia japónica* hacia cairomonas de varios de sus hospederos;^{124,127} Adicionalmente reportaron actividad electrofisiológica del escarabajo herbívoro *Cyclocephala forsteri* frente al bencenoide y las pirazinas identificadas en las palmas de vino y guacamayo, y atracción en campo exclusivamente hacia el 4-metilanisol.¹⁰⁸ En la **Tabla 2-1** se presentan algunos VOCs de palmas que actúan como atrayentes y cairomonas para distintas especies de escarabajos.^{108,109,122,128-130} Sin embargo, hasta donde se conoce no hay reportes de cairomonas de la palma de aceite para el *S. aloeus*.

Tabla 2-1. Ejemplos de VOCs que actúan como cairomonas de escarabajos (Coleoptera: Scarabaeidae)

Escarabajo	Cairomonas	Referencia
 <p><i>Cyclocephala forsteri</i></p>	 <p>4-Metilanisol 2-isopropil-3-metoxipirazina 2-sec-butil-3-metoxipirazina 2-isobutil-3-metoxipirazina</p>	<p>Maia <i>et al.</i> (2018)¹⁰⁹ Maia <i>et al.</i> (2019)¹⁰⁸</p>
 <p><i>Oryctes agamemnon</i></p>	 <p>Benzoato de etilo 4-Metilanisol Farnesol 2,3-Dimetoxitolueno 4-Metoxiestireno Metilsalicilato Heptadecanoato de metilo</p>	<p>Hasni <i>et al.</i> (2017)¹²²</p>

 <p><i>Oryctes rhinoceros</i></p>	 <p>Etanol</p> <p>2,2-dimetil-3-(2-metilpropenilo)-ciclopropanecarboxilato de etilo</p> <p>3-isobutil-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato de etilo</p>	<p>Hallet <i>et al.</i> (1996)¹²⁸ Maddison <i>et al.</i> (1973)¹³⁰ Barber <i>et al.</i> (1971)¹²⁹</p>
--	---	--

2.2 Metodología

Para llevar a cabo la caracterización de los VOCs de la palma de aceite que podrían ser responsables de la interacción *Elaeis guineensis*-*Strategus aloeus*, se evaluaron dos sistemas con palmas de aceite *Elaeis guineensis* menores de 2 años, bajo condiciones de laboratorio: (1) Muestra de estípite; y, (2) Palma sembrada e infestada con adultos machos de *Strategus aloeus*.

El primer sistema fue estudiado con el fin de determinar los VOCs liberados por la fuente de alimento natural del *S. aloeus*. Por otro lado, el segundo sistema se propuso con el fin de simular las condiciones reales de las palmas vivas sanas e infestadas con *S. aloeus* bajo condiciones de laboratorio.

2.2.1 Obtención de la muestra

Para la toma de muestras se seleccionaron palmas de aceite *Elaeis guineensis* (Jacq.) menores a 2 años, provenientes del vivero del Campo Experimental “Palmar de las Corocoras” de Cenipalma, localizado en Cabuyaro, municipio de Paratebueno, (Cundinamarca, Colombia)- coordenadas geográficas N4°22'4,7" W73°10'19,4"-.

Para la toma de muestras de estípite (sistema 1) se seleccionaron palmas menores de 2 años, las cuales fueron retiradas de sus bolsas y despojadas de raíces y hojas. Enseguida, el bulbo de cada palma fue cortado, envuelto en vinipel, refrigerado y posteriormente enviado al laboratorio en Bogotá (**Figura 2-2** a y b).



Figura 2-2. Muestras naturales empleadas para la caracterización de los trozos estípites de la palma de aceite (sistema 1): a) bulbo de estípites de *Elaeis guineensis* de 10 meses, y b) bulbo de estípites de palma de aceite menor de 2 años. Foto: V. Vidal-Medina.

Para el sistema 2 se emplearon palmas vivas sin daño físico visible. A su llegada a Bogotá, las palmas fueron retiradas de sus bolsas y trasplantadas en recipientes plásticos con tapa. Se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 10\%$ HR). Los individuos machos de *Strategus aloeus* empleados para la infestación de la palma, fueron capturados en campo, en la plantación “Manuelita aceites y energía”, con edad y estado de apareamiento desconocidos. Los insectos fueron obtenidos de las excavaciones en galerías construidas por ellos en palmas, situadas en los lotes jóvenes de renovación en los cuales se había evidenciado la presencia de la plaga. Dicha captura se realizó en cumplimiento del permiso de recolección otorgado por la ANLA a Cenipalma, Resolución 2431 de 2018 (**Anexo A**). Cada sexo se mantuvo por separado bajo condiciones controladas ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 10\%$ HR y fotoperíodo de 12:12h) en recipientes de plástico con orificios en las tapas. Se les proporcionó estípites en descomposición como fuente de alimento, que se reemplazó tres veces por semana. De otra parte, suelo orgánico proveniente del cultivo fue dispuesto como sustrato, que se humedeció periódicamente agregando gotas de agua.

2.2.2 Extracción de los VOCs de la planta

Para la recolección de los VOCs se emplearon dos metodologías de extracción de compuestos orgánicos volátiles en el espacio de cabeza como se describe a continuación.

▪ Sistema 1

Para la extracción de los VOCs liberados por los estípites de palma, a su llegada a Bogotá, los bulbos fueron cortados en trozos e inmediatamente después fueron colocados en cámaras de *headspace*.

Se emplearon las metodologías de *Headspace* Micro Extracción en Fase Sólida (HS-MEFS) y *Headspace* Dinámico (HSD). Se realizaron experimentos preliminares de extracción de VOCs liberados por el estípite de palma de aceite bajo diferentes condiciones experimentales (cantidad de muestra, presencia o ausencia de suelo y tiempos de extracción), con el fin de establecer las condiciones que permitieran la detección de los VOCs liberados.

Para la HS-MEFS, se empleó una muestra de 30 g de estípite y se utilizó un montaje conformado por un recipiente de vidrio (cámara de *headspace*) de 30 cm de largo x 4 cm de diámetro externo, provisto de una apertura en la cual se acopló una fibra de Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm de espesor, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU., **Figura 2-3**). Una vez encerrados los trozos de estípite de *Elaeis guineensis* en los recipientes de vidrio, se dejó pasar un lapso de 10 minutos para alcanzar el equilibrio. Enseguida, se expuso la fibra polimérica en el espacio de cabeza del montaje de HS-MEFS durante 24 horas. Cada extracción se realizó para dos muestras y un blanco constituido por el recipiente vacío. Cada extracción se realizó por triplicado en días diferentes y con muestras de estípite diferentes. Las extracciones se realizaron a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $70\% \pm 10\%$ HR.

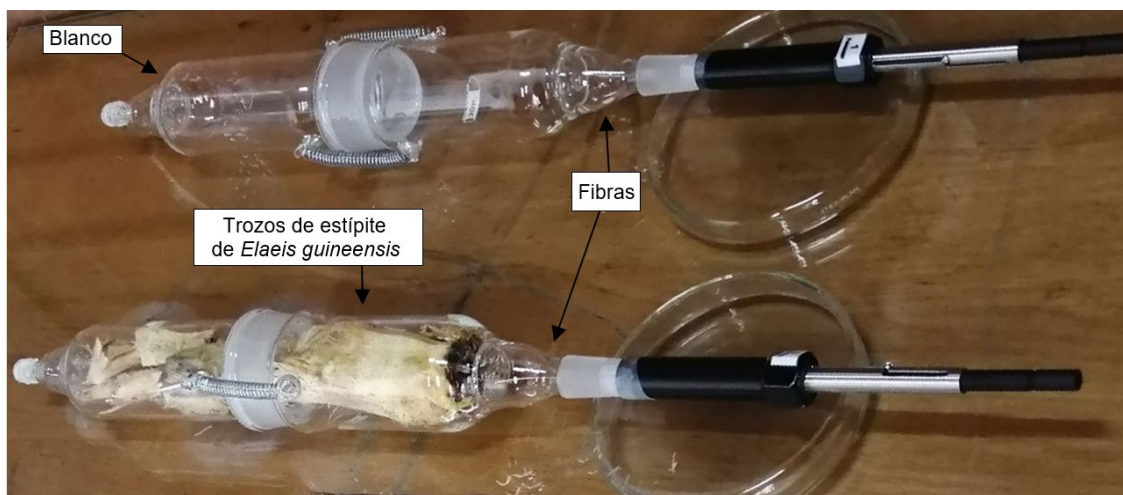


Figura 2-3. Montaje de extracción de los VOCs de trozos de estípite de *Elaeis guineensis* mediante HS-MEFS. Foto: V. Vidal-Medina.

Para la extracción por HSD se utilizó el montaje conformado por un recipiente de vidrio de dimensiones 30 cm de largo x 4 cm de diámetro externo (**Figura 2-4**), en donde se acopló en uno de los extremos una entrada de aire humedecido y en el otro extremo tubos de ORBO-32 (carbón activado, *Standard Charcoal Tubes*, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.), material adsorbente utilizado para recolectar los compuestos orgánicos volátiles liberados por la muestra natural bajo estudio. Este material adsorbente fue elegido tomando como referencia ensayos preliminares en los cuales se había evidenciado que permitía retener un mayor número de VOCs en comparación con columnas de vidrio (10 cm x 0,5 cm de diámetro) que contenían 50 mg de Porapak® Q50/80 (Supelco, Bellefonte PA, EE. UU.), polímero adsorbente

conformado por un copolímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno, columnas semejantes con la misma cantidad de HayeSep D 80/100 (copolímero de divinilbenceno) y MonoTrap™ (soporte de sílica ligado a grupos de octadecil-sílica y carbón activado). El sistema se aireó con aire humedecido con agua mediante una bomba portátil a un flujo de 1 L/min durante 7 días. Al igual que para la metodología anterior, cada extracción se realizó, por triplicado, con muestras de estípites diferentes (30 g) y un blanco constituido por el recipiente vacío. Todas las muestras se tomaron a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $70\% \pm 10\%$ HR.

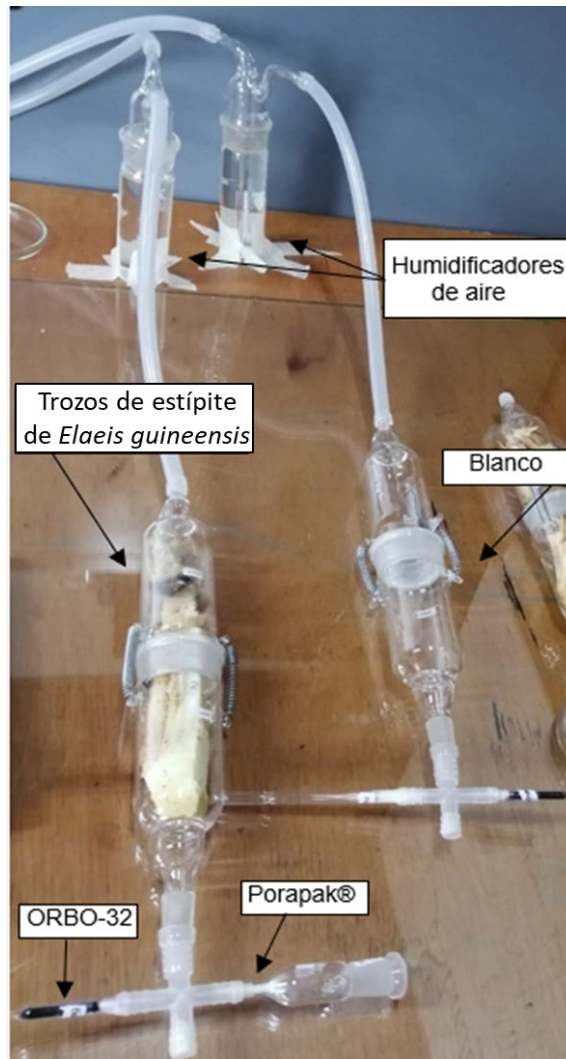


Figura 2-4. Montaje de extracción de los VOCs de trozos de estípites de *Elaeis guineensis* mediante HSD. Foto: V. Vidal-Medina.

▪ Sistema 2

Como se mencionó anteriormente, el sistema 2 estaba constituido por una palma de aceite *E. guineensis* menor de 2 años plantada en suelo proveniente del cultivo de palma de aceite, en un recipiente de plástico con tapa. Sobre el suelo, se agregaron cinco especímenes adultos machos de *S. aloeus* procedentes de campo. Para este sistema, como blanco se empleó un montaje semejante, sin insectos, es decir una palma de aceite *E. guineensis* sembrada, de la misma edad que la infestada (**Figura 2-5 a y b**).

Para la extracción de los VOCs liberados por el sistema se empleó la metodología de extracción por espacio de cabeza dinámico, HSD, utilizando como materiales adsorbentes tubos de ORBO-32 (carbón activado, *Standard Charcoal Tubes*, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.) y columnas de vidrio empacadas con 50 mg de Porapak® Q50/80 (copolímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno, Supelco, Bellefonte PA, EE. UU.).

El sistema 2 se aireó con aire humedecido con agua mediante una bomba portátil a un flujo de 1 L/min, una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y humedad relativa de $70\% \pm 10\%$ HR durante 2 meses comprendidos entre el 2 de julio y el 11 de septiembre de 2019.

Los VOCs recolectados por HSD en los materiales adsorbentes empleados fueron extraídos de los materiales adsorbentes cada semana con $\sim 300\ \mu\text{L}$ de hexano de grado HPLC (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Estos extractos fueron concentrados con una corriente de nitrógeno hasta un volumen final de $50\ \mu\text{L}$, mezclados semanalmente -para aumentar la concentración de los VOCs-, y posteriormente fueron analizados por GC-MS.

Ensayos preliminares permitieron determinar que dos meses era el tiempo mínimo requerido para lograr detectar VOCs en el sistema.

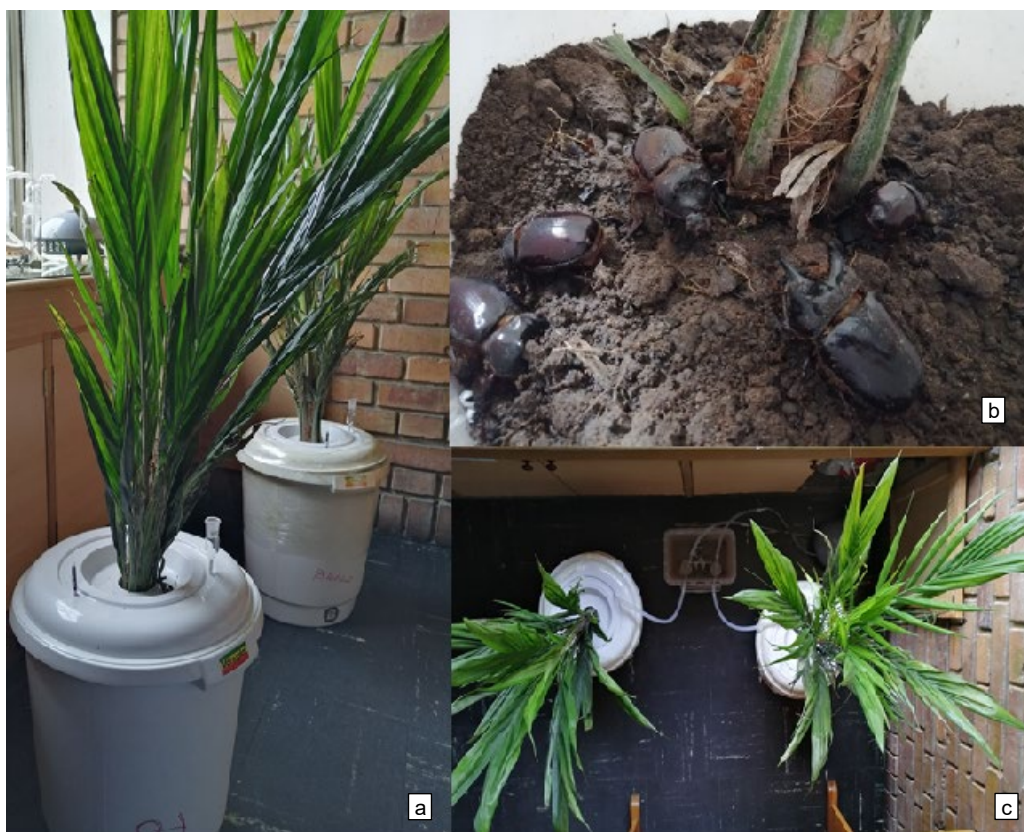


Figura 2-5. Montaje de HSD para las palmas de aceite plantadas sana e infestada con machos de *Strategus aloeus*: a) Vista frontal de los montajes, b) Palma infestada con machos de *S. aloeus*, c) Vista superior del montaje. Foto: V. Vidal-Medina.

2.2.3 Análisis e identificación de los VOCs extraídos

Los VOCs extraídos mediante las metodologías anteriormente mencionadas, fueron analizados e identificados en un Cromatógrafo de Gases HP 6890 Series GC acoplado a un Espectrómetro

de Masas HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, EE. UU.), equipado con una columna capilar TG-1MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm espesor de partícula; Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

El análisis cromatográfico se realizó con una temperatura en el puerto de inyección de 250°C, usando helio como gas de arrastre con un flujo de 1.5 mL/min. Se empleó el siguiente programa de calentamiento: 35°C de temperatura inicial durante 1 minuto, seguida de un calentamiento hasta 40°C, con una rampa de calentamiento de 2°C/min, seguido por un calentamiento hasta 250°C a 7°C/min.

Luego de cumplir el tiempo de exposición para cada experimento, las fibras de HS-MEFS fueron removidas de las cámaras de *headspace*. Inmediatamente después fueron desorbidas en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases durante 5 minutos y analizadas en modo *splitless* sin tiempo de retraso de disolvente. Por su parte, las muestras en solución de hexano resultantes de las extracciones por HSD, fueron concentradas con nitrógeno e inyectadas en una cantidad de 1 µL, en modo *splitless*, con un tiempo de retraso de disolvente de 3 minutos.

Los datos de los espectros de masas en el modo de ionización de electrones (EI, *Electron Ionization, por sus siglas en inglés*) se registraron en un rango de masa de 30-650 u, con energía electrónica de 70 eV. El procesamiento de datos se realizó mediante el software HP Chemstation. En cuanto al análisis de los datos, se empleó el software *Agilent MSD Productivity ChemStation for GC and GC/MS Systems Data Analysis Application*.

La identificación de los VOCs presentes en los extractos se basó en los índices de retención y en la comparación de los espectros de masas. Para la identificación inequívoca, además de la comparación con la base de datos de espectros (NIST/EPA/NIH *Mass Spectral Library Versión 2011*), se utilizaron patrones de referencia. Los siguientes patrones fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Indianápolis, EE. UU.): acetato de sec-butilo, acetato de etilo, 2-hexanona, 3-hexanona, hexanal, etilbenceno, *p*-xileno, *o*-xileno, estireno, α -pineno, benzaldehído, fenol, *p*-cimeno, eucaliptol, D-limoneno, alcohol fenetílico, salicilato de etilo, β -cariofileno, humuleno, α -farneseno, metacrilato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, isovalerato de etilo, isononano, butanoato de propilo, tiglato de etilo, metacrilato de isobutilo, butanoato de isobutilo, *m*-etiltolueno, propanoato de isopentilo, 4-metilnonano, 3-metilnonano, acetato de hexilo, 2-careno, *o*-dietilbenceno, decahidronaftaleno, *m*-etilestireno, tiglato de isobutilo, 1-undeceno, *p*-etilanol, *p*-metoxiestireno, ácido *n*-caprílico, 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano, α -cubebeno, α -copaeno, guayacol isocariofileno, 2,6-di-*tert*-butilbenzoquinona, aromandendreno, éter caprílico. Los siguientes patrones de referencia fueron adquiridos en Supelco (Bellefonte, PA, EE. UU.): propanoato de etilo, isopentanol, isobutanoato de etilo, butanoato de etilo, acetato de isopentilo, *m*-xileno, anisol, cumeno, *o*-etiltolueno, junipeno, mesitileno, sabineno, hemimelliteno, α -deceno, hexanoato de etilo, α -Toluenol, *p*-dietilbenceno, benzoato de etilo, *p*-etilfenol, naftaleno, *p*-etilguayacol, ácido nonanoico, α -gurjuneno, β -gurjuneno, α -elemeno, valenceno, δ -cadineno y hexacosano. La 2-butanona, la 3-pentanona, el 4-etilestireno y el 2-etil-*p*-xileno fueron adquiridos de los proveedores Panreac (Chicago, EE. UU.), Alfa Aesar (Massachusetts, EE. UU.), Alfa Chemistry (Nueva York, EE. UU.) y Fisher Scientific (Waltham, EE. UU.), respectivamente.

Los índices de retención (IR) se calcularon de conformidad con el método de Kovats, empleando, para el análisis, una mezcla de parafinas, C₈-C₄₀, (*Alkanes Calibration Standard* en diclorometano, Sigma-Aldrich, Indianapolis, EE. UU.) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IR = 100 \left(\frac{t_r(x) - t_r(n-1)}{t_r(n+1) - t_r(n-1)} + nC_{(n-1)} \right)$$

donde $t_r(x)$ es el tiempo de retención del analito; $t_r(n-1)$ el tiempo de retención de la parafina que eluye inmediatamente antes que el analito; $t_r(n+1)$ el tiempo de retención de la parafina inmediatamente posterior al analito; y $nC_{(n-1)}$ el número de carbonos de la parafina inmediatamente anterior al analito.

Para cada una de las muestras analizadas se realizó la integración de los picos teniendo los siguientes parámetros de integración (Evento-Valor-Tiempo): i) *Initial Area Reject-0-Initial*; ii) *Initial Peak Width-0,052-Initial*; iii) *Shoulder Detection-OFF-Initial*; iv) *Initial Threshold-13,7-Initial*. Los picos exclusivos de las muestras bajo estudio se determinaron de acuerdo con la integración anterior y empleando un tratamiento de resultados para cada experimento en el cual se restan los picos del blanco. Para realizar una identificación preliminar tentativa, a partir de la búsqueda de librería (*Library Search Report*), se seleccionaron aquellos picos con espectros de masas para los cuales se obtuvo un porcentaje de similitud superior al 90% respecto al VOC propuesto por la base de datos.

Finalmente, las cantidades relativas presentadas a lo largo del documento para cada uno de los VOCs identificados se calcularon con base en su relación de áreas.

2.3 Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados de la caracterización de los VOCs de la palma de aceite evaluados en los dos sistemas de estudio descritos.

2.3.1 Perfil de volátiles del estípite de la palma de aceite

En estudios previos, Rochat *et al.* (2000) reportaron la 2-butanona, la 3-pentanona y el acetato de *sec*-butilo como los compuestos constituyentes de la feromona de agregación macho-específica del *Strategus aloeus*. De acuerdo con resultados preliminares en los cuales se evidenció la presencia de dos de los VOCs previamente mencionados en el perfil de volátiles procedentes del hospedero y alimento de *S. aloeus*, en primera instancia se realizó una búsqueda dirigida de los tres compuestos reportados en el sistema 1 (**Tabla 2-2**).

Tabla 2-2. Búsqueda dirigida de los compuestos reportados por Rochat *et al.* (2000) en los extractos de VOCs liberados por trozos estípite de la palma de aceite *Elaeis guineensis*.

(X= se encuentra presente; -= no se encuentra presente; ND= no detectable mediante la técnica analítica empleada)

Compuestos reportados por Rochat <i>et al.</i> (2000)	VOCs (Metodología de extracción/Material adsorbente)		
	HSD		HS-MEFS
	ORBO-32	Porapak®	DVB/CAR/PDMS
2-Butanona	N.D.	N.D.	X
3-Pentanona	N.D.	N.D.	X
Acetato de <i>sec</i> -butilo	-	-	-

La 2-butanona y la 3-pentanona fueron identificadas entre los VOCs liberados por trozos del estípite de la palma de aceite de variedad *Elaeis guineensis* menores de 2 años, utilizando la misma metodología de extracción (HS-MEFS), con una fibra triple de Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) que contiene dos (DVB/PDMS) de los componentes de la fibra empleada en los estudios realizados por Rochat *et al* (2000) (**Tabla 2-2**). Cabe resaltar no fue posible detectar la 2-butanona y la 3-pentanona para los extractos de HSD debido a las condiciones analíticas requeridas para el análisis cromatográfico por GC-MS de los extractos en solución, tal y como se explicará más adelante al comparar las dos metodologías de extracción.

La 2-butanona y la 3-pentanona identificadas en el estípite de la palma de aceite han sido reportadas previamente como compuestos atrayentes o constituyentes de feromonas para distintas especies de insectos.¹³¹⁻¹³⁷ Por un lado, la 2-butanona, cetona de 4 átomos de carbono, ha sido reportada como atrayente para una gran variedad de especies de escarabajos del orden Coleoptera,¹³⁸ y familia Scarabaeidae.^{26,119,139} De hecho, esta cetona fue identificada como uno de los constituyentes del aroma del estiércol,^{119,138-140} y del olor producido por las inflorescencias de *A. abyssinicus*,^{139,141} que resulta crucial en la atracción de los escarabajos. Por su parte, la 3-pentanona se reporta entre los compuestos secretados por las especies de chinches *Triatoma brasilenis* y *Triatoma infestans*,^{142,143} y de cucarachas *Periplaneta americana*,¹⁴⁴ de los órdenes Hemiptera y Dictyoptera, respectivamente.

Además, la 2-butanona y la 3-pentanona también han sido reportadas como compuestos orgánicos volátiles liberados por una gran variedad de plantas, algunas de estas pertenecientes a las familias Rosaceae, Brassicaceae, Actinidiaceae y Oleaceae.^{131,145,146} En particular, la 3-pentanona hace parte de los VOCs liberados por inflorescencias de especies de palmas encontradas en Colombia, tales como *Chelyocarpus ulei*, *Mauritia flexuosa* y *Wettinia kalbreyeri*, pertenecientes, al igual que *Elaeis guineensis*, a la familia Arecaceae.¹⁰⁷

La detección de la 2-butanona y la 3-pentanona entre los VOCs liberados por el estípite de la palma de aceite, hospedero y alimento del insecto-plaga *S. aloeus*, sugiere que la fuente de estas dos cetonas podría ser el hospedero del insecto lo que podría indicar su papel como caïromonas en la interacción *E. guineensis*-*S. aloeus*. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis, se requiere la realización de bioensayos de atracción de individuos adultos de *S. aloeus*. Como se mencionó previamente, en el marco del macroproyecto que contiene la presente investigación, Arias (2019) realizó una evaluación preliminar de la atracción de estas cetonas hacia el escarabajo-plaga de la palma de aceite empleando un olfatómetro en “Y” y los compuestos puros. A pesar de que se evidenció la atracción de ambos sexos de *S. aloeus* hacia ambos compuestos, no se obtuvieron resultados significativos. Lo anterior podría explicarse por el hecho de que la concentración es uno de los factores que afecta la respuesta de los insectos frente a un VOC.⁹⁷ Por lo anterior, sería conveniente realizar dichas evaluaciones con los VOCs a distintas concentraciones y en mezcla con las potenciales feromonas.

▪ **Caracterización de los VOCs del estípite de la palma de aceite menor de 2 años**

A continuación, se resumen los resultados de la caracterización de los VOCs liberados por muestras de estípite de palma de aceite *Elaeis guineensis* menores de 2 años (**Tabla 2-3**), extraídos mediante las metodologías de extracción HS-MEFS y HSD. Teniendo en cuenta que, tal y como se mencionó anteriormente (**Sección 2.2.2.**), para ambas metodologías, cada extracción se realizó para dos muestras vegetales por triplicado, se contaban con resultados de la caracterización del perfil de volátiles de seis trozos de estípites menores de 2 años. En la

siguiente tabla se presentan los VOCs que fueron detectados en al menos 3 muestras de estípite y las cantidades relativas presentadas corresponden al promedio de tres determinaciones.

Tabla 2-3. Cantidades relativas de los VOCs detectados en el estípite de palma de aceite *Elaeis guineensis* menores de 2 años.

(IR= Índice de retención; **Std**= identificado con base en el índice de retención y espectro de masas de un patrón de referencia; **EM**= detectado y propuesto de acuerdo con el índice de retención y el espectro de masas reportado en literatura; Cantidades relativas calculadas a partir del área del pico (%) y promedio de tres determinaciones: + < 1%, 1% < ++ < 5%, 5% < +++ < 10%, 10% < ++++ < 20%, 20% < +++++, - = No detectado; ND: no detectable mediante la técnica analítica empleada; *= reportados previamente como cairomonas o atrayentes para escarabajos)

No	Compuestos	IR _{exp.} (TG-1)	IR _{lit.} (X-1)	Fuente	VOCs (Método de extracción/Material adsorbente)	
					HSD	HS-MEFS
					ORBO-32	DVB/CAR/PDMS
1	2-Butanona*	573	582	Std	ND	++
2	3-Pentanona	665	672	Std	ND	+
3	Isopentanol	724	727	Std	+	-
4	Isobutanoato de etilo*	739	738	Std	+++++	++
5	Metacrilato de etilo	767	775	Std	+	-
6	Hexanal	771	773	Std	-	++
7	Butanoato de etilo*	782	789	Std	++++	++
8	2-metilbutanoato de etilo*	838	841	Std	+++	++
9	Isovalerato de etilo	840	845	Std	+	+
10	Etilbenceno	842	844	Std	-	++
11	<i>p</i> -Xileno	851	859	Std	-	+++
12	4-Metiloctano	858	868	EM	-	++
13	Acetato de isopentilo	862	862	Std	++++	++
14	Estireno	874	873	Std	-	+++
15	<i>m</i> -Xileno	875	858	Std	-	++
16	Cumeno	910	911	Std	-	++
17	α -Pirino*	922	933	Std	++	-
18	2,6-Dimetiloctano	928	937	EM	++	+
19	<i>o</i>-Etiltolueno	944	964	Std	++	++
20	Mesitileno	949	955	Std	+	++
21	Sabineno	956	967	Std	++	-
22	4-Metilnonano	958	967	Std	++	+
23	Hemimelliteno	975	999	Std	++	++
24	α -Deceno	985	988	Std	-	+
25	2-Careno	1002	1001	Std	++	-
26	<i>p</i> -Cimeno	1005	1010	Std	++	-
27	D-Limoneno	1019	1022	Std	-	++
28	2-Etil- <i>p</i> -xileno	1041	1064	Std	-	+
29	Decahidronaftaleno	1042	1054	Std	-	+
30	2-Metildecano	1055	1067	EM	++	-
31	1-Undeceno	1085	1087	Std	-	++
32	Dureno	1132	1126	Std	-	+
33	Naftaleno	1156	1151	Std	-	++
34	2,2,4,4,6,8,8-Heptametilnonano	1334	1323	Std	++	+++
35	Junipeno	1397	1409	Std	++	+

36	Cipereno	1423	1416	EM	-	++
37	β-Cariofileno	1433	1428	Std	++	++
38	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1438	1434	EM	++	-
39	Humuleno	1453	1446	Std	++	-
40	Aromandendreno	1461	1455	EM	++	++
41	Curcumeno	1471	1469	EM	++	-
42	α -Muuroleno	1478	1488	EM	++	-
43	(+)-Valenceno	1481	1474	Std	++	-
44	δ -Cadineno	1498	1512	Std	-	+
45	Éter caprílico	1651	1657	Std	++	-

Estos resultados muestran que se lograron identificar inequívocamente 37 VOCs por comparación con sus patrones de referencia e identificar tentativamente 8 VOCs, a partir de la comparación de los índices de retención y de los espectros de masas de asignaciones suministradas por la base de datos con un porcentaje de similitud superior al 90%.

La composición de los VOCs detectados para las muestras de estípite de *Elaeis guineensis* menores de 2 años se caracteriza por la presencia de alcanos, alquenos, cetonas, un éter y un aldehído, compuestos de tipo mono y sesquiterpenos. La mayoría de estos tipos de compuestos son característicos de las plantas.^{147,148} No obstante, no todos los compuestos identificados han sido reportados en organismos vegetales. De hecho, hasta donde se conoce, los siguientes VOCs identificados en el estípite de la palma de aceite no han sido previamente reportados en plantas: 4-metiloctano, 2,6-dimetiloctano, el éter caprílico, el decahidronaftaleno, el 2-careno, el durenio y el 2-etil-*p*-xileno.¹³¹

De los 45 VOCs detectados en los trozos de estípite (**Tabla 2-3**), el hexanal, *m*-xileno, hemimelliteno, D-limoneno y naftaleno, detectados en los extractos de HS-MEFS, habían sido reportados previamente en la caracterización del estípite de la palma de aceite realizada por Zainol Hilmi *et al.* (2019) al evaluar los VOCs liberados por el estípite no infestado por *Ganoderma boninense* empleando la misma metodología de extracción y la misma fibra (DVB/CAR/PDMS).¹¹⁷

- **Comparación de las metodologías de extracción empleadas.**

Al comparar las dos metodologías de extracción evaluadas para la caracterización del perfil de volátiles de muestras de estípite de palma de aceite *E. guineensis* menores de 2 años, a saber, HS-MEFS y HSD -empleando una fibra de DVB/CAR/PDMS y ORBO-32 como materiales adsorbentes-, se evidenció la complementariedad de las dos metodologías (**Tabla 2-3**). Por un lado, se detectaron 18 VOCs liberados por el estípite de palmas de *Elaeis guineensis* menores de 2 años exclusivamente mediante la metodología de HS-MEFS y 13 VOCs exclusivamente mediante la metodología de HSD. Los 14 VOCs señalados en **negrilla (Tabla 2-3)** fueron comunes para ambas metodologías de extracción.

En dicha comparación, se detectó e identificó tentativamente una mayor cantidad de VOCs para los extractos obtenidos mediante la metodología de extracción por HS-MEFS que para los extractos obtenidos por HSD -empleando hexano como solvente de extracción-. Esto puede deberse a que la extracción mediante HS-MEFS se basa en la adsorción de VOCs sobre una fibra inerte y su posterior desorción al interior de un cromatógrafo de gases para su análisis.⁴⁷ Lo anterior significa que, para esta metodología, se elimina la coelución de VOCs con el solvente y, adicionalmente permite realizar una adquisición de datos por parte del detector de masas desde el tiempo 0, sin poner en riesgo los filamentos del detector. Por el contrario, para las

muestras en solución obtenidas por la extracción con HSD con hexano, se requiere de un tiempo de retraso de adquisición de datos por la presencia del solvente de 3 minutos y existe una coelución de VOCs con el solvente de extracción y posibles pérdidas de VOCs durante la concentración de los extractos. Lo anterior explica la detección e identificación tentativa de la 2-butanona y la 3-pentanona que presentan un tiempo de retención menor a 3 minutos, para las cuales se indicó N.D. en los extractos obtenidos mediante HSD.

Adicionalmente, tal y como se señala en las características de los materiales adsorbentes empleados en este capítulo (**Tabla 2-4**), la fibra triple empleada en HS-MEFS permite detectar una mayor cantidad de VOCs, posiblemente debido a que permite la extracción de compuestos que pueden encontrarse en el sistema en muy bajas concentraciones.

Tabla 2-4. Características de adsorción de los materiales adsorbentes empleados para la caracterización de VOCs liberados por el estípite de *Elaeis guineensis*.^{43,149}

Adsorbente	Composición	Metodología de extracción	Tamaño de partícula (malla)	Rango aproximado de muestreo de analitos	Características
ORBO-32	Carbón de coco activado	HSD	20/40	C ₅ a C ₂₀	-Amplia gama de VOCs cetonas, alcoholes, aldehídos (P.Eb.> 75 °C), compuestos apolares.
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenceno/ Carboxeno/ Polidimetilsiloxano	HS-MEFS	N.A.	volátiles y semi-volátiles C ₃ a C ₂₀ PM 40-275	-Adsorbente bipolar para VOCs a nivel de trazas. -Recomendado para analitos de bajo peso molecular (PM <90).

Ahora, teniendo en cuenta las composiciones de los adsorbentes, al emplear en HS-MEFS una fibra triple DVB/CAR/PDMS, la captura de un amplio rango de tipo de compuestos orgánicos volátiles puede verse favorecida por las características distintas y complementarias de los materiales de recubrimiento. Este puede ser el caso del α -deceno, decahidronaftaleno, dureno y δ -cadineno, los cuales, para la HS-MEFS presentan una cantidad relativa inferior al 1%.

Vale la pena señalar que, si bien no se observa un patrón entre los tipos de VOCs detectados que permita definir una relación entre estos y los materiales adsorbentes en términos de afinidad por sus estructuras químicas, se puede sugerir que los VOCs extraídos mediante ambas metodologías, pueden estar presentando una mayor afinidad por los adsorbentes a base de carbono como los tubos de ORBO-32 empleados en el HSD y la fase de carboxeno presente en la fibra triple empleada en el HS-MEFS.¹⁵⁰ Este puede ser el caso de los ésteres que fueron extraídos para ambas metodologías, los cuales -a excepción del metacrilato de etilo- fueron detectados por ambas metodologías de extracción.

Finalmente, la detección de ciertos VOCs únicamente mediante HSD puede deberse al mayor tiempo empleado para las extracciones realizadas por dicha metodología o a la posible saturación de las fibras de HS-MEFS que no permitieron su adsorción al ser liberados por la muestra vegetal al espacio de cabeza evaluado.

De acuerdo con lo anterior, la extracción, detección e identificación tentativa exclusiva de ciertos compuestos por un tipo de metodología de extracción y/o material adsorbente justifica que, con el fin de obtener un amplio espectro de VOCs caracterizados en muestras naturales, es importante emplear, de manera complementaria tanto diferentes técnicas de extracción de VOCs como diferentes materiales adsorbentes y solventes de extracción. De hecho, vale la pena

resaltar que, en la presente caracterización de los VOCs liberados por las muestras de estípites de *E. guineensis* menores de 2 años, tal y como se mencionó previamente, para las muestras en solución obtenidas por HSD se empleó únicamente un solvente apolar de extracción -hexano-.

2.3.2 Efecto de la infestación de *S. aloeus* en el perfil de volátiles de la palma de aceite

Para la palma infestada con machos de *S. aloeus*, se observa que los individuos de *S. aloeus* construyeron galerías, destruyeron totalmente el bulbo del estípite de la palma de aceite, probablemente consumiéndolo durante la infestación de 2 meses (**Figura 2-7**).



Figura 2-6. Evidencias de la infestación a) de la palma joven y consumo total del bulbo b) por individuos machos de *S. aloeus* procedentes de campo después de 2 meses. Foto: Dra. A. Romero-Frías.

Se identificaron 17 VOCs en total entre los VOCs liberados por una palma *Elaeis guineensis* menor de 2 años sana (blanco) y una palma semejante infestada con individuos machos adultos de *Strategus aloeus* (**Tabla 2-5**).

Tabla 2-5. VOCs detectados en palmas de aceite *Elaeis guineensis* menor de 2 años sana (S) e infestada (I).

(**IR**= Índice de retención; **Std**= identificado con base en el índice de retención y espectro de masas de un patrón de referencia; **EM**= detectado y propuesto de acuerdo con el índice de retención y el espectro de masas reportado en literatura; Cantidades relativas calculadas a partir del área del pico (%): + < 1%, 1% < ++ < 5%, 5% < +++ < 10%, 10% < ++++ < 20%, 20% < +++++, - = No detectado; *= reportados previamente como caironomas o atrayentes para escarabajos)

No.	Compuesto	IR _{exp.} (TG-1)	IR _{lit.} (X-1)	Fuente	VOCs extraídos por HSD (Estado de la palma evaluada y material adsorbente empleado)			
					Sana		Infestada	
					ORBO-32	Porapak®	ORBO-32	Porapak®
1	Acetato de <i>sec</i> -butilo*	738	738	Std	-	-	++	+++
2	3-Hexanona	756	765	Std	++++	++	-	++
3	2-Hexanona	759	761	Std	+++++	++	-	++
4	Etilbenceno	843	844	Std	+++	++	+	++
5	<i>p</i> -Xileno	852	859	Std	++++	++	+	++
6	Isononano	864	866	Std	++	+	++	++
7	<i>o</i> -Xileno	875	876	Std	-	+	+	++
8	<i>m</i> -Etiltolueno	947	943	Std	++	+	-	++
9	3-Metilnonano	972	973	Std	++	+	+	+
10	Hemimelliteno	978	999	Std	++	++	+	++
11	Eucaliptol	1016	1019	Std	++	+	+	+
12	D-Limoneno	1018	1022	Std	+++	-	++	-
13	<i>p</i> -Dietilbenceno	1034	1036	Std	-	++	+	++
14	<i>o</i> -Dietilbenceno	1040	1041	Std	-	++	+	++
15	<i>m</i> -Etilestireno	1067	1074	Std	-	++	-	++
16	<i>p</i> -Etilestireno	1074	1072	Std	-	+	-	++
17	Hexacosano	2599	2600	Std	++++	-	-	-

De los anteriores VOCs, vale la pena resaltar que únicamente el *m*-etiltolueno y el *m*-etilestireno no han sido reportados previamente en plantas. Sin embargo, el *m*-etiltolueno si ha sido reportado previamente como VOC producido por varias especies de hongos del género *Fusarium* que puede tener como hospedera la palma de aceite.¹⁵¹ Los resultados obtenidos indican que para el caso de la palma de aceite *Elaeis guineensis* menor de 2 años, que ha sido atacada por *Strategus aloeus*, el perfil de VOCs liberados por el sistema variaron en su cantidad con respecto a la palma sana. A continuación, se señalan los principales cambios observados entre los VOCs detectados en la palma infestada respecto a la sana:

- Aumentó la cantidad de isononano, *o*-xileno, *p*-dietilbenceno, *o*-dietilbenceno y *p*-etilestireno en la palma infestada con machos de *Strategus aloeus* procedentes de campo.
- Disminuyó la cantidad de 3-hexanona, 2-hexanona, etilbenceno, *p*-xileno, 3-metilnonano, hemimelliteno, eucaliptol, D-limoneno y hexacosano en la palma infestada.

No obstante, no se logra evidenciar ni establecer una tendencia clara de la variación de los VOCs detectados en el perfil de volátiles de la palma infestada con respecto a la palma sana (**Tabla 2-5**). Sin embargo, de acuerdo con lo reportado en literatura con respecto a las alteraciones y efectos producidos en la liberación de VOCs en plantas atacadas por insectos, es posible sugerir la variación cuantitativa señalada anteriormente para ciertos VOCs entre la palma infestada y la palma sana, puede ser atribuida a la presencia de los insectos que atacaron el bulbo del estípite de la palma joven.²⁵ De hecho, en ecología química son bien conocidos los compuestos volátiles de plantas inducidos por la herbivoría (HIPV, *Herbivore-Induced Plant Volatiles*, por sus siglas en inglés) que son mezclas de volátiles, principalmente volátiles de hojas verdes (GLVs, *Green Leaf Volatiles*, por sus siglas en inglés), terpenos y compuestos aromáticos, producidos por las plantas después de sufrir daños en sus tejidos.¹⁵² El daño producido por el *S. aloeus* a la palma de aceite joven sembrada podría estar entonces afectando las rutas biosintéticas de los derivados de ácidos grasos, mediante las cuales se producen los GLV, y explicar la variación de isononano, 3-hexanona, 2-hexanona, 3-metilnonano y hexacosano. Además, tal y como se ha reportado para distintas especies vegetales, tras daños producidos por herbívoros y como mecanismo de defensa química, el ataque de *S. aloeus* también podría estar afectando la ruta alterna del ácido acético que conlleva a la formación de los terpenos y así, justificar la disminución en la producción del *p*-xileno, eucaliptol y D-limoneno en la palma infestada.¹⁵³⁻¹⁵⁵

Adicionalmente, es importante resaltar que se identificó la presencia del acetato de *sec*-butilo (señalado en **negrilla**) en la palma infestada por machos de *S. aloeus*, ausente en la palma sana. Este VOC es de particular interés, teniendo en cuenta que corresponde al único compuesto reportado por Rochat *et al.* (2000) como constituyente de la feromona de agregación macho-específica de la especie *Strategus aloeus* que, a diferencia de los otros dos componentes reportados por dichos autores, no fue detectado en el perfil de volátiles del estípite de *Elaeis guineensis*. Las condiciones experimentales empleadas no permitieron establecer si la procedencia de dicho compuesto era de la palma infestada o producido por los insectos presentes en el sistema bajo estudio.

2.3.3 Perfil de volátiles de los sistemas 1 y 2

En primer lugar, únicamente el *p*-xileno, el hemimelliteno y el D-limoneno, fueron detectados tanto para los estípites menores de 2 años como para la palma infestada (**Tablas 2-3 y 2-5**). De estos, el D-limoneno ha sido previamente reportado como semioquímico para distintas especies de coleópteros,¹³¹ por ejemplo como cairomona de para el coleóptero *Dastarcus helophoroides*.¹⁵⁶

Como se mencionó previamente, a excepción del 4-metiloctanoato, 2,6-dimetiloctano, éter caprílico, decahidronaftaleno, *m*-metiltolueno y *m*-metilestireno, los demás VOCs identificados han sido reportados previamente en el aroma de plantas. Los terpenos D-limoneno y el α -pineno, y el bencenoide β -cariofileno corresponden a algunos de los VOCs más comunes encontrados en plantas con potenciales funciones atrayentes en insectos polinizadores.¹⁰²

Por otro lado, entre los VOCs detectados en el perfil de volátiles de muestras de estípite de *Elaeis guineensis* menores de 2 años y en el perfil de volátiles de la palma *E. guineensis* sembradas, varios han sido reportados previamente en el aroma floral de distintas especies de plantas pertenecientes a la familia Arecaceae, comúnmente conocida como la familia de las palmas (**Tabla 2-6**).^{106,107,110,146,157} Los compuestos en **negrilla** fueron reportados para especies pertenecientes al género de palmas *Bactris*, el cual es uno de los géneros representativos en Colombia que pertenece a la tribu *Cocoeae* a la cual también pertenece la palma de aceite *Elaeis guineensis*.

Tabla 2-6. VOCs caracterizados en el estípite de *Elaeis guineensis* previamente reportados para palmas de géneros pertenecientes a la familia Arecaceae.

(*=reportados previamente como cairomonas o atrayentes para escarabajos)

No.	Compuestos	Géneros de palmas	Referencias
1	3-Pentanona	Aiphanes; Bactris ; Ceroxylon; Chamaedorea; Chlyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Prestoea; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2001) ¹⁰⁷ Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
2	Isopentanol	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Nypa; Pholidostachys; Welfia	Knudsen <i>et al.</i> (2006)
3	3-Hexanona	Aiphanes; Bactris ; Calyptrogyne; Ceroxulon; Chamaedorea; Chelyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Prestoea; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2001) ¹⁰⁷ Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
4	Hexanal	Aiphanes; Ammandra; Aphandra; Bactris; Ceroxylon; Chamaedorea; Chelyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Phytelephas; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2001) ¹⁰⁷ Ervik <i>et al.</i> (1999) ¹⁰⁶ Azuma <i>et al.</i> (2002) ¹⁵⁷ Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
5	Butanoato de etilo	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Pholidostachys; Welfia	Azuma <i>et al.</i> (2002) ¹⁵⁷ Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
6	2-Metilbutanoato de etilo	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Pholidostachys; Welfia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²

7	α -Pineno*	Aiphanes; Asterogyne; Bactris ; Calyptrogyne; Ceroxylon; Chamaedorea; Chelyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Pholidostachys; Prestoea; Welfia; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2001) ¹⁰⁷ Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
8	Acetato de isopentilo	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Pholidostachys; Welfia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
9	Estireno	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Pholidostachys; Welfia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
10	<i>p</i> -Cimeno	Aiphanes; Bactris ; Ceroxylon; Chamaedorea; Chelyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Prestoea; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2001) ¹⁰⁷
11	Eucaliptol	Aiphanes; Ammandra; Aphandra; Asterogyne; Bactris ; Calyptrogyne; Ceroxylon; Chamaedorea; Chelyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Pholidostachys; Phytelephas; Prestoea; Welfia; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
12	Cipereno	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Pholidostachys; Welfia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
13	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	Asterogyne; Calyptrogyne; Geonoma; Pholidostachys; Welfia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²
14	δ -Cadineno	Aiphanes; Ammandra; Aphandra; Bactris ; Ceroxylon; Chamaedorea; Chelyocarpus; Geonoma; Iriarte; Mauritia; Phytelephas; Prestoea; Wettinia	Knudsen <i>et al.</i> (2006) ¹⁰²

Ahora, de los VOCs detectados en la caracterización del perfil de volátiles de *E. guineensis* menores a 2 años, bien sea de las muestras de estípite o de la palma sembrada, los siguientes compuestos han sido reportados previamente como semioquímicos de distintas especies de coleópteros: 2-hexanona, isovalerato de etilo, etilbenceno, 2-careno, *p*-cimeno, junipeno y *trans*- α -bergamoteno.¹³¹

Particularmente, se conoce que las familias Anobiidae, Anthribidae, Aphodiidae, Chrysomelidae, Geotrupidae, Nitidulidae, Phytidae, Scarabaeidae, Silphidae, Staphylinidae y Tenebrionidae presentan entre sus regímenes alimentarios el consumo de raíces, troncos y materiales vegetales en descomposición y por lo tanto son consideradas como rizófagas y/o saprófagas. Ahora, si bien se ha definido que el escarabajo rinoceronte, plaga de la palma de aceite, *Strategus aloeus*, es rizófago por alimentarse de raíces y del estípite de palmas jóvenes,^{94,158} en estudios de su dinámica de reproducción y observaciones en la manutención de dicho insecto se ha evidenciado que tanto adultos como larvas también se alimentan de residuos de estípites en descomposición.^{96,159} Por lo anterior, considerando el régimen alimentario de *S. aloeus* como rizófago y saprófago y, teniendo en cuenta que los VOCs presentados a continuación han sido previamente reportados como atrayentes o cairomonas para diferentes especies pertenecientes a las familias anteriores, se sugiere que los siguientes VOCs, también pueden presentar dicha actividad biológica en el comportamiento de la especie bajo estudio. Específicamente, se propone que los compuestos 2-butanona*,^{26,119,139} 3-pentanona, isopentanol, isobutanoato de etilo*,¹⁶⁰ hexanal, butanoato de etilo*,¹⁶⁰ 2-metilbutanoato de etilo*,¹⁶⁰ acetato de isopentilo, α -pineno*,¹⁶¹ α -deceno, D-limoneno, 1-undeceno, ácido *n*-caprílico, β -cariofileno, δ -cadineno, eucaliptol, y hexacosano., al haber sido reportados como atrayentes o cairomonas, pueden estar jugando un rol en la señalización e identificación del alimento y hospedero, que realiza el *S. aloeus*.¹³¹

Se ha establecido que existe una relación estrecha entre los metabolitos constituyentes de las feromonas de agregación de curculiónidos y su origen taxonómico.¹⁶² lo que ha mostrado que especies pertenecientes a las mismas subfamilias comparten bien sea compuestos con

semejanzas estructurales o ciertos compuestos iguales como constituyentes de sus respectivas feromonas de agregación. Por su parte, para la familia Scarabaeidae, en el marco del macroproyecto de esta investigación, Rodríguez (2019) logró establecer que las características estructurales de los componentes de los semioquímicos en general y no únicamente de las feromonas reportados para dicha familia, son consistentes dentro de las tribus de las subfamilias.⁹⁵ De acuerdo con lo anterior, podría esperarse que especies pertenecientes a la misma familia puedan compartir VOCs atrayentes producidos por sus respectivos hospederos. Teniendo en cuenta esto, los compuestos orgánicos volátiles señalados en las tablas y en la lista anterior con un asterisco (*), han sido reportados para la familia Scarabaeidae a la cual pertenece el insecto-plaga de interés y, por tanto, pueden ser potenciales semioquímicos en la interacción *E. guineensis*- *S. aloeus*. Sin embargo, con el fin de confirmar la hipótesis anterior, se requieren estudios adicionales como bioensayos de atracción de estos VOCs frente a individuos adultos de ambos sexos de *Strategus aloeus*.

Comparando el número de VOCs identificados (**Tablas 2-3 y 2-5**) es evidente que el sistema 1 presenta una mayor cantidad de VOCs que el sistema 2. Lo anterior puede deberse a que para el sistema 2, al tener una palma sembrada, muchos VOCs liberados por la misma pueden ser retenidos en el suelo, y las cantidades extraídas no son detectables analíticamente. Por otra parte, tal y como se mencionó, para el sistema 1 se emplearon trozos de estípite de *E. guineensis*. Lo que implica que el estípite analizado fue mecánicamente afectado para obtener la muestra y al afectar los tejidos vegetales, el sistema es sometido a un mayor estrés y por tanto es posible que se genere una mayor cantidad de VOCs.¹⁴⁷ Esto es evidente con la presencia de compuestos típicos de los perfiles volátiles de plantas con daños físicos como el hexanal que corresponde a uno aldehídos C₆ conocido entre los GLVs,¹⁰¹ el β -cariofileno y el α -pineno son terpenos que han sido reportados como HIPVs producidos bajo suelo por las raíces de distintas especies de plantas después de ser afectadas.¹⁴⁷ Adicional al daño mecánico producido al estípite para el sistema 1, vale la pena señalar que durante las extracciones de los VOCs realizadas para este sistema, las muestras vegetales siguieron un proceso de descomposición que justifica además la liberación de una mayor cantidad de volátiles.¹⁶³ Si bien en investigaciones previas se ha señalado que es difícil determinar si los volátiles asociados con los materiales vegetales muertos o en descomposición surgen directamente de las células de las plantas o si son producidos por microorganismos que utilizan los materiales vegetales como energía y fuentes de carbono, se ha evidenciado que el proceso de descomposición de la materia vegetal se refleja en la composición química de volátiles producidos por las plantas en este estado. Por ejemplo, los siguientes compuestos identificados en el sistema 1 han sido previamente reportados para plantas en descomposición: isopentanol, isobutanoato de etilo, butanoato de etilo, etilbenceno, *p*-xileno y *m*-xileno.¹⁶⁴ Asimismo, se ha reportado también que los compuestos como el isobutanoato de etilo, el butanoato de etilo y 2-metilbutanoato de etilo corresponden a compuestos asociados a la fermentación de tejidos vegetales que han demostrado ser atrayentes para el coleóptero *Rhynchophorus ferrudineus* que generan un efecto sinérgico en la atracción de su feromona de agregación empleada para su captura en trampas cebadas.^{165 165}

2.4 Conclusiones

- Por primera vez se caracterizó el perfil de volátiles del estípite de la palma de aceite *Elaeis guineensis*, hospedero y alimento del escarabajo-plaga *Strategus aloeus*. Se identificaron inequívocamente la 2-butanona y la 3-pentanona como componentes del perfil de volátiles emanado por *E. guineensis*. Teniendo en cuenta que estos compuestos fueron reportados

previamente por Rochat *et al.* (2000)²⁶ como componentes de la feromona del *Strategus aloeus*, su detección en el alimento y hospedero de este insecto-plaga, sugiere que podrían desempeñar un posible rol como cairomona en la interacción planta-insecto.

- Se identificó al D-limoneno tanto en el perfil volátil de muestras de estípites, como para las palmas sana e infestada sembradas. Este VOC ha sido reportado previamente como atrayente para varias especies de coleópteros, lo que podría indicar que este VOC participa en la interacción planta-insecto.
 - En el perfil de volátiles del estípite de la palma de aceite se identificaron los siguientes VOCs que han sido reportados previamente como atrayentes o cairomonas para distintas especies de escarabajos: 2-butanona, isobutanoato de etilo, butanoato de etilo, 2-metilbutanoato de etilo y α -pineno. Por lo tanto, estos VOCs y principalmente los ésteres mencionados, podrían ser potenciales compuestos liberados por el estípite de la palma de aceite, actuando como atrayentes para el *Strategus aloeus*, y podrían presentar un alto efecto sinérgico en la atracción con los constituyentes de su feromona. No obstante, se requieren otros estudios para confirmar su función.
 - La identificación exclusiva del acetato de *sec*-butilo en la palma *Elaeis guineensis* infestada por machos de *S. aloeus*, sugiere que este compuesto podría desempeñar un papel determinante en la interacción planta-insecto.
-

3. Identificación de los VOCs liberados por insectos adultos de *Strategus aloeus*

El escarabajo rinoceronte o torito, *Strategus aloeus*, es una de las principales plagas de importancia económica en los cultivos de palma de aceite a nivel nacional (**Figura 3-1**).¹⁶ Desde hace 2 décadas se ha buscado implementar el control etológico para el *S. aloeus*. En el marco de la investigación para esta táctica de control, este capítulo busca aportar en la caracterización de los VOCs liberados por individuos de *S. aloeus* y aquellos VOCs propuestos como posibles componentes de su feromona. Para tal fin, inicialmente se presentan algunos ejemplos de feromonas de escarabajos plaga y casos exitosos de control etológico de estos. Enseguida, se presentan la metodología y resultados obtenidos.



Figura 3-1. Individuos de *Strategus aloeus* procedentes de campo. Izquierda: Macho, Derecha: Hembra. Fotografía: V. Vidal-Medina.

3.1 Antecedentes

Los escarabajos son el grupo de animales más grande del mundo, representando una quinta parte de todos los organismos vivos conocidos y una cuarta parte de todos los animales. La gran diversidad biológica de este orden de insectos se refleja en la diversidad estructural de las feromonas de agregación y sexo producidas por estos insectos.¹⁶⁶ Las estructuras químicas que actúan como feromonas para coleópteros van desde cadenas acíclicas (no ramificadas, ramificadas y/o funcionalizadas) hasta lactonas, macrólidos (de origen de ácidos grasos), compuestos aromáticos monocíclicos (generalmente de origen aminoácido), y heterociclos de oxígeno bicíclicos (con origen de ácidos grasos o isoprenoide).¹⁶⁷

Los coleópteros pueden producir los compuestos de sus feromonas mediante las siguientes formas principales: 1) biosíntesis *de novo*; 2) modificación estructural de los compuestos de su hospedero alimenticio; y/o, 3) secuestro de compuestos de su hospedero.¹⁶⁸

Se señala que las clases de feromonas de coleópteros sugeridas por su biosíntesis *de novo* corresponden a las feromonas tipo isoprenoide y a aquellas derivadas de ácidos grasos.^{166,169} Por su parte, la biosíntesis de feromonas derivadas de terpenos mediante la modificación de compuestos de su hospedero se ha estudiado predominantemente en escolítidos y cucujidos.^{166,169} En los coleópteros, el secuestro de compuestos de su hospedero para su posterior uso como feromonas en su forma no modificada es poco común.¹⁶⁷ De hecho, como se señaló, dado que la producción de feromonas a menudo se asocia con la alimentación, experimentalmente es difícil distinguir entre los compuestos del huésped liberados por los alimentos masticados o las heces, y los que son secuestrados por los insectos y liberados más tarde. Como ejemplos del secuestro de compuestos de su hospedero se ha sugerido que *Dendroctonus pseudotsugae* obtiene y secuestra el limoneno de la oleorresina del abeto *Pseudotsuga menziesii* durante su alimentación. Ambos sexos liberan dicho monoterpeneo con sus respectivos componentes de feromonas de agregación. Sin embargo, vale la pena resaltar que se ha sugerido que el limoneno funciona como un compuesto sinergista para provocar un ataque masivo de su hospedero y no como un constituyente de la feromona de la especie invasora.¹⁶⁶

Para la mayoría de coleópteros pertenecientes a las familias Scarabaeidae y Anobiidae se ha reportado que las feromonas se producen en el abdomen, en glándulas definidas, o a través de grupos de células que no pueden formar glándulas pero que se encuentran en ubicaciones anatómicas definidas.^{56,166,169,170} Adicionalmente, se han reportado otras ubicaciones anatómicas menos comunes para ciertas especies. Por ejemplo, el estafilínido *Batrisodius oculus* tiene sus glándulas productoras de feromonas putativas en las antenas,¹⁷¹ el gorgojo *Tribolium castaneum* en las extremidades anteriores,¹⁷² y el cerambícido *Xylotrechus pyrrhoderus* en su protórax.¹⁷³

Varios factores ambientales y mecanismos fisiológicos pueden gobernar la liberación de las feromonas. Entre los anteriores, se incluyen el ritmo circadiano, la temperatura, la presencia de fuentes de alimentos y la edad de los insectos.²⁵ Adicionalmente, la alimentación, la madurez sexual y la densidad poblacional también pueden ser factores de gran importancia en la liberación de las feromonas en coleópteros.^{166,169}

3.1.1 Feromonas de escarabajos

Para los escarabideos, coleópteros pertenecientes a la familia Scarabaeidae, la mayor parte de las investigaciones en ecología química se ha centrado en las subfamilias Cetoniinae, Melolonthinae, Dynastinae y Rutelinae debido a su importancia económica como plagas agrícolas. Así, se han reportado feromonas sexuales sólo para especies de las subfamilias Rutelinae y Melolonthinae y feromonas de agregación para especies pertenecientes a la subfamilia Dynastinae a la cual pertenece el *S. aloeus*, insecto-plaga de interés en la presente investigación.¹²⁴

Por un lado, las feromonas sexuales, generalmente producidas por hembras de varias especies, que han sido identificadas incluyen una amplia variedad de estructuras derivadas de ácidos grasos y derivados de isoprenoides y aminoácidos.^{53,174-176} En el caso de los melolóntinos (familia Melolontidae), las feromonas sexuales corresponden principalmente a compuestos

derivados de aminoácidos y terpenoides. Una de estas es, por ejemplo, la feromona sexual identificada en las glándulas abdominales de *Holotrichia parallela* identificada como L-iso-leucina metil éster o el anisol identificado para *Holotrichia consanguinea*. Para esta última se evidenció una atracción hacia ambos sexos, sugiriendo su posible papel como feromona de agregación. Sin embargo, los despliegues comportamentales derivados de la exposición de la feromona eran sexuales.

En el caso de las especies de escarabajos pertenecientes a la subfamilia Rutelinae, también se han reportado feromonas sexuales, hembra específicas, constituidas por derivados de ácidos grasos. El ejemplo más importante y exitoso para esta subfamilia corresponde al (*R*)-japonilure para *Popillia japonica*, que demostró la selectividad enantiomérica ya que el enantiómero (*S*) redujo la atracción de los machos conespecíficos. Para *Anomala rufocuprea* se identificó como componente mayoritario el 5-(*Z*)-tetradecenoato de metilo.

Para la subfamilia Cetoniinae se ha reportado la primera feromona sexual macho-específica correspondiente a la (*R*)- γ -decalactona para *Osmoderma eremita* constituida por el atrayente para hembras pero fisiológicamente activa para ambos sexos.¹⁷⁷

Por otro lado, para la subfamilia Dynastinae, se han reportado feromonas de agregación macho-específicas para cuatro especies del género *Oryctes* (*O. monoceros*, *O. rhinoceros*, *O. agamemnon* y *O. elegans*).^{77,128,178-180} Estructuralmente, los constituyentes de estas feromonas corresponden a compuestos de cadenas cortas derivados de ácidos grasos. Los bioensayos de laboratorio de *O. rhinoceros* sugirieron que además de la feromona de agregación, constituida por el 4-metiloctanoato de etilo, el 4-metilheptanoato de etilo y el ácido 4-metiloctanoico, su comunicación química puede implicar también una feromona sexual producida por hembras, pero hasta el momento esta no ha sido aislada ni identificada.¹⁷⁸

En el marco del macroproyecto en el que se desarrolla esta investigación, Rodríguez (2019)⁹⁵ realizó una revisión actualizada de los 671 VOCs que median la comunicación química para 240 especies de la familia Scarabaeidae. Por medio de la clasificación y agrupamiento de la información recolectada, determinó los VOCs predominantes en cada subfamilia de escarabideos. Así como para la familia Curculionidae, para la cual se ha establecido que existe una relación estructural en concordancia con la taxonomía de las subfamilias Dryophthorinae y Entiminae,¹⁶² con esta revisión, Rodríguez señaló que, en el caso de la familia Scarabaeidae las características estructurales de los semioquímicos reportados son consistentes dentro de las tribus de cada una de las subfamilias.⁹⁵

Finalmente, para escarabajos pertenecientes a la subfamilia Dynastinae, se han reportado como constituyentes de las feromonas de agregación los siguientes ésteres, alcoholes y ácidos carboxílicos (**Figura 3-2**):

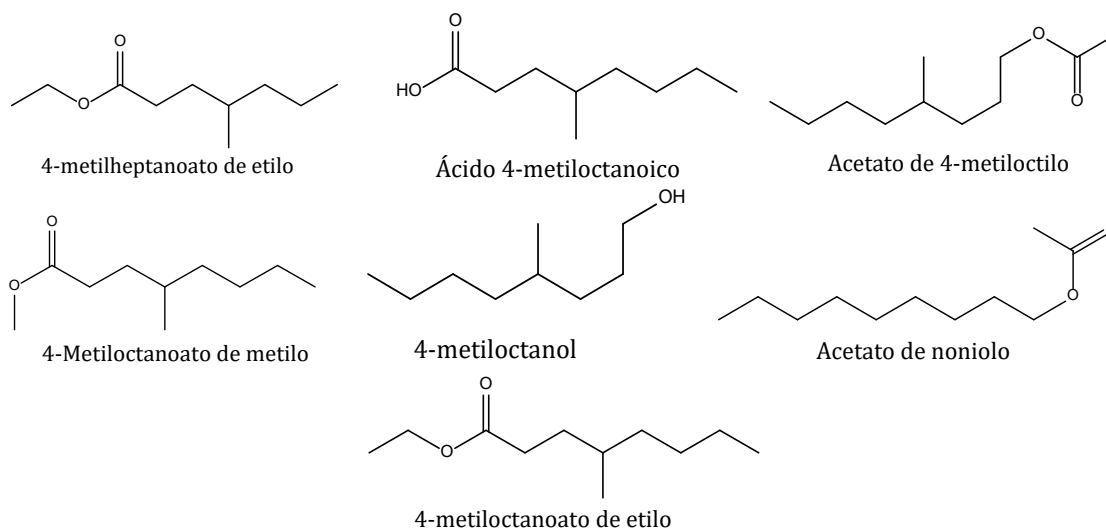


Figura 3-2. Estructuras químicas de los componentes identificados de feromonas de agregación de escarabajos de la subfamilia Dynastinae, tribu Oryctini.

3.1.2 Semioquímicos para el manejo de *Strategus aloeus* en cultivos de palma de aceite

Mediante la metodología de extracción por HS-MEFS (*Headspace* o espacio de cabeza estático mediante Micro Extracción en Fase Sólida) y de análisis, identificación y cuantificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y a ionización en llama (GC-FID), Rochat *et al.* (2000) detectaron, identificaron y cuantificaron la 2-butanona, la 3-pentanona y el acetato de *sec*-butilo en una proporción de 95,5:4,0:0,5, como los constituyentes de la feromona de agregación macho-específica de individuos de *S. aloeus*.²⁶

Debido a que con el uso en campo de los VOCs reportados por Rochat *et al.* (2000) como componentes de la feromona del *S. aloeus*, no se ha logrado obtener el efecto esperado de agregación en el manejo de esta plaga,²⁷ en este capítulo se presenta una nueva identificación de VOCs macho-específicos como potenciales componentes de la feromona del *S. aloeus* que sirvan como base para una propuesta de manejo del insecto-plaga en cultivos de palma de aceite.

3.2 Metodología

3.2.1 Obtención de los insectos

Se establecieron colonias con insectos adultos de *Strategus aloeus* procedentes de cultivos comerciales de palma de aceite y de cría. Los especímenes procedentes de campo, de edad y estado de apareamiento desconocidos, fueron colectados en las plantaciones comerciales de palma de aceite “Manuelita Aceites y Energía” localizadas en el municipio de San Carlos de Guaroa (Meta, Colombia)- coordenadas geográficas N3° 53' 4" W73°19' 41"- y del “Palmar del Oriente” localizadas en el municipio de Villanueva (Casanare, Colombia)-coordenadas geográficas N4°31'27,1" W72°51'20,9"-. La captura se realizó mediante excavaciones en galerías construidas por adultos en palmas ubicadas en los lotes jóvenes de renovación en los cuales se había evidenciado la presencia de la plaga.

Por su parte, los insectos de cría fueron obtenidos a través de la metodología desarrollada y estandarizada por el Centro de Investigación en Palma de Aceite (CENIPALMA) en el “Palmar de las Corocoras”, Campo Experimental de CENIPALMA de la zona Oriental, localizado en Cabuyaro, municipio de Paratebuena, (Cundinamarca, Colombia)- coordenadas geográficas N4°22'4,7" W73°10'19,4"- . La cría se estableció con ejemplares de la especie en diferentes estados de desarrollo (adultos recién emergidos, larvas de último instar y pupas), recolectados mediante inspección en estípites en descomposición en lotes de renovación de palma de aceite.

Las captura tanto de individuos adultos como de ejemplares en diferentes estados de desarrollo se realizó en cumplimiento del permiso de recolección otorgado por la ANLA a Cenipalma, Resolución 2431 de 2018 (**Anexo A**).

Los insectos adultos de ambas procedencias fueron trasladados hasta el Laboratorio de Investigaciones Básicas (LIB) de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, en donde, al llegar, se realizó el registro que incluyó las siguientes características: sexo, tamaño, edad, procedencia, alimento, fecha de captura (individuos de campo) o fecha de emergencia (individuos de cría), fecha de llegada a Bogotá, fecha de fallecimiento, tiempo de vida y duración en Bogotá.

Adicionalmente, los insectos adultos fueron diferenciados sexualmente, considerando las siguientes características de dimorfismo sexual descritas para esta especie: 1) presencia de tubérculos, cuernos o fosetas en la cabeza y en el pronoto (**Figura 3-3**); 2) margen lateral de los élitros femeninos sencillo; y, 3) forma y curvatura del pigidio (**Figura 3-4**). Además de las características anteriores, los adultos machos presentan un mayor tamaño (~5-6cm) que las hembras (~3-4cm) (**Figura 3-5**).⁸⁹

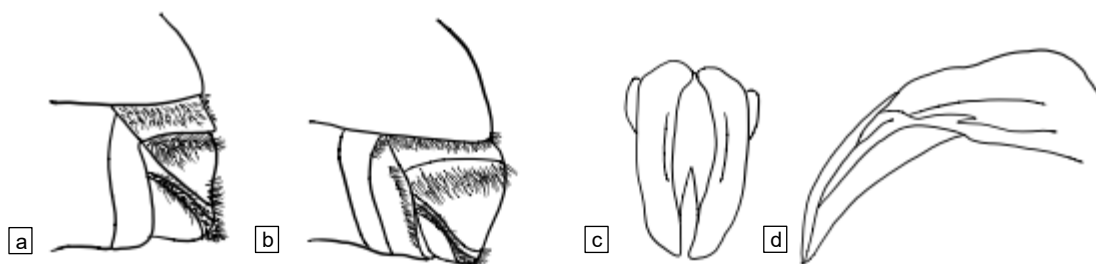


Figura 3-3. Características de dimorfismo sexual de *Strategus aloeus* (Scarabaeidae: Dynastinae: Oryctini) a) pigidio de hembra, b) pigidio de macho, c) vista frontal de parámetro de macho, d) vista lateral de parámetro de macho. Adaptado de Sanabria (2012).



Figura 3-4. Cabeza y pronoto de machos de *Strategus aloeus*. Adaptado de Sanabria (2012).

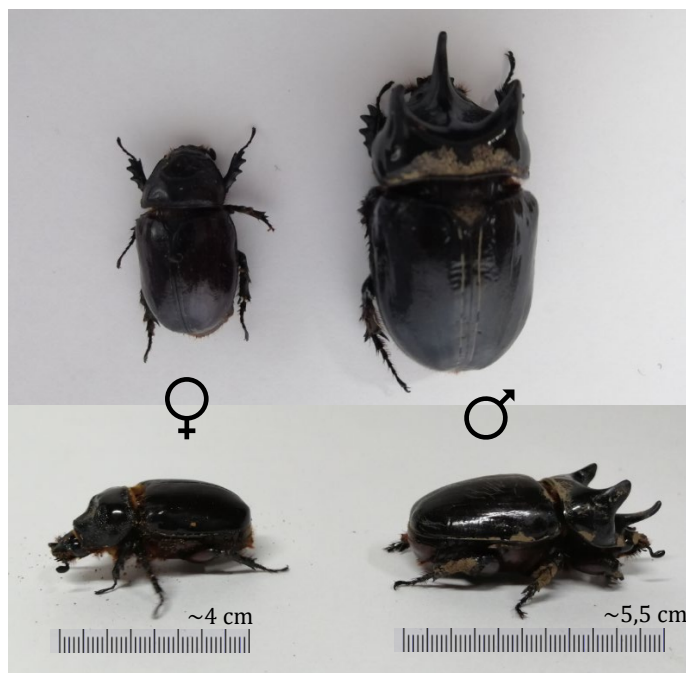


Figura 3-5. Diferencia en tamaño y morfología de insectos adultos de *Strategus aloeus*: Hembra (izquierda). Macho (derecha). Foto: V. Vidal-Medina.

Los individuos de cada sexo y procedencia se mantuvieron separados en recipientes de plástico con orificios en las tapas provistos de estípites como fuente de alimento, suelo orgánico proveniente de cultivos de palma de aceite como sustrato, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 10\%$ HR) y un fotoperíodo de 12:12h. Como fuente de alimento se les suministró estípites de palma de aceite, que se reemplazó tres veces por semana y a su vez, se agregaron gotas de agua para garantizar la humedad del suelo.

3.2.2 Extracción de los VOCs de machos y hembras de *Strategus aloeus*

Para la extracción de los VOCs liberados por los insectos de *Strategus aloeus* provenientes de campo y de cría, se emplearon las metodologías de extracción HS-MEFS y HSD, descritas previamente para la extracción de VOCs liberados por el estípites de la palma de aceite (**Capítulo 2, Sección 2.2.2**). Adicionalmente, se empleó la metodología de extracción directa con solvente de la glándula de individuos machos y de los últimos segmentos abdominales para hembras procedentes de campo.

Con el objetivo de establecer las condiciones experimentales de extracción mediante las metodologías de espacio de cabeza para la detección de los VOCs liberados por individuos de *Strategus aloeus* de ambos sexos, procedentes tanto de campo como de cría, se realizaron experimentos preliminares empleando diferentes cantidades de insectos adultos -en presencia y ausencia de alimento-, para HS-MEFS diferentes tiempos de equilibrio y de exposición de las fibras. Para HSD se emplearon tiempos de aireación de los sistemas y cuatro materiales adsorbentes (MonoTrap™ *Monolithic Material Sorptive Extraction*, GL Sciences Inc., Tokio, Japón; ORBO-32 *Standard Charcoal Tubes*, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.; Hayesep® D80/100 DVB, Supelco, Darmstadt, Alemania; y, Porapak® Q50/80, Supelco, Bellefonte PA, EE. UU.).

- **Extracción de VOCs liberados por adultos de *S. aloeus* mediante HS-MEFS**

Los VOCs liberados por los insectos fueron recolectados mediante fibras poliméricas de Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm de espesor, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.), empleando el montaje presentado en la **Figura 3-6**, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 10\%$ HR) en recipientes de 1L diseñados especialmente para la especie bajo estudio.

Cada extracción se realizó con insectos diferentes de ambas procedencias, empleando 10 minutos de tiempo de equilibrio para la formación del *headspace* y 40 horas de exposición de la fibra. Las extracciones se realizaron por duplicado con 2 insectos en cada recipiente, en ausencia de alimento y de suelo. Para cada extracción se realizó un blanco, el cual consistió en el mismo montaje vacío.

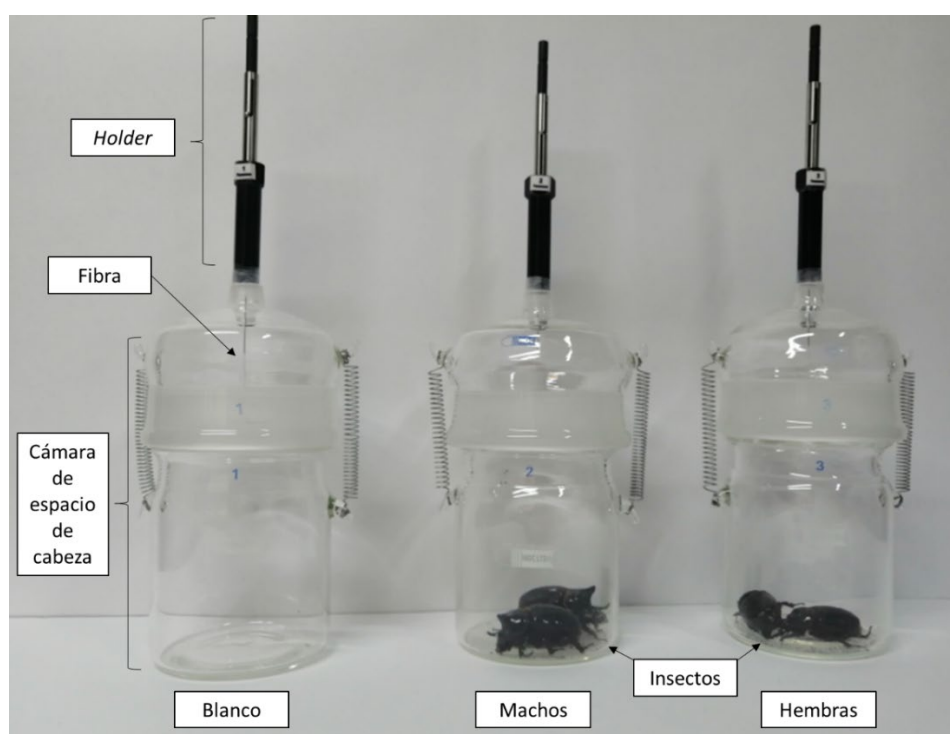


Figura 3-6. Montaje empleado para la extracción de los VOCs liberados por *Strategus aloeus* mediante HS-MEFS. Foto: V. Vidal-Medina.

- **Extracción de VOCs liberados por adultos de *S. aloeus* mediante HSD**

Los VOCs liberados por los insectos de ambas procedencias, se recolectaron mediante la metodología de HSD empleando tubos de carbón activado (ORBO-32 Standard Charcoal Tubes, Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.). Para individuos de campo también se emplearon columnas de vidrio que contenían 50 mg del polímero adsorbente conformado por un copolímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno conocido como Porapak® (Q50/80 (Supelco, Bellefonte PA, EE. UU.)). La extracción en simultáneo con ambos materiales adsorbentes para individuos de campo se consiguió mediante el uso de acoples “T” y recipientes de 5 L diseñados especialmente para la especie de estudio (**Figura 3-7**)

Las extracciones se llevaron a cabo durante 30 días bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 10\%$ HR) con grupos de 10 individuos de cada sexo por separado, en presencia de 30 g de estípite como fuente de alimento. Se mantuvo una aireación constante con un flujo de aire de 1.0 L/min que fue humidificado y filtrado con una trampa de agua y carbón activado antes de su ingreso a la cámara de *headspace*. Para ambas procedencias de insectos, como blanco se empleó un montaje constituido por el recipiente con una muestra de estípite de 30 g.



Figura 3-7. Montaje empleado para la extracción de los VOCs liberados por *Strategus aloeus* mediante HS-MEFS. Foto: V. Vidal-Medina.

Los VOCs recolectados por HSD en los materiales adsorbentes empleados fueron eluidos cada semana con $\sim 300 \mu\text{L}$ de hexano de grado HPLC (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Estos extractos fueron concentrados con una corriente de nitrógeno hasta un volumen final de $50 \mu\text{L}$, y posteriormente analizados por GC-MS. Los extractos de cada semana se unieron y mezclaron con el objetivo de aumentar la concentración de los VOCs.

Adicionalmente, con el objetivo de comparar materiales adsorbentes y solventes de extracción (hexano y diclorometano) en la extracción de VOCs liberados por individuos de campo, se realizó una extracción bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y flujo mencionadas anteriormente, durante 7 días con grupos de 6 individuos de cada sexo, por separado. Esto, modificando el montaje de extracción con tres acoples "T" para la realización de la adsorción simultánea empleando 2 tubos ORBO-32 y 2 columnas de vidrio con 50 mg de Porapak® para su posterior elución con ambos solventes de extracción.

- **Extracción directa con solvente de VOCs presentes en glándulas de *S. aloeus*.**

La tercera metodología de extracción empleada correspondió a la extracción directa con solvente de los compuestos orgánicos volátiles contenidos en la glándula de individuos machos de *S. aloeus* procedentes de campo y, para individuos hembras, a falta de presencia de dicha glándula, aquellos contenidos en los últimos segmentos abdominales (**Figura 3-8**). La disección de la glándula y los últimos segmentos abdominales fue realizada durante las primeras horas de la madrugada (2:00-5:00 h), período reportado como horario de mayor actividad de esta especie, y en el cual se reporta el llamado realizado por los machos presentes en las galerías.²⁶ La extracción se realizó para 4 individuos adultos de *S. aloeus* diseccionando la parte identificada como glándula en los machos, y en las hembras los últimos segmentos abdominales. Las extracciones se realizaron en un tiempo que no superó una semana después de la llegada de los insectos a Bogotá. Previo a la disección, los insectos fueron inmovilizados mediante un choque térmico en congelador a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. La extracción de las partes diseccionadas se realizó durante 5 minutos. Se, utilizaron dos solventes de polaridad contrastante: hexano y diclorometano grado HPLC (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania).¹⁸¹



Figura 3-8. Partes del insecto diseccionadas para la extracción de VOCs directa con solvente de individuos de *S. aloeus* procedentes de campo a) Últimos segmentos abdominales de una hembra adulta y b) glándula de un macho adulto. Foto: Dra. A. Romero-Frías.

3.2.3 Análisis e identificación de los VOCs extraídos

El análisis de los extractos se realizó por GC-MS en el modo ionización electrónica (EM-IE) en un cromatógrafo de gases HP 6890 Series GC acoplado a un espectrómetro de masas HP 5973 (Hewlett Packard, Palo Alto, EE. UU.), equipado con una columna capilar TG-1MS (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm espesor de partícula; Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), bajo las mismas condiciones descritas para el estípite de la palma de aceite (**Capítulo 2, Sección 2.2.3**). El programa de temperatura empleado fue adaptado y ajustado del programa reportado por Rochat *et al.* (2000):²⁶ 35°C durante 1 minuto de temperatura inicial, seguido de un calentamiento hasta 40°C (1 minuto), con una rampa de calentamiento de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguido por un calentamiento hasta 250°C (25 minutos) con una rampa de calentamiento de $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

La identificación tentativa de los VOCs liberados por ambos sexos de *S. aloeus* procedentes tanto de campo como de cría, se realizó de idéntica manera a la descrita para el estípite de la palma de aceite (**Capítulo 2, Sección 2.2.3**). Para confirmar la identificación de los VOCs detectados,

aunado a los compuestos mencionados en el capítulo anterior, se adquirieron comercialmente los siguientes patrones: preniteno (Alfa Aesar, Massachusetts, EE. UU.); 3-hexanol, bis(metil)metano, *sec*-butilbenceno, α -ionona, (Supelco, Bellefonte, PA, EE. UU.); 1-etil-4-metilciclohexano Fisher Scientific (Waltham, EE. UU.); 1,3-dimetilnaftaleno, 1-docosanol, 1,1-dimetilciclohexano, isononano, *m*-dimetoxibenceno, 2,7-dimetilnaftaleno, 1,6-dimetilnaftaleno, tujopseno (Sigma Aldrich, Indianápolis, EE. UU.), 4-metiloctanoato de etilo (ingrediente activo obtenido del interior del difusor comercial bm Kabuto (Shin – Etsu Chemical Co., Ltd., Tokio, Japón) -el cual se trasvasó del interior del difusor a un vial- y, el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol (BLD Pharmatech Ltd, Shanghái, China).

La cantidad relativa de cada uno de los VOCs identificados para cada sexo y extraídos mediante cada metodología se determinó con base en su relación de áreas.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Colonias de *S. aloeus* establecidas bajo condiciones de laboratorio

En primer lugar, tal y como se evidencia y era de esperarse, los machos de *S. aloeus* empleados en la presente investigación poseían un tamaño mayor que las hembras y, los individuos capturados en campo eran de mayor tamaño que sus conespecíficos de cría (**Figura 3-9**). Adicionalmente, también se observó lo señalado por Pallares *et al.* con respecto a la existencia de varios tamaños de machos adultos.⁹⁴

Por otro lado, de acuerdo con lo reportado por Aldana *et al.* (2017), bajo condiciones de cautiverio, en el campo experimental de la zona oriental ($28,1 \pm 1,1$ °C y 64 ± 5 % de HR), la longevidad de las hembras es mayor que la de los machos (89 ± 24 días y 58 ± 38 días, respectivamente).⁹³ Sin embargo, bajo las condiciones de manutención de las colonias establecidas en laboratorio en la presente investigación, se observa una mayor duración de los machos con respecto a las hembras (66 ± 36 días y 44 ± 23 días, respectivamente) y ambas longevidades menores a las reportadas (**Figura 3-10**). Adicionalmente, para ambos sexos se evidencia que los individuos de cría presentan una mayor duración que los individuos de campo. Lo cual puede atribuirse a la edad fisiológica de los insectos, ya que como se mencionó previamente, para los individuos procedentes de campo se desconoce su edad al momento de la captura.

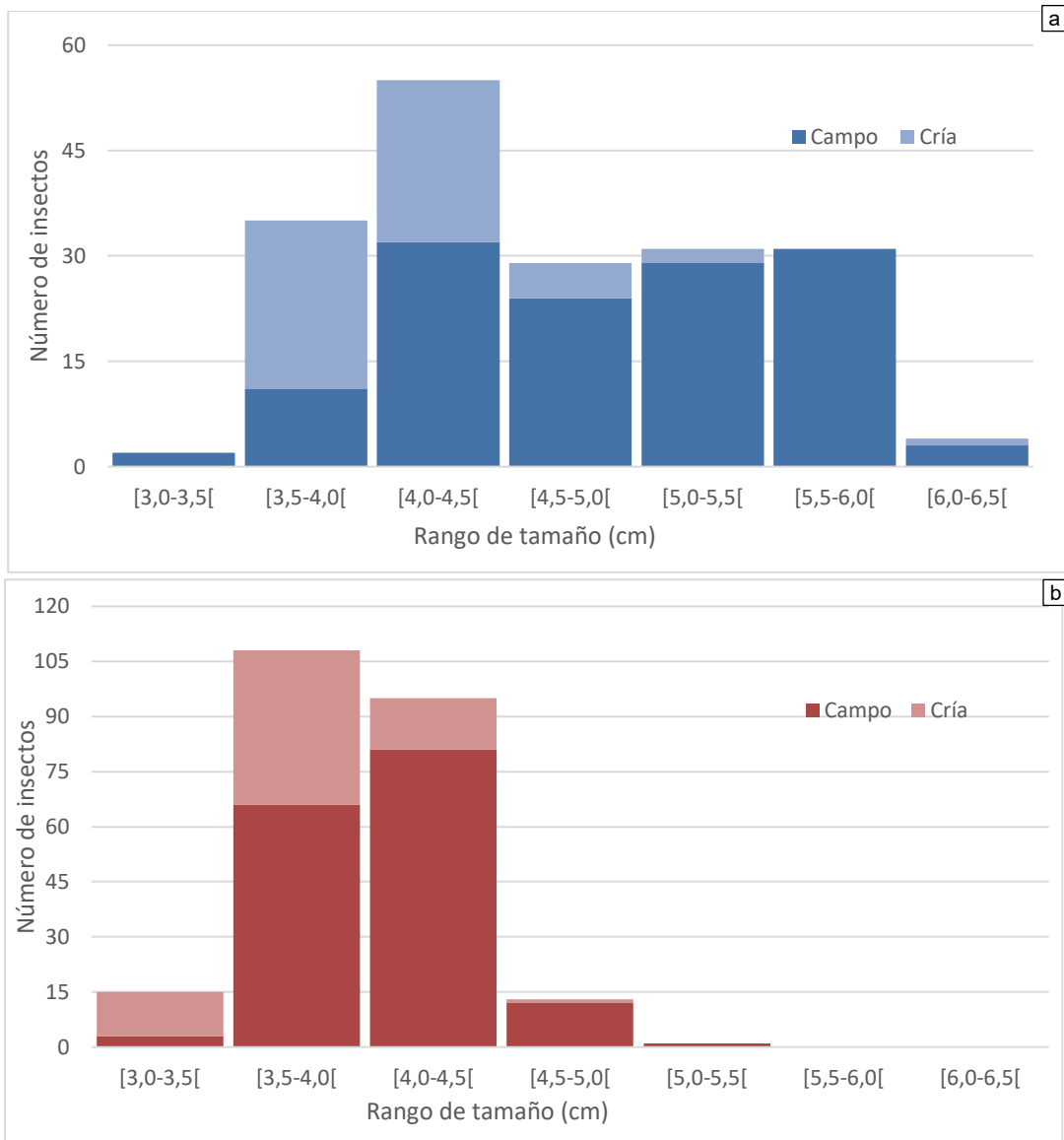


Figura 3-9. Distribución de tamaño de insectos a) machos y b) hembras de *Strategus aloeus*.

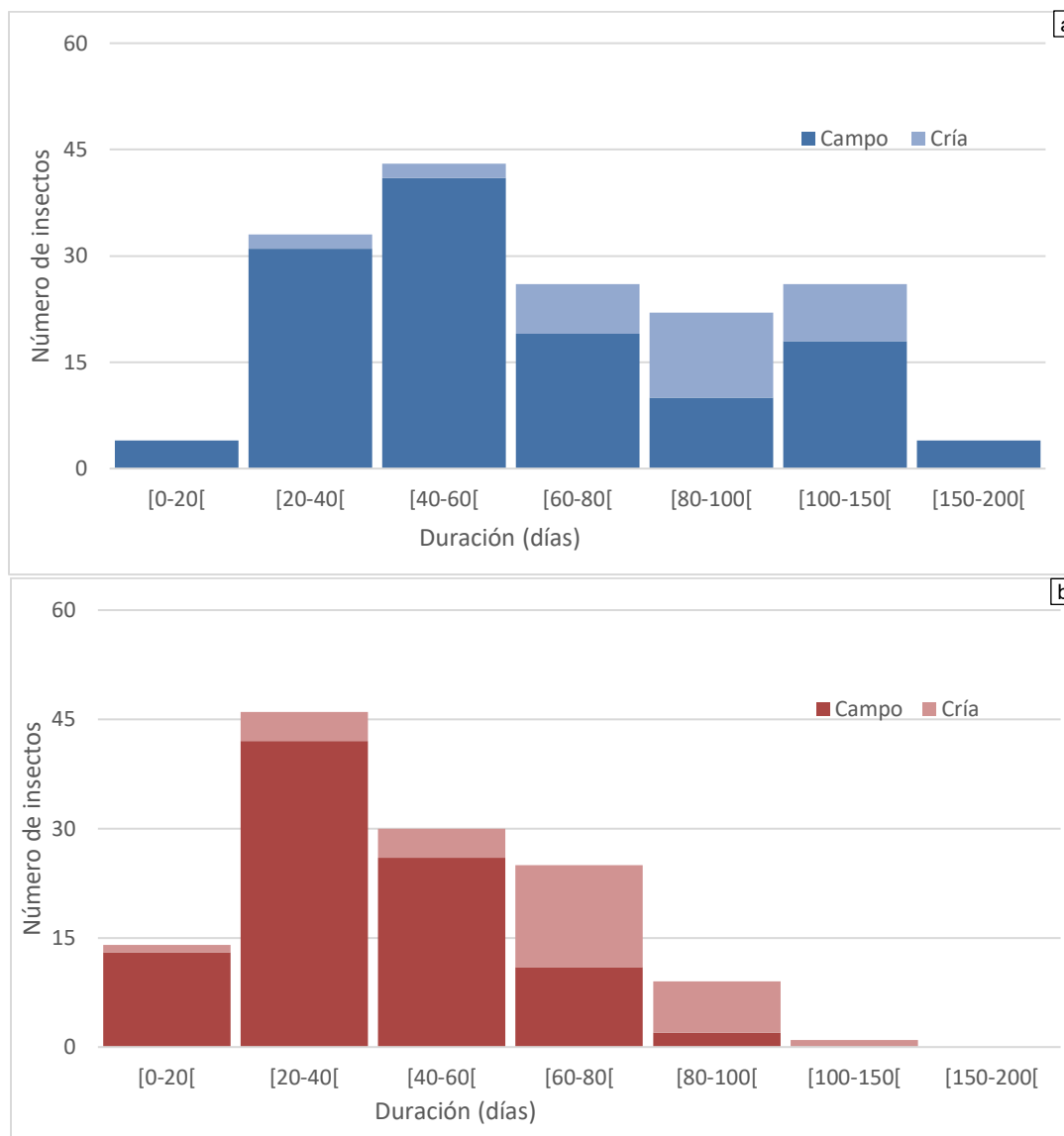


Figura 3-10. Distribución de la duración de adultos a) machos y b) hembras de *Strategus aloeus*.

Con el fin de establecer cuáles eran las condiciones analíticas requeridas para que los VOCs macho-específicos fueran detectables, se realizaron experimentos preliminares en los que se variaron parámetros experimentales tales como la cantidad de insectos, la presencia o ausencia de alimento y suelo, el tiempo de exposición o aireación y el material adsorbente. Se determinó que para la extracción por HS-MEFS, se requería un mínimo de 2 insectos sin alimento ni suelo y un tiempo de exposición de la fibra mínimo de 40 h, mientras que para la extracción por HSD, se requerían al menos 6 individuos en presencia de alimento, y un tiempo de aireación de 7 días, empleando ORBO-32 y Porapak® como materiales adsorbentes.

3.3.2 VOCs liberados por *S. aloeus*

Se detectaron e identificaron 34 VOCs para los insectos de *S. aloeus* (**Tabla 3-1**). Los 26 VOCs señalados con un asterisco (*) corresponden a los VOCs identificados exclusivamente en

machos de *Strategus aloeus*, en hembras conespecíficas y en ambos sexos de esta especie, que, adicionalmente habían sido previamente detectados en la caracterización del estípite de la palma de aceite. Los 11 VOCs señalados en **negrilla** corresponden a los VOCs detectados exclusivamente para insectos macho de *S. aloeus*.

Por un lado, se detectaron e identificaron tentativamente 2-butanona, éter caprílico y hexacosano como VOCs liberados exclusivamente por individuos machos de *Strategus aloeus*, extraídos mediante HS-MEFS en individuos de cría, extracción directa con diclorometano y extracción directa con ambos solventes en individuos de campo, respectivamente. Los anteriores VOCs adicionalmente habían sido previamente detectados en el estípite de la palma de aceite en el **Capítulo 2**. Para hembras, se detectó exclusivamente el 4-metiloctano como VOC que había sido detectado previamente en el perfil de volátiles del estípite de la palma de aceite y extraídos para hembras de campo mediante HSD. A pesar de que para coleópteros los casos de secuestro de VOCs de su hospedero es escaso, la detección de los compuestos anteriores liberados por los individuos puede sugerir que, el sexo que libera dichos VOCs de manera exclusiva, puede estarlos empleando en su comunicación.¹⁶⁶

Entre los VOCs liberados exclusivamente por uno de los dos sexos que provienen de la palma, particularmente se observa que la 2-butanona, identificada previamente entre los VOCs del estípite de la palma de aceite, se detectó exclusivamente entre los VOCs liberados por individuos machos de *S. aloeus* procedentes de campo. Como se mencionó anteriormente, dicha cetona había sido reportada por Rochat *et al.* (2000) entre los constituyentes de la feromona de agregación macho-específica. Su detección tanto en el hospedero y alimento del insecto, así como entre los VOCs exclusivamente liberados por machos de *S. aloeus* pueden señalar que este compuesto podría estar presentado una doble función: como cairomona en la interacción planta-insecto, y como feromona entre los insectos.³⁷⁻³⁹

Por otro lado, de los VOCs detectados previamente en el perfil de volátiles del estípite de la palma de aceite y liberados por ambos sexos de *Strategus aloeus*, la 2-hexanona, el etilbenceno, el *p*-cimeno, el junipeno y el *trans*- α -bergamoteno han sido reportados en literatura como semioquímicos de coleópteros con un régimen alimentario distinto al de *S. aloeus* y el hexanal, el D-limoneno, el 1-undeceno y el cariofileno para coleópteros rizófagos o saprófagos.¹³¹ La presencia de estos compuestos tanto en el estípite de la palma de aceite, así como en los insectos adultos de *Strategus aloeus*, sugiere fuertemente su papel como cairomonas en la señalización, ubicación y establecimiento de la disponibilidad de la fuente de alimento, influyendo así en la comunicación química interespecífica palma-insecto.²⁵

Tabla 3-1. VOCs liberados por individuos de campo y de cría de *Strategus aloeus* extraídos mediante HS-MEFS, HSD y extracción directa con solvente.

(IR: Índice de retención; Cantidades relativas calculadas a partir del área del pico (%): 0% <+ < 5%, 5% < ++ < 10%, 10% < +++ < 20%, 20% < +++++, - = No detectado; ND: no detectable mediante la técnica analítica empleada) *: previamente detectados en el perfil volátil de *Elaeis guineensis*; **negrita:** compuestos macho-específicos.

No.	Compuesto	IR _{exp.} (TG-1)	IR _{lit.} (X-1)	Fuente	VOCs en individuos de <i>Strategus aloeus</i>																			
					Campo															Cría				
					HS-MEFS		HSD						Extracción directa con solvente				HS-MEFS		HSD					
					DVB/CAR/ PDMS		ORBO/ Hexano		Porapak/ Hexano		ORBO/ DCM		Porapak/ DCM		Hexano		DCM		DVB/CAR/ PDMS	ORBO/ Hexano		ORBO/ DCM		
♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀					
1*	2-Butanona	577	582	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	
2	Acetato de sec-butilo	738	738	Std	-	-	++++	-	++++	-	++++	-	++++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
3*	2-Hexanona	759	761	Std	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	
4*	Hexanal	759	773	Std	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-	-	
5*	Etilbenceno	844	844	Std	+	+	-	+++	-	-	-	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	
6*	<i>p</i> -Xileno	857	859	Std	+++	++	-	+++	-	-	-	++++	-	++++	++++	-	++++	-	++++	++++	-	-	-	++++
7	Bis(metil) metano	860	862	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8*	4-Metiloctano	863	868	EM	-	-	-	+++	-	++	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9*	Estireno	872	844	Std	+++	++++	-	-	-	+++	++	+	-	++	+++	-	-	-	++++	-	-	-	-	
10*	<i>m</i> -Xileno	879	858	Std	++++	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-	-	
11*	2,6-Dimetiloctano	931	937	EM	-	-	-	+++	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	
12*	Mesitileno	949	955	Std	-	-	-	+	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	sec-Butilbenceno	995	997	Std	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14*	Hemimelliteno	974	999	Std	++	+	-	-	++	+++	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	
15*	<i>p</i> -Cimeno	1008	1010	Std	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16*	D-Limoneno	1017	1022	Std	-	-	-	+++	-	++	-	+++	+	+++	+++	-	-	++++	-	-	-	++++	-	
17*	2-Etil- <i>p</i> -xileno	1050	1064	Std	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18*	1-Undeceno	1089	1087	Std	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	1,1-Dimetilindano	1092	1081	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	
20*	Dureno	1103	1126	Std	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	Preniteno	1136	1139		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22*	Naftaleno	1153	1151	Std	-	-	-	-	++	+	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	4-Metiloctanoato de etilo	1238	1241	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24*	2,2,4,4,6,8,8-Heptametilnonano	1334	1323	Std	++++	+++	-	+++	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-	
25*	Junipeno	1397	1409	Std	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol	1399	1407	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	
27*	Cipereno	1421	1416	EM	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	
28	1,3-Dimetilnaftaleno	1422	1414	Std	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29*	Cariofileno	1438	1428	Std	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-	-	

30*	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1452	1434	EM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	-	-	-	-
31*	Curcumeno	1467	1469	EM	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32*	α -Muuroleno	1490	1488	EM	-	-	+	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33*	Éter caprílico	1655	1657	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-	-	-	-
34*	Hexacosane	2599	2600	Std	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++++	-	-	-	-	-	-

Como se mencionó, es bien sabido que varios insectos herbívoros pertenecientes a distintos órdenes secuestran metabolitos de origen vegetal, es decir que, captan, depositan y concentran estas pequeñas moléculas en tejidos o células especializadas. El fenómeno anterior ha sido discriminado de la simple ingesta y paso de material vegetal a través del sistema digestivo sin ser absorbido por el organismo y posteriormente empleado como semioquímico de defensa o de cópula.¹⁸² A este respecto, vale la pena resaltar el D-limoneno representa un ejemplo de monoterpeno secuestrado de la planta hospedera por parte de ambos sexos del escolitino *Dendroctonus pseudotsugae* que presenta un efecto sinérgico en la agregación de los insectos al ser liberado en conjunto con la feromona de agregación de esta especie de coleópteros.¹⁸³ Los VOCs señalados anteriormente como compuestos procedentes del hospedero y liberados por ambos sexos podrían presentar el efecto sinérgico reportado para el D-limoneno en la ecología química de *D. pseudotsugae*.

Sin embargo, bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio no es posible establecer si estos VOCs provenientes del hospedero son liberados como excreciones mediante las heces o si son secuestrados por el insecto y tienen algún efecto benéfico para el mismo, ni establecer el efecto de dichos VOCs sobre los insectos.¹⁶⁶ Para la procedencia de los VOCs, se sugieren experimentos de alimentación de los individuos con compuestos marcados isotópicamente, y para el potencial efecto de los VOCs liberados, se requieren estudios de evaluación del comportamiento para confirmar esta hipótesis.

Con respecto a la procedencia de los insectos, se detectó una mayor cantidad de VOCs para los individuos de campo, con respecto a los individuos de cría. La 2-butanona y el 1,1-dimetilindano, extraídos mediante HS-MEFS, fueron detectados exclusivamente para individuos de cría, mientras que el acetato de *sec*-butilo, la 2-hexanona, el 4-metiloctano, el mesitileno, el *p*-cumeno, el 1-undeceno, el dureneno, el preniteno, el naftaleno, el junipeno, el 1,3-dimetilnaftaleno, el curcumeno y el α -muuroleno fueron exclusivos de individuos procedentes de campo. Vale la pena resaltar que, bajo las condiciones experimentales empleadas, fue posible detectar para los individuos provenientes de campo una mayor cantidad de VOCs con respecto a sus conoespecíficos de cría (**Tabla 3-1**). Lo anterior puede sugerir que los individuos de campo, debido a su procedencia y hábitat, pueden presentar una comunicación química de mayor complejidad con respecto a sus conoespecíficos criados en cautiverio, debido a que dependen de esta comunicación química para aparearse y encontrar las fuentes de alimento. De hecho, para varias especies de escarabideos pertenecientes al género *Kheper*, se ha señalado que tanto los despliegues comportamentales de liberación de feromonas de agregación y sexuales, como la producción y liberación de estas se veían reducidas o suprimidas en cautiverio. Por lo anterior, para especies como *K. bonelli* los componentes del atrayente sexual debían extraerse del material glandular de los machos.¹⁸⁴ Adicionalmente, el estado fisiológico y estado de apareamiento de los individuos es diferente. De hecho, para los especímenes procedentes de campo, como se mencionó previamente, se desconoce su edad y su estado de apareamiento y se ha establecido que estos factores fisiológicos influyen la producción de las feromonas.²⁸

Ahora, comparando las metodologías de extracción (HSD y HS-MEFS) de los VOCs liberados por individuos de *S. aloeus* se evidencia que la 2-butanona fue detectada únicamente para extractos obtenidos mediante la metodología de HS-MEFS. Lo anterior, de acuerdo con lo mencionado en la caracterización de los VOCs de *Elaeis guineensis* en donde se justificó la detección exclusiva de esta cetona de bajo peso molecular mediante HS-MEFS por su bajo tiempo de elución. Por su parte, la detección del acetato de *sec*-butilo, de la 2-hexanona, del *p*-cumeno, del curcumeno y del α -muuroleno únicamente para los extractos obtenidos

mediante la metodología de HSD están de acuerdo con lo evidenciado en la caracterización del perfil volátil de *E. guineensis*, en donde estos compuestos también fueron exclusivos para esta metodología de extracción. Lo anterior refuerza la hipótesis de que existe una mayor selectividad entre estos VOCs y los materiales adsorbentes empleados para HSD bajo las condiciones de extracción.

Para los extractos obtenidos por extracción directa con solvente de las glándulas de machos, se lograron identificar tres VOCs macho-específicos (**Tabla 3-1, Figuras 3-10 y 3-11**). De estos, el acetato de *sec*-butilo **2** había sido reportado previamente como uno de los constituyentes de la feromona de *S. aloeus* y el 4-metiloctanoato de etilo (oryctalure) **23** como constituyente de las feromonas para especies de escarabajos de la tribu Oryctini pertenecientes a la subfamilia Dynastinae, a la cual también pertenece el *S. aloeus*. El tercer componente macho-específico identificado en las glándulas de machos de *S. aloeus* fue el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, **26** compuesto que no ha sido reportado previamente como producto natural. Mediante los extractos hexanoicos, se determinó que la proporción del 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, el acetato de *sec*-butilo y el 4-metiloctanoato de etilo en las glándulas de individuos de campo se encontraban en la siguiente proporción 58:34:8.

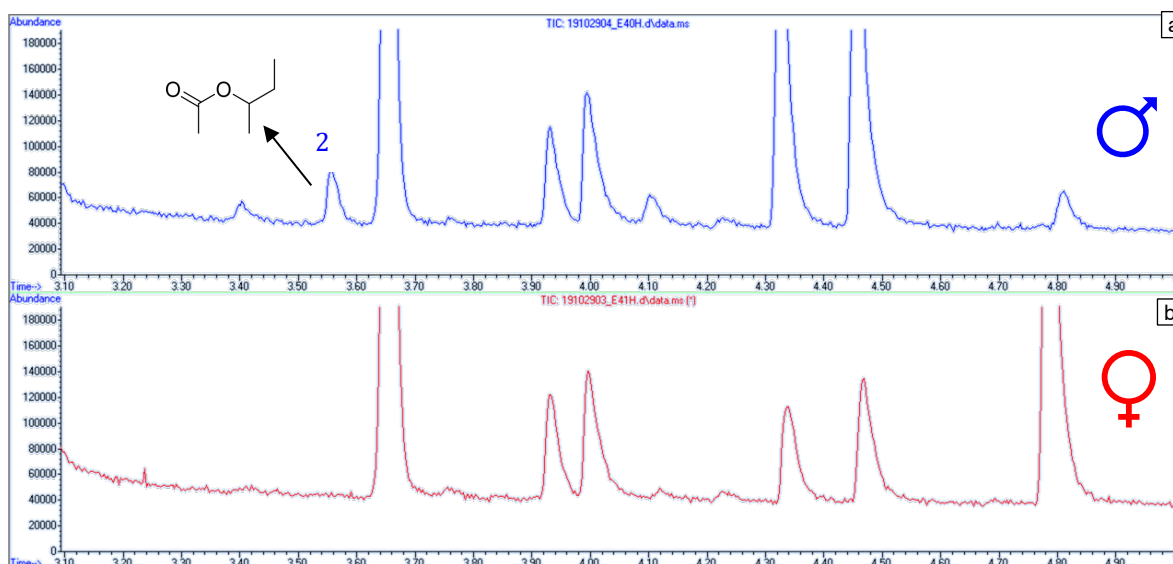


Figura 3-11. Cromatogramas de los VOCs detectados en los extractos en hexano de glándulas de machos a) y de los últimos segmentos abdominales de hembras b) procedentes de campo, analizados en una columna TG-1, mostrando el acetato de *sec*-butilo macho-específico (**2**). El número corresponde con el señalado en la **Tabla 3-2**.

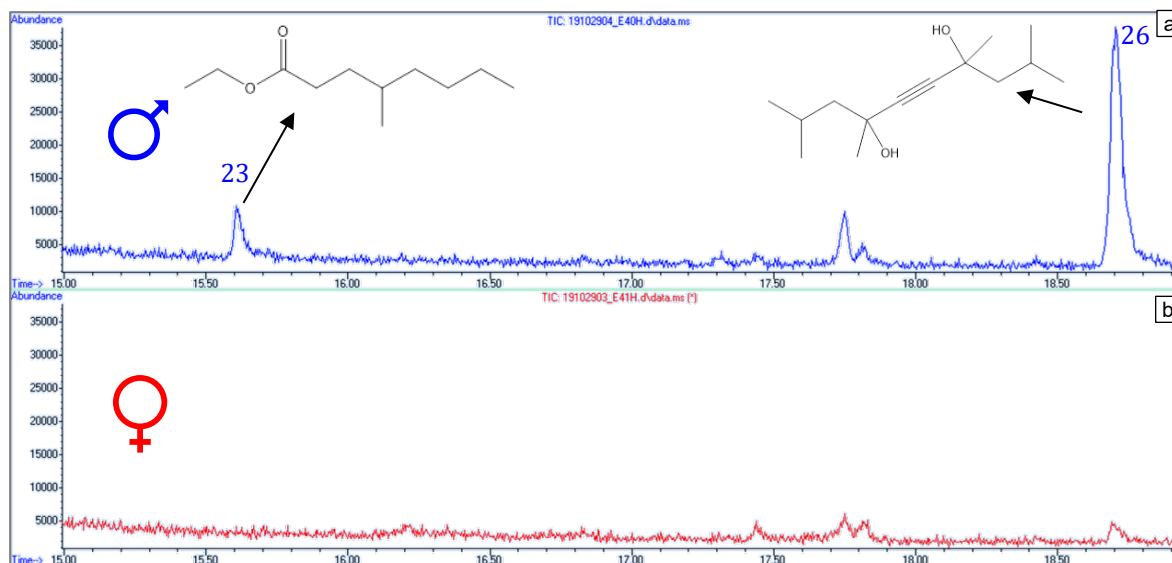


Figura 3-12. Cromatogramas de los VOCs detectados en los extractos en hexano de glándulas de machos a) y de los últimos segmentos abdominales de hembras b) procedentes de campo, analizados en una columna TG-1, mostrando dos compuestos macho-específicos (**23**: 4-metiloctanoato de etilo) y (**26**: 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol). Los números corresponden con los señalados en la **Tabla 3-2**.

Es importante resaltar que los 5 VOCs macho-específicos restantes, no detectados en *E. guineensis* (**Tabla 3-1**), a saber, bis(metil)metano, *sec*-butilbenceno, 1,1-dimetilindano, preniteno y 1,3-dimetilnaftaleno, fueron detectados para los extractos obtenidos mediante HSD y HS-MEFS. Sin embargo, en la presente investigación no se logró confirmar su identidad química mediante la comparación con patrones de referencia. Adicionalmente, ninguno de estos VOCs tentativamente identificados como macho-específicos aquí, ha sido previamente reportado como semioquímico de ninguna especie animal.

VOC mayoritario: 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol (**26**)

El compuesto mayoritario macho específico **26** detectado en las glándulas de *S. aloeus* fue identificado mediante el empleo de un patrón de referencia como 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol (IR/TG-1= 1399). Es la primera vez que este alquino oxigenado se reporta como compuesto de origen natural y no existen reportes previos de su función como semioquímico de ninguna especie. Enseguida se presenta su espectro de masas (**Figura 3-11**).

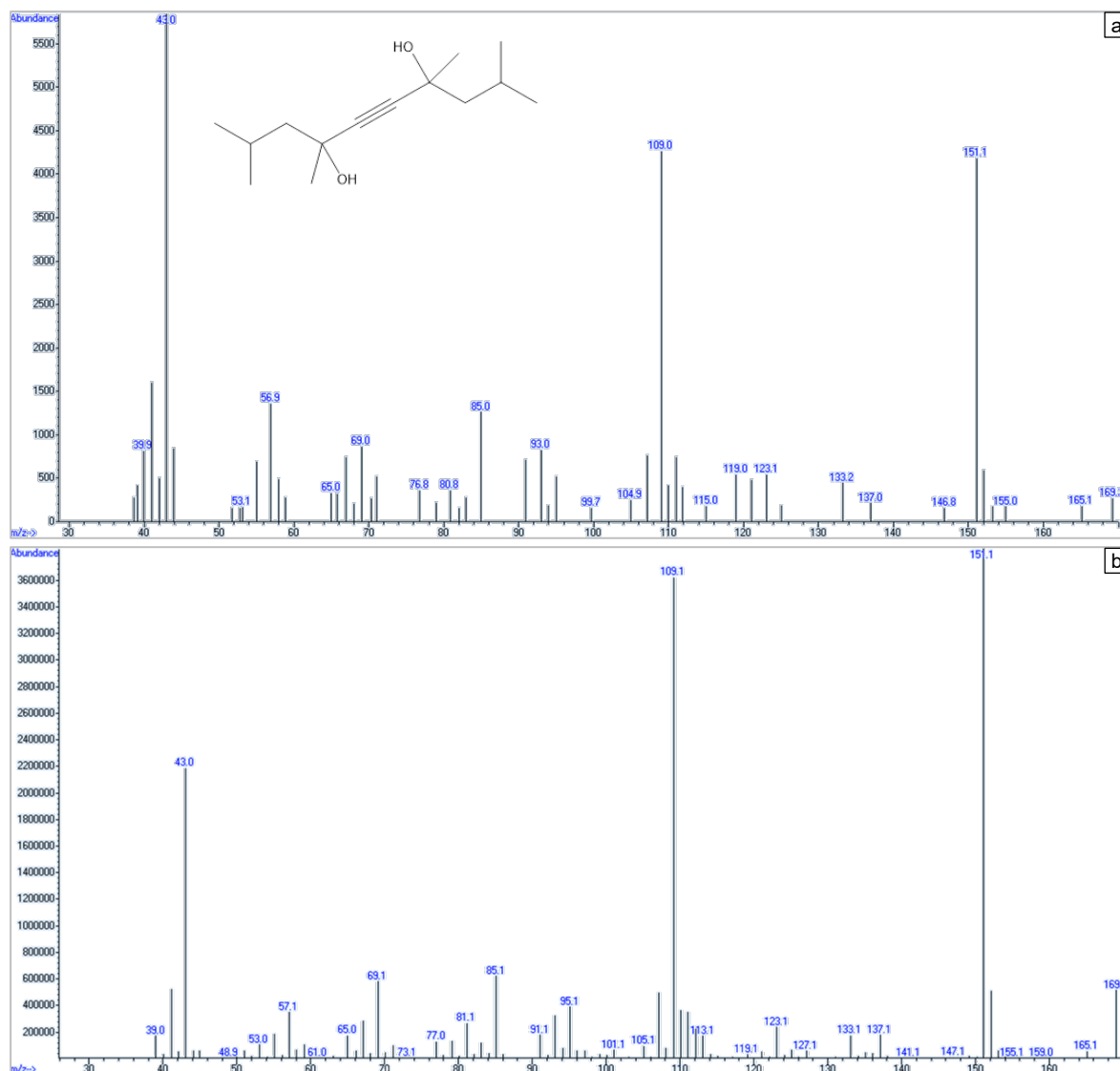


Figura 3-13. Espectros de masas por ionización electrónica del a) compuesto mayoritario **26** detectado en el extracto directo con solvente de las glándulas de individuos machos de *S. aloeus* identificado como 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol y b) patrón comercial.

4-Metiloctanoato de etilo (**23**)

El VOC **23** detectado en el extracto hexánico de las glándulas de machos de *S. aloeus*, se identificó como 4-metiloctanoato de etilo (IR/TG-1=1238) comúnmente conocido como Oryctalure. Su espectro de masas obtenido mediante ionización electrónica se presenta a continuación (**Figura 3-12**). La identificación de este VOC como compuesto macho-específico resulta de gran interés pues, tal y como se mencionó previamente al presentar los compuestos constituyentes de las feromonas de agregación de especies de escarabideos pertenecientes a la subfamilia Dynastinae, este éster ha sido reportado como constituyente de la feromona *Oryctes agamemnon*, *O. elegans*, *O. rhinoceros* y *O. monoceros*, especies de escarabajos pertenecientes a la tribu Oryctini de la subfamilia Dynastinae.^{178–180,185,186} Vale la pena resaltar que el insecto-plaga de interés en la presente investigación, *S. aloeus*, también pertenece a dicha tribu. Teniendo en cuenta que para las especies de coleópteros pertenecientes a la

familia Scarabaeidae, se evidenció previamente una relación entre la estructura de los semioquímicos reportados con respecto a la taxonomía de las especies respectivas, precisamente una relación entre la estructura química y las tribus de las distintas subfamilias evaluadas, aquí se sugiere fuertemente que el 4-metiloctanoato de etilo es uno de los constituyentes de la feromona del *S. aloeus*.⁹⁵

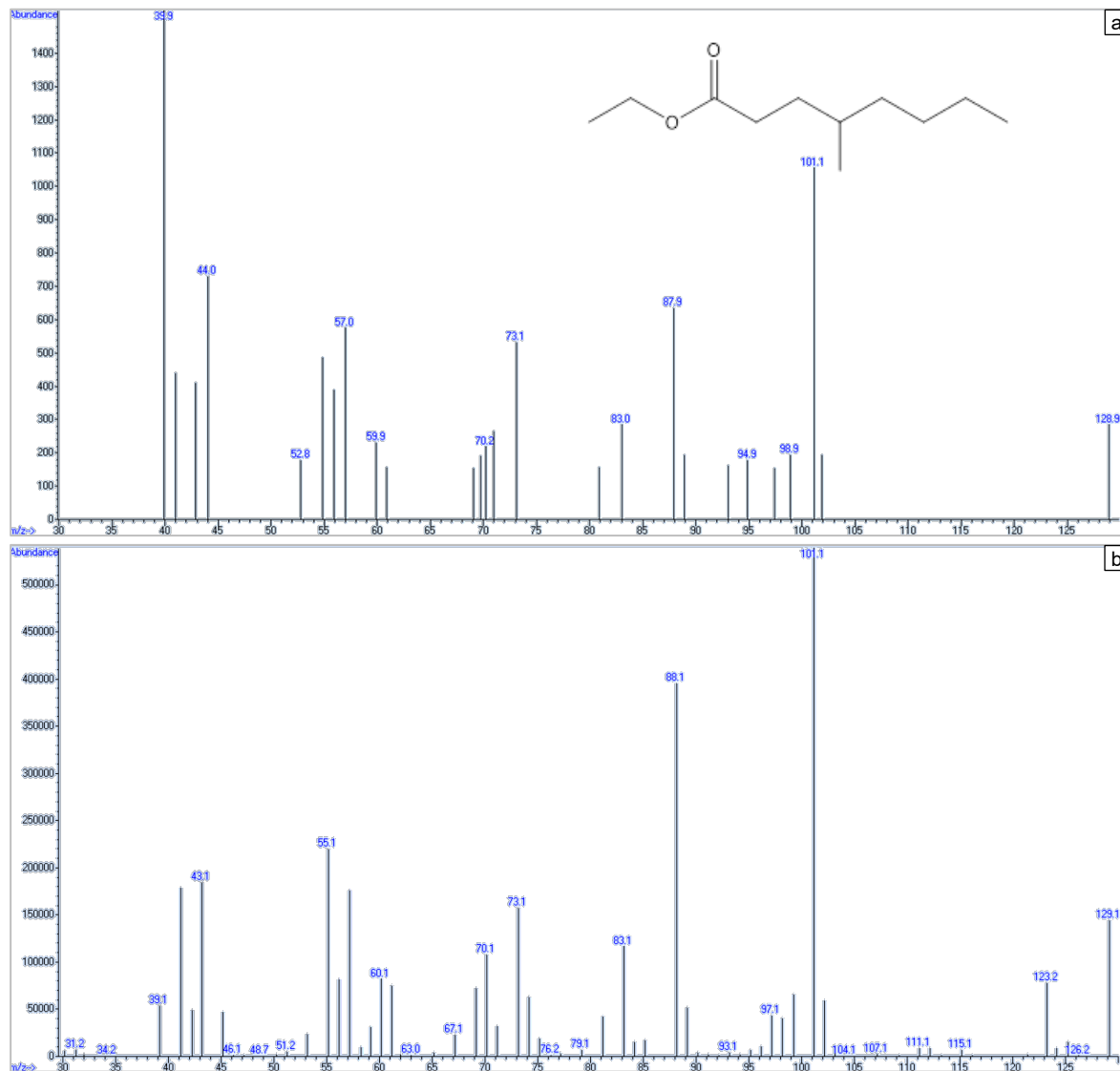


Figura 3-14. Espectro de masas por ionización electrónica del a) compuesto **23** detectado en el extracto hexanoico de las glándulas de individuos machos de *S. aloeus* identificado como 4-metiloctanoato de etilo (Oryctalure) y b) patrón comercial.

Acetato de *sec*-butilo (2)

El compuesto **2** se identificó como acetato de *sec*-butilo (IR/TG-1=738) y se detectó tanto en los extractos obtenidos por HSD de los VOCs liberados por el *S. aloeus* machos, así como entre los VOCs contenidos en las glándulas de los insecto. Como se ha venido señalando repetidamente a lo largo del documento, este éster de bajo peso molecular fue reportado por Rochat y colaboradores (2000) como tercer constituyente de la feromona de agregación

macho-específica de *S. aloeus* reportada por Rochat *et al.*²⁶ Adicionalmente, tal y como se señaló en el **Capítulo 2**, este éster fue el único compuesto exclusivamente identificado en la palma joven infestada por individuos machos de *S. aloeus* y ausente en la palma sana y, lo anterior, junto con su presencia en los extractos en hexano de las glándulas de los individuos machos sugiere fuertemente que, tal y como lo reportaron en estudios anteriores, este compuesto corresponde a uno de los constituyentes de la feromona de esta especie. El espectro de masas de este compuesto se presenta a continuación (**Figura 3-13**).

El acetato de *sec*-butilo fue el único de estos tres VOCs que fue detectado en los extractos obtenidos mediante HSD del espacio de cabeza de los VOCs liberados por individuos machos. Los otros dos constituyentes de la feromona de *S. aloeus* únicamente se detectaron para los extractos de las glándulas de los insectos. Es bien sabido que la liberación de las feromonas de los insectos está sujeta a varios factores ambientales e internos del organismo que las libera. La presencia de los compuestos en las glándulas y no en el espacio de cabeza de los individuos es de manera precisa muestra de que posiblemente bajo las condiciones de extracción empleadas, los insectos no procedieron a hacer la liberación de su feromona. Sin embargo, para los individuos recién capturados y aún no habituados al cautiverio, se evidenció su presencia en las glándulas abdominales en donde se ha reportado que se producen las feromonas de varias especies de coleópteros.^{56,166,169,170}

La presente investigación se focalizó en la caracterización de los compuestos macho-específicos con el fin de detectar e identificar los posibles constituyentes de la feromona macho-específica que no fueron identificados previamente. Sin embargo, tal y como se ha reportado para el insecto-plaga *Oryctes rhinoceros* existe la posibilidad de que las hembras también empleen una feromona sexual. En este caso, si bien no existen registros de un despliegue de llamado sexual por parte de las hembras, la presencia de compuestos orgánicos volátiles específicos en las hembras podría sugerir el papel de alguno de estos como semioquímico.

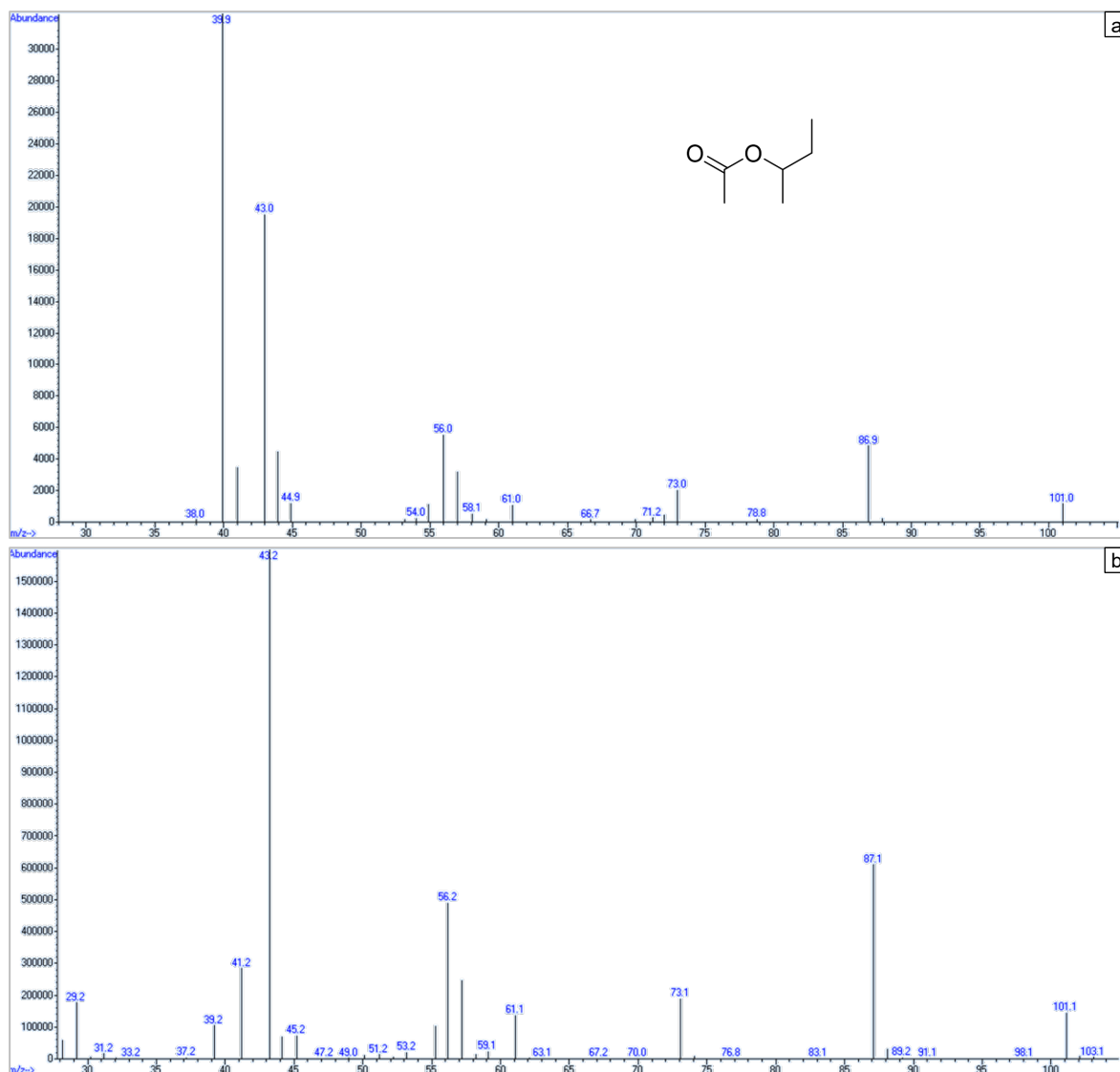


Figura 3-15. Espectro de masas por ionización electrónica del a) compuesto **1** detectado en el extracto hexanoico de las glándulas de individuos machos de *S. aloeus* y en los extractos hexanoicos por HSD de los VOCs liberados por individuos machos al espacio de cabeza e identificado como acetato de *sec*-butilo y b) patrón comercial.

3.4 Conclusiones

- La extracción directa con solvente de las glándulas de machos de *S. aloeus* permitió identificar 3 VOCs macho-específicos: 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, acetato de *sec*-butilo y 4-metiloctanoato de etilo, en una proporción 58:34:8.
- Se identificó al acetato de *sec*-butilo como un compuesto macho-específico tanto en los extractos de sus glándulas como mediante HSD. Este VOC había sido reportado por Rochat *et al.* (2000) como constituyente de la feromona de agregación, su identificación confirma su posible papel como componente de la feromona.

-
- Por primera vez se identificó el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol como un compuesto de origen natural.
 - Se sugiere que los VOCs detectados tanto en los insectos adultos como en el estípite de la palma de aceite (2-hexanona, etilbenceno, *p*-cimeno, junipeno, *trans*- α -bergamoteno, hexanal, D-limoneno, 1-undeceno y cariofileno) podrían estar desempeñando un papel en la señalización química entre la palma de aceite y el *S. aloeus*.

4. Evaluación de la respuesta del *S. aloeus* frente a VOCs

En las investigaciones de ecología química de insectos -en la que participan semioquímicos-, por más que estos compuestos logren ser extraídos, detectados e identificados, los individuos de las especies de estudio son aquellos que validan la actividad biológica de dichos compuestos. Por lo anterior, es fundamental evaluar las respuestas de los insectos frente a VOCs identificados en los sistemas de estudio. En este capítulo se presentan los resultados de la evaluación de la respuesta del *Strategus aloeus* (**Figura 4-1**) frente a ciertos VOCs identificados y sugeridos como cairomonas de la palma de aceite (**Capítulo 2**), y VOCs propuestos como componentes de la feromona macho-específica del *S. aloeus* (**Capítulo 3**). Para comenzar, se presentan resultados de la evaluación electrofisiológica preliminar por electroantenografía (EAG) del *S. aloeus* frente a los VOCs previamente reportados por Rochat *et al.* (2000) e identificados en los capítulos anteriores. Enseguida, se presentan las respuestas del insecto-plaga de estudio frente a VOCs de sus conespecíficos machos mediante un olfatómetro en “Y”.



Figura 4-1. Insectos adultos machos y hembras de *Strategus aloeus* en el bulbo cortado del estípite de la palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. Foto: V. Vidal-Medina.

4.1 Antecedentes

El olfato es uno de los sistemas sensoriales que aparecen más temprano en la evolución y, por tanto, para la mayoría de organismos terrestres y principalmente para los insectos, corresponde a uno de los procesos sensoriales de mayor importancia para las interacciones ecológicas intra e interespecíficas que involucran patrones de conducta esenciales como la alimentación, el apareamiento y la supervivencia de distintas especies.³¹ Por lo general, en insectos, la percepción del olfato se realiza a través de sensilias especializadas con receptores olfatorios (ORs) en las antenas.¹⁸⁷

En la ecología química existen distintos tipos de bioensayos que favorecen la identificación como semioquímicos de compuestos orgánicos volátiles identificados en los sistemas de estudio. Entre estos se encuentran aproximaciones electrofisiológicas tales como las técnicas de electroantenografía (EAG) que pueden ser independientes o acopladas como detectores a técnicas de separación por cromatografía de gases (GC-EAD). Si bien estas medidas electrofisiológicas son consideradas como “bioensayos de atajo”, pueden proporcionar información valiosa sobre la percepción de los individuos hacia un VOC determinado y dar pistas de potenciales semioquímicos. Por otra parte, las aproximaciones comportamentales para la identificación tanto en condiciones de laboratorio -mediante bioensayos con túneles de viento, olfatómetros de dos o más vías- y en campo -mediante trampas diseñadas para cada especie-, permiten determinar el efecto comportamental de los VOCs para las especies estudiadas y dar así una aproximación más real.¹⁸⁸

Saïd *et al.* (2006)⁶⁹ evaluaron los componentes de la feromona reportada por Rochat *et al.* (2000) empleando un olfatómetro de cuatro vías. Señalaron que ambos sexos de esta especie respondieron significativamente a dicha mezcla: las hembras fueron atraídas mientras que los machos fueron repelidos. Con la detección de la 2-butanona y la 3-pentanona entre los VOCs de la palma de aceite evidenciada en la presente investigación, en el marco del presente macroproyecto, Arias (2019) reportó la evaluación de estos compuestos puros en un olfatómetro de dos vías. Evidenció una atracción de los insectos por dichos compuestos. Sin embargo, dicha atracción no fue estadísticamente significativa.⁹⁷

Teniendo en cuenta lo anterior, la evaluación electrofisiológica preliminar y la evaluación comportamental de *S. aloeus* frente a VOCs de su hospedero y conespecíficos -posibles cairomonas y feromonas presentadas a continuación- buscan a portar a la confirmación de su papel como semioquímicos en la interacción ecológica entre la palma de aceite *Elaeis guineensis* y el *S. aloeus*, así como en las interacciones intraespecíficas del insecto-plaga.

4.2 Metodología

Para la evaluación de la respuesta de *S. aloeus* frente a VOCs de su hospedero y de conespecíficos, se emplearon individuos de ambos sexos procedentes de campo con un tiempo de captura no mayor a 2 semanas.

Tal y como se describió en el **Capítulo 3, Sección 3.2.1**, se estableció y mantuvo una colonia de individuos procedentes de campo bajo condiciones de laboratorio, con adultos de edad y estado de apareamiento desconocidos capturados en febrero de 2019 y entre octubre y noviembre de 2020 en las plantaciones comerciales de “Manuelita Aceites y Energía” localizadas en el municipio de San Carlos de Guaroa (Meta, Colombia)- coordinadas

geográficas N3° 53' 4" W73°19' 41"- y del "Palmar del Oriente" localizadas en el municipio de Villanueva (Casanare, Colombia)-coordenadas geográficas N4°31'27,1" W72°51'20,9"-.

4.2.1 Evaluación preliminar de respuestas electrofisiológicas del *S. aloeus* frente a VOCs

Se realizó una evaluación de la respuesta electrofisiológica¹ de individuos de *Strategus aloeus* provenientes de campo frente a la 2-butanona, la 3-pentanona y el acetato de *sec*-butilo. Las cetonas fueron identificadas en el perfil de volátiles liberados por la palma de aceite, lo que permitió sugerirlas como cairomonas- (**Capítulo 2, Sección 2.3.1**) y el éster- sugerido como componente de la feromona- identificado tanto en el sistema de la palma infestada (**Capítulo 2, Sección 2.3.2**), como entre los VOCs liberados por machos de *S. aloeus* (**Capítulo 3, Sección 3.3**).

Para las medidas electrofisiológicas por electroantenografía (EAG) se usó un electroanténografo (Syntech, Kirchzarten, Alemania) conectado a una línea de transferencia humidificada con una corriente de aire hacia el puerto electroanténográfico. Las respuestas de las antenas se registraron con el software Syntech GC-EAD 32, versión 4.6.

Para realizar los registros por EAG, la base de la antena fue cuidadosamente cortada de la cabeza de los insectos (machos y hembras) con un bisturí y se fijó entre dos electrodos de acero inoxidable usando una gota de un gel conductor de la electricidad (Sigmagel, Parker, Labs., Nueva Jersey, EE. UU., **Figura 4-2**).

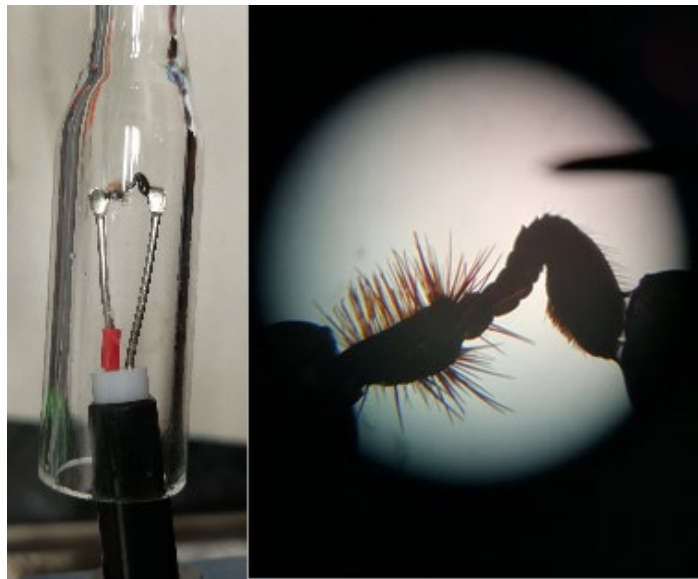


Figura 4-2. Antena de *Strategus aloeus* fijada entre dos electrodos mediante gel conductor de electricidad. Foto: V. Vidal-Medina.

Para los experimentos realizados se obtuvieron los electroantenogramas de la respuesta de la

¹ Las medidas preliminares de las respuestas electrofisiológicas de *S. aloeus* se llevaron a cabo con el Centro de Investigaciones en Microbiología Parasitología Tropical (CIMAT) de la Universidad de los Andes (Bogotá D. C., Colombia).

antena ante estímulos generados mediante el procedimiento conocido como *Puff*. Dicho procedimiento consiste en enviar pulsos de aire a través de una pipeta con el estímulo (2 μ L del compuesto) impregnado en un papel filtro (2 x 2cm).

Esta técnica de quimiorrecepción es de gran utilidad al ser usada como detección -en paralelo con otros detectores- en separaciones de mezclas por cromatografía de gases para determinar qué compuestos orgánicos volátiles presentan actividad electrofisiológica en los insectos.⁶² Sin embargo, los estudios preliminares presentados en el presente documento corresponden únicamente a la evaluación de patrones puros debido a que no se logró realizar el acople de este detector al cromatógrafo.

4.2.2 Respuestas de comportamiento del *S. aloeus* frente a los VOCs

Se evaluaron las respuestas de comportamiento del *S. aloeus* frente a VOCs macho-específicos, mediante un olfatómetro de dos vías diseñado por Cenipalma especialmente para el insecto-plaga de estudio. Dicho olfatómetro consistió en un tubo de vidrio en "Y" de 5 cm de diámetro interno, 45 cm de longitud, brazos de 35 cm, con un ángulo en "Y" de 60°. A los extremos de cada brazo se conectaron cámaras de vidrio con estímulos olfativos o solventes de control mediante mangueras de teflón (**Figura 4-3**).

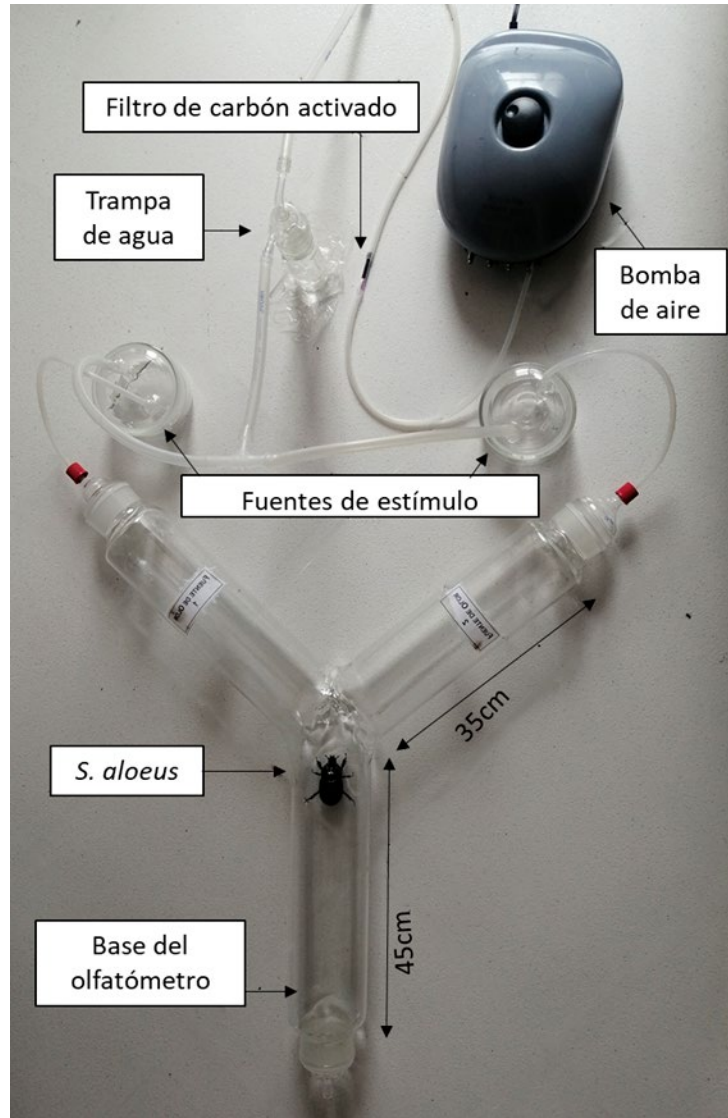


Figura 4-3. Olfatómetro de dos vías utilizado en la evaluación de la respuesta de *S. aloeus* frente a las fuentes de olor macho-específicos. Foto: V. Vidal-Medina.

Las fuentes de olor evaluadas correspondieron a diluciones en hexano grado HPLC (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) de VOCs macho-específicos identificados en el **Capítulo 3 (Tabla 4-1)**. Las diluciones fueron preparadas en concentraciones acordes con la relación a la cual dichos VOCs fueron detectados en las glándulas.

Los bioensayos fueron realizados en un cuarto oscuro durante el horario de mayor actividad reportado para esta especie (2:00-5:00 h),²⁶ en presencia de luz roja, a temperatura y humedad relativa ambiente ($26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\text{ \%} \pm 10\text{ \% HR}$) y un flujo de aire (1 L/min) humedecido y filtrado con una trampa de agua y carbón activado, respectivamente, previo a su paso por las cámaras con las fuentes de olor.

Cada bioensayo consistió en comparar la respuesta del insecto frente al estímulo de una fuente de olor (2 μL del VOC) versus el solvente de dilución como control (hexano). Para las fuentes de olor y de control de cada bioensayo, en cada recámara, se dispusieron papeles de filtro (1,5 cm x 1,5 cm) humedecidos con las soluciones y dejados evaporar durante 10 segundos.

Para cada bioensayo se utilizaron diferentes insectos adultos. Antes de cada jornada de experimentación, los individuos se acondicionaron individualmente en cajas plásticas, en un cuarto libre de olor, y fueron privados de alimentación durante 24 h. El individuo de estudio (macho o hembra de *S. aloeus*), fue introducido en la base del tubo del olfatómetro y su comportamiento se observó durante 15 minutos. Se consideró que la selección de una fuente de olor era positiva cuando el insecto atravesaba 5 cm de un brazo del olfatómetro y permanecía en este por lo menos 2 minutos. Los individuos que no realizaron ninguna selección durante este tiempo no se incluyeron en el análisis estadístico. Cada bioensayo se realizó con un número de machos y hembras que osciló entre 20 y 28 individuos de cada sexo por fuente de olor evaluada. Entre cada bioensayo el sistema se aireó durante 2 minutos con un flujo de aire alto (20 L/min).

Tabla 4-1. Control y estímulos olfativos probados para los bioensayos de *S. aloeus*.

N° Bioensayo	Fecha	Número de insectos del <i>S. aloeus</i>		VOC (ppm)	Control
		Machos	Hembras		
1	14/10/2020	3	1	2,4,7,9-Tetrametil-5-decin-4,7-diol (2500ppm)	Hexano
2	16/10/2020	8	0		
3	19/10/2020	0	10		
4	21/10/2020	7	0		
5	23/10/2020	0	8		
6	26/10/2020	10	0		
7	28/10/2020	0	9		
8	13/11/2020	10	0	Acetato de <i>sec</i> -butilo (1467ppm)	
9	15/11/2020	0	10		
10	16/11/2020	10	0		
11	18/11/2020	0	10	4-Metiloctanoato de etilo (367 ppm)	
12	20/11/2020	9	0		
13	23/11/2020	0	10		
14	26/11/2020	11	0		
15	27/11/2020	0	10		
16	8/12/2020	10	0	2,4,7,9-Tetrametil-5-decin-4,7-diol (2500ppm) + acetato de <i>sec</i> -butilo (1467) + 4-metiloctanoato de etilo (367ppm)	
17	10/12/2020	0	10		
18	11/12/2020	10	0		
19	12/12/2020	0	8		
20	13/12/2020	10	0		
21	14/12/2020	0	10		

Con el fin de comparar la respuesta binaria de los insectos de *S. aloeus* frente a las fuentes de olor, los resultados de la elección de cada insecto obtenidos de las medidas olfatómetricas en el olfatómetro de dos vías fueron analizados mediante la prueba estadística chi-cuadrado con Excel. Como hipótesis nula se consideró una distribución 50:50, es decir una respuesta de los individuos igual frente a las dos fuentes de olor. Los individuos que no realizaron ninguna elección no se incluyeron en el análisis estadístico.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Evaluación preliminar de respuestas electrofisiológicas del *S. aloeus* frente a VOCs de su hospedero y de conespecíficos

Las **Figuras 4-4** y **4-5** presentan electroantenogramas obtenidos para tres individuos distintos, en donde se puede apreciar que el tipo de respuesta obtenida al evaluar las antenas de dos machos y un hembra frente a alícuotas de 2 μ L de 2-butanona, 3-pentanona y acetato de *sec*-butilo puros. Preliminarmente, se observa que la respuesta a los compuestos probados es superior que la respuesta obtenida para el pulso de aire y por lo tanto sugieren que las antenas de *S. aloeus* respondieron a los VOCs evaluados.

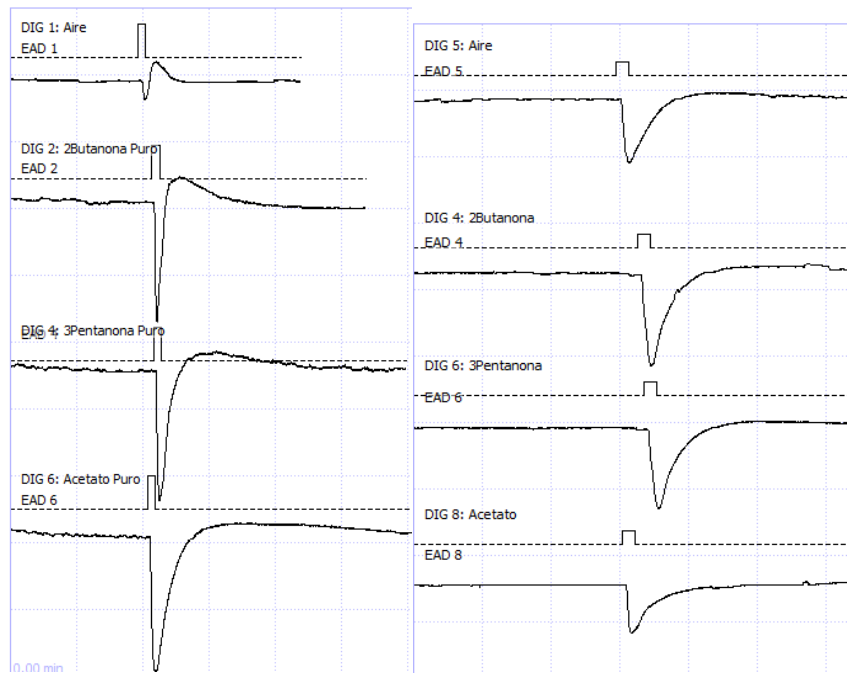


Figura 4-4. Electroantenogramas obtenidos para dos individuos machos de *S. aloeus* en respuesta de pulsos de aire, 2-butanona, 3-pentanona y acetato de *sec*-butilo.

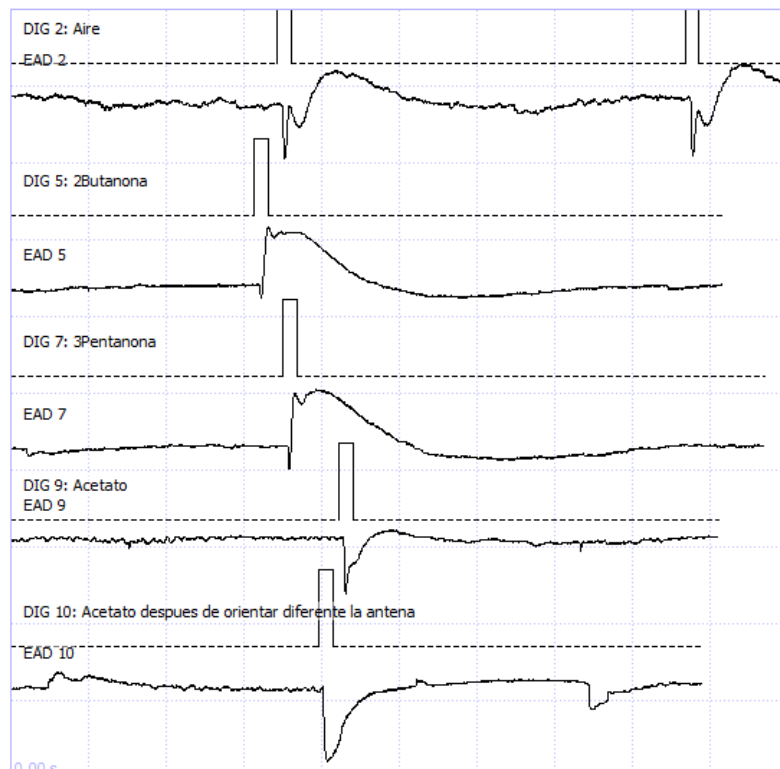


Figura 4-5. Electroantenogramas obtenidos para una hembra de *S. aloeus* en respuesta de pulsos de aire, 2-butanona, 3-pentanona y acetato de *sec*-butilo.

Los electroantenogramas muestran que posiblemente existe un estímulo de estos compuestos en la antena del insecto. Sin embargo, vale la pena aclarar que, si bien mediante los ensayos realizados se puede observar una actividad de los compuestos estudiados, es necesario realizar pruebas comportamentales para conocer el efecto de los compuestos en las respuestas de comportamiento del insecto-plaga.

Finalmente, aunque es necesario realizar varios experimentos con una población significativa de insectos para poder proporcionar resultados concluyentes y estadísticamente válidos para este tipo de experimentos, mediante las evaluaciones preliminares de las respuestas electrofisiológicas realizadas por el procedimiento *Puff* de EAG, logró evidenciarse que las cetonas, identificadas en la palma de aceite, y el éster identificado en machos de *S. aloeus* y reportados por Roachat *et al.* generan un estímulo eléctrico en los sensores de las antenas de esta especie-plaga.

4.3.2 Respuestas de comportamiento del *S. aloeus* frente a potenciales constituyentes de su feromona

Los resultados obtenidos para las pruebas chi-cuadrado de las respuestas olfatométricas de los individuos de cada sexo frente a las cuatro fuentes de olor evaluadas en la presente investigación se presentan a continuación (**Tabla 4-2**).

Tabla 4-2. Pruebas chi-cuadrado de las respuestas olfatométricas

No	Bioensayo	Machos					Hembras				
		F	C	SR	T	P	F	C	SR	T	P
1	2,4,7,9-Tetrametil-5-decin-4,7-diol (2500ppm)	15	5	8	28	0,0253	15	3	10	28	0,0047
2	Acetato de <i>sec</i> -butilo (1467ppm)	10	2	8	20	0,0209	11	2	7	20	0,0125
3	4-Metiloctanoato de etilo (367ppm)	15	3	2	20	0,0047	12	2	6	20	0,0075
4	2,4,7,9-Tetrametil-5-decin-4,7-diol (2500ppm) + Acetato de <i>sec</i> -butilo (1467ppm) + 4-Metiloctanoato de etilo (367ppm)	17	4	9	30	0,0046	16	6	5	27	0,0330

F: Fuente, C: Control, SR: Sin respuesta, T: Total, P: Significancia estadística

Por su parte los porcentajes de las respuestas olfatométricas de los machos y hembras de *S. aloeus* frente a los tres compuestos macho-específicos evaluados por separado y a la mezcla estos se evidencian enseguida (**Figura 4-6**):

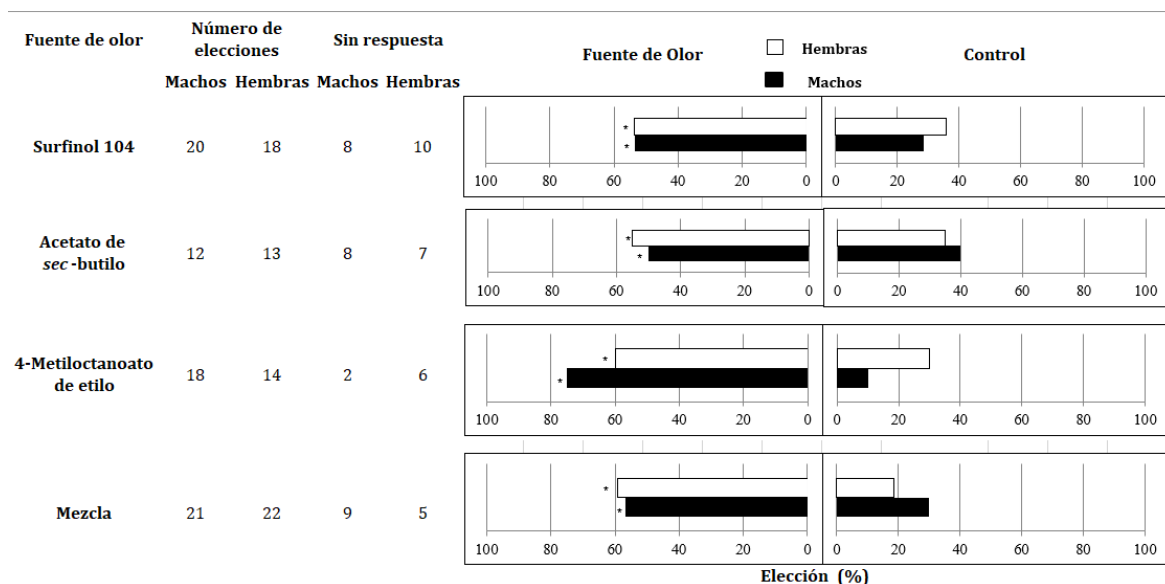


Figura 4-6. Porcentaje de machos y hembras de *S. aloeus* que responden a fuentes de olor provenientes de sus conespecíficos machos. En cada bioensayo el asterisco (*) indica que la elección es significativa estadísticamente según se establece por la prueba binomial de chi-cuadrado con el 95% de confiabilidad.

El 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, el acetato de *sec*-butilo y el 4-metiloctanoato de etilo individualmente, así como la mezcla de los tres, fueron significativamente atrayentes para ambos sexos de *Strategus aloeus* ($P < 0,005$, **Figura 4-6**).

Por otro lado, la evidencia de la atracción del 4-metiloctanoato de etilo hacia ambos sexos de *S. aloeus* refuerza la hipótesis de que este VOC sea uno de los constituyentes de su feromona de agregación, ya que, además, ha sido previamente reportado como constituyente de la

feromona de especies de escarabajos pertenecientes a la misma tribu (Oryctini) que el *S. aloeus*, presentando atracción para ambos sexos.^{178,180}

Finalmente, los resultados aquí obtenidos sugieren proponer por primera vez al 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol como semioquímico componente de una feromona de agregación macho-específica por presentar una atracción significativa para ambos sexos de *S. aloeus* ($P=0,0253$ $P=0,0047$, para machos y hembras respectivamente).

Como se observó, los tres VOCs evaluados por separado y en mezcla en las proporciones encontradas en las glándulas de machos presentan atracción significativa hacia ambos sexos de *S. aloeus*. Como se presentó en la sección anterior, el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, el acetato de *sec*-butilo y el 4-metiloctanoato de etilo fueron detectados e identificados como VOCs de origen macho-específico en una proporción de 58:34:8. Lo anterior sugiere el papel de estos compuestos como componentes de la feromona de agregación del escarabajo-plaga de estudio. De hecho, se ha reportado ampliamente que para los coleópteros pertenecientes a la familia Scarabaeidae, los machos producen feromonas de agregación, las cuales producen el efecto de agregación para ambos sexos de la especie y son utilizadas por los insectos tanto para el apareamiento, así como para la localización de su hospedero.^{103,189,190} Los resultados anteriores son promisorios teniendo en cuenta que, bajo condiciones de campo, la mezcla de los tres constituyentes de la feromona de agregación de *S. aloeus* reportados por Rochat *et al.* (2000) no produjeron el fenómeno de agregación y no resultaron atrayentes para ambos sexos de esta especie y por tanto, se propuso la presente investigación.²⁷

Con el fin de corroborar la hipótesis de los tres VOCs anteriores como semioquímicos constituyentes de la feromona del escarabajo-plaga de la palma de aceite, se sugiere realizar una evaluación comportamental en el olfatómetro en "Y" de la mezcla libre de solvente y bioensayos de atracción en campo.

4.4 Conclusiones

- Se logró establecer una respuesta electrofisiológica en las antenas de ambos sexos de *S. aloeus* frente a 2-butanona y a 3-pentanona, cetonas identificadas en la palma de aceite y frente a acetato de *sec*-butilo, VOC macho-específico de la especie.
- A partir de los resultados obtenidos en la evaluación del comportamiento de individuos de *S. aloeus* frente a los tres VOCs macho-específicos identificados (2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, 4-metiloctanoato de etilo y acetato de *sec*-butilo) se sugiere su participación como semioquímicos de la especie, específicamente como componentes de su feromona.
- Por primera vez se sugiere al 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol como semioquímico de un insecto, específicamente como componente de la feromona del *S. aloeus*. Sin embargo, para confirmar esta función se requiere realizar su evaluación a través de bioensayos de atracción en campo.

5. Conclusiones generales y perspectivas

5.1 Conclusiones

- Se caracterizó el perfil de volátiles del estípite de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), hospedero natural del *Strategus aloeus* y se estableció la participación de la 2-butanona y la 3-pentanona en la interacción planta-insecto.
- Se logró establecer que el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, el 4-metiloctanoato de etilo y el acetato de *sec*-butilo, detectados en las glándulas en una proporción 58:34:8, son VOCs macho-específicos que podrían ser responsables de la interacción insecto-insecto del *Strategus aloeus*.
- Se identificó por primera vez el 2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol como un compuesto de origen natural, específicamente en machos adultos de *Strategus aloeus*.
- En la comunicación del *Strategus aloeus* participan compuestos orgánicos volátiles provenientes de su hospedero (caimomas) y del propio insecto (feromona macho-específica). Los semioquímicos identificados en este estudio podrían ser empleados como atrayentes en trampas para la detección, el monitoreo y el manejo de este insecto-plaga en cultivos de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq.

5.2 Perspectivas

- Complementar los estudios de la respuesta del *S. aloeus* frente a los VOCs macho-específicos en mezcla sin solvente.
- Evaluar el efecto de las potenciales caimomas identificadas con la mezcla de los VOCs macho-específicos.
- Evaluar en campo los VOCs identificados en esta investigación y definir las condiciones requeridas para ser empleados en trampas para la captura del *Strategus aloeus* en cultivos de palma de aceite.

5.3 Presentaciones en Congresos

- **Vidal-Medina, V.**; Morales, A; Bustillo A.; Aldana, A.; Chegwin, C., Sierra, C.; Bento, M. Romero-Frías, A. Volátiles de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) que median la comunicación del *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). Poster. XVI Reunión Técnica Nacional de Palma de Aceite. 2020, Bogotá, D. C., Colombia.

- **Vidal-Medina, V.**; Morales, A; Bustillo A.; Aldana, A.; Chegwin, C., Sierra, C.; Bento, M. Romero-Frías, A. Volátiles de la palma de aceite que median la comunicación del *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae). MIP-O-35. Castillo-Velandia, D. R.; Vargas-Orozco, G. A.; Vidal-Gómez, U.; Tirado-Pinzón, H. Y. (Comp.). 2020. Memorias Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 47 Congreso SOCOLEN. Congreso virtual. Sociedad Colombiana de Entomología. 8 y 9 de octubre de 2020, Bogotá, D. C., Colombia. 221 p.
Trabajo seleccionado para concursar por el premio a mejor trabajo presentado por profesionales "Premio Nacional de Entomología Hernán Alcaráz Viecco".
- **Vidal-Medina, V.**; A.; Bustillo A.; Aldana, A.; Chegwin, C., Sierra, C.; Bento, M.; D. Peña; D. Sinuco; Y. Murata; Romero-Frías. Use of pheromones in pest control in commercial crops in Colombia. XI EBEQ. Brazilian Meeting on Chemical Ecology. October 23-26. 2019.
- **Vidal-Medina, V.**; Bustillo A.; Aldana, A.; Chegwin, C., Sierra, C.; Bento, M.; Rodríguez, A.; Romero-Frías, A. Ecología química del escarabajo-plaga *Strategus aloeus* para su manejo en cultivos de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. Simposio Plagas Asociadas a Cultivos de Palmas de Importancia Económica en Colombia. Guarín-Molina, JH.; Giraldo-Sánchez, C.E.; Jaramillo-González, J.L. (Comp.) 2019. Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Memorias & Resúmenes. 46 Congreso SOCOLEN. Medellín, 17, 18 y 19 de julio de 2019. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. USB. Medellín, Colombia. 255-259. ISSN: 2389-7694
- **Vidal-Medina, V.**; Bustillo A.; Aldana, A.; Chegwin, C., Sierra, C.; Bento, M. Romero-Frías, A. Señalización química en la interacción entre la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) y el *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). MIP-O-35. Guarín-Molina, JH.; Giraldo-Sánchez, C.E.; Jaramillo-González, J.L. (Comp.) 2019. Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Memorias & Resúmenes. 46 Congreso Socolen. Medellín, 17, 18 y 19 de julio de 2019. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. USB. Medellín, Colombia. 552. ISSN: 2389-769

A. Anexo: Permiso fitosanitario



Libertad y Orden
República de Colombia
Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible

AUTORIDAD NACIONAL DE LICENCIAS AMBIENTALES - ANLA -

RESOLUCIÓN N° 02431

(24 de diciembre de 2018)

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial y se toman otras determinaciones"

EL SUBDIRECTOR DE INSTRUMENTOS, PERMISOS Y TRÁMITES AMBIENTALES DE LA AUTORIDAD NACIONAL DE LICENCIAS AMBIENTALES – ANLA

En uso de las facultades conferidas en la Ley 99 de 1993, el Decreto Ley 3573 de 2011, el Decreto 1076 de 2015, las Resoluciones 0966 de 2017 y 1603 de 2018, y

CONSIDERANDO

Que mediante comunicación radicada con número 2018117896-1-000 del 29 de agosto de 2018, la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA, con NIT. 800.145.882-4, presentó solicitud de Permiso Individual de Recolección de Especímenes Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica no Comercial, para la ejecución del proyecto denominado "*Plagas y Enfermedades de la Palma de Aceite en Colombia*", a desarrollarse en los departamentos de Bolívar, Casanare, Cesar, Cundinamarca, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander y Santander.

Que una vez evaluada la documentación allegada por la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA, el área técnica de la Subdirección de Instrumentos, Permisos y Trámites Ambientales de esta Autoridad, emitió el Concepto Técnico 7244 del 28 de noviembre de 2018, el cual hace parte del presente acto administrativo, en el que concluyó que es viable otorgar el Permiso Individual de Recolección de Especímenes Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica no Comercial, en los términos y condiciones que se señalarán en la parte resolutive de la presente Resolución.

CONSIDERACIONES JURÍDICAS

Que el artículo 51 del Decreto Ley 2811 de 1974, señala que el derecho de usar los recursos naturales renovables puede ser adquirido por ministerio de la ley, permiso, concesión y asociación.

Que los artículos 56 y siguientes del referido Decreto, tratan del permiso para el estudio de recursos naturales.

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

Que de acuerdo con el artículo 12 de la Ley 165 de 1994, por la cual se aprueba el Convenio sobre Diversidad Biológica, los Estados Parte deben promover y fomentar la investigación que contribuya a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica.

Que el artículo 2.2.2.8.1.5 del Decreto 1076 de 2015¹, señala las modalidades bajo las cuales puede otorgarse un Permiso de Recolección, encontrándose entre estas, el Permiso Individual de Recolección, el cual establece en el artículo 2.2.2.8.3.1 *ibidem*, que las personas naturales o jurídicas que pretendan recolectar especímenes para adelantar un proyecto de investigación científica no comercial, deberán obtener un Permiso Individual de Recolección.

Que el artículo 2.2.2.8.3.3., de la norma en mención, señala las obligaciones que debe cumplir el titular del Permiso Individual de Recolección que las personas naturales o jurídicas nacionales o extranjeras ante la autoridad ambiental competente.

Que de conformidad con el artículo 2.2.2.8.3.4 del Decreto 1076 de 2015, esta Autoridad, podrá solicitar al titular del Permiso Individual de Recolección, ajustar el número total de muestras, frecuencia de muestreo, sitios de muestreo, entre otros aspectos, de manera sustentada, por considerar que la recolección puede afectar las especies o los ecosistemas en razón de la sobre-colección, impactos en lugares críticos para la reproducción, afectación de ciclos biológicos, dieta, entre otras.

Que el Artículo 2.2.2.8.6.5. *ibidem* señala que, como estímulo a la investigación científica, las autoridades competentes no realizarán ningún cobro de los servicios de evaluación y seguimiento a los Permisos de Recolección.

Que efectuadas las anteriores consideraciones y acogiendo la recomendación del Concepto Técnico 7244 del 28 de noviembre de 2018, esta Autoridad considera que es VIABLE otorgar a la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - CENIPALMA Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, en los términos que se indicarán en la parte resolutoria del presente acto administrativo.

Que es importante precisar que, de conformidad con el artículo 74 de la Ley 1437 de 2011, el cual determina que "Por regla general, contra los actos definitivos procederán los siguientes recursos: 1. El de reposición, ante quien expidió la decisión para que la aclare, modifique, adicione o revoque..."; resulta conducente disponer la procedencia del recurso de reposición contra el presente provvedimento, por tratarse de un acto administrativo que ostenta la condición de definitivo, toda vez que resuelve de fondo adoptando una decisión.

COMPETENCIA DE ESTA AUTORIDAD

Que el Decreto Ley 3573 del 27 de septiembre de 2011, creó la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, y en el numeral 1° del artículo 3° le asignó la función de otorgar o negar las licencias, permisos y trámites ambientales de competencia del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, de conformidad con la ley y los reglamentos.

Que el numeral 2° del artículo 10° del Decreto Ley 3573 del 27 de septiembre de 2011, asignó al Despacho del Director General la función otorgar o negar las licencias, permisos y trámites ambientales.

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

trámites ambientales para definir la viabilidad ambiental de los proyectos, obras o actividades.

Que mediante Resolución 00966 del 15 de agosto del 2017, la Dirección General de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, delegó entre otras funciones en el numeral 3° del artículo 3°, a la Subdirección de Instrumentos, Permisos y Trámites Ambientales, la de otorgar o negar los Permisos de Estudio para la Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial.

Que en mérito de lo expuesto,

RESUELVE

ARTÍCULO PRIMERO. - Otorgar a la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA, identificada con NIT. 800.145.882-4, Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, para el proyecto denominado "Plagas y Enfermedades de la Palma de Aceite en Colombia", de conformidad con lo expuesto en la parte motiva del presente acto administrativo.

PARÁGRAFO. - El Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial que se otorga en este acto administrativo, tendrá una vigencia de cinco (5) años, contados a partir de la ejecutoria del presente acto administrativo.

ARTÍCULO SEGUNDO. - El Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, ampara la recolección y movilización de especímenes de especies silvestres de la biodiversidad dentro del territorio nacional, que sean realizadas dentro del desarrollo del proyecto "Plagas y Enfermedades de la Palma de Aceite en Colombia", y de acuerdo con lo establecido en el Formato de Solicitud de Permiso Individual de Recolección radicado bajo los números 2018117896-1-000 del 29 de agosto de 2018 y 2018159499-1-000 y 2018159608-1-000 del 16 de noviembre de 2018 y demás información técnica adicional presentada por la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - CENIPALMA.

ARTÍCULO TERCERO. -Teniendo en cuenta las consideraciones realizadas en el Concepto Técnico 7244 del 28 de noviembre de 2018, adjunto al presente acto administrativo, y el Formato de Solicitud de Permiso Individual de Recolección radicado, la metodología de recolección de especímenes y muestras de la biodiversidad que se autoriza es la siguiente:

Metodología para la recolección de especímenes
En el desarrollo del proyecto de investigación: "Plagas y enfermedades de la palma de aceite en Colombia", se llevarán a cabo colectas de muestras de tejido vegetal, suelo e insectos de la siguiente manera:
PLAGAS DE LA PALMA: Recolección de insectos.
Se realizarán inspección visual de los lotes previamente definidos. Se determinará e identificará la presencia de los diferentes estados de los insectos. Se evaluará el porcentaje de ataque de los insectos a las palmas, diseccionando las mismas en las áreas afectadas.
Igualmente, se llevarán a cabo captura manual de insectos (cuando el estado) usando jarras y trampas de

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

Metodología para la recolección de especímenes

Respecto a la identificación de parásitos naturales, se harán observaciones frecuentes en lotes identificado previamente. Para la prueba de parasitoides se coleccionarán insectos (cualquier estado), con el fin de determinar los insectos u hongos que están controlando las plagas.

También, se muestrearán las plantas nectaríferas que han sido sembradas cerca de las palmas de aceite. Sobre estas, con una jama se tomarán las muestras mediante 10 pases dobles por planta. Los muestreos se realizarán cada hora con el fin de establecer el periodo de mayor actividad de estos.

Así mismo, se tomarán muestras para determinación taxonómica de las plantas nectaríferas: esquejes, flores y frutos. Cada muestra se prensará, alcoholizará y rotulará.

En general para insectos, se coleccionarán hasta 20 individuos semanalmente para los siguientes ordenes taxonómico: Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera y Hemiptera.

ENFERMEDADES DE LA PALMA

Se recolectarán muestras de tejido vegetal afectado para aislar microorganismos y determinar posibles agentes causales de enfermedades en las palmas aceite. Se tomarán hasta 6 muestras por planta y cada una de estas tendrá un área de entre 5 a 20cm².

- Para aislar hongos y bacterias se toman muestras de tejidos de zonas de avance de la enfermedad.
- Para aislar virus y viroides se toman muestras de tejidos con síntomas severos y tejidos en zonas de crecimiento.
- Para determinar organismos desconocidos causante de la marchitez letal: se toman muestras de plantas enfermas, asintomáticas y sanas.
- Para otros patógenos como fitoplasmas y protozoarios flagelados se toman muestras de tejidos asociada con el sistema vascular de las plantas afectadas.
- Adicionalmente, para los protozoarios flagelados se toman muestras de raíces y de tejidos tiernos del cogollo, como también muestras al interior de los insectos con el fin de identificar fitoplasmas.
- Para coleccionar nematodos se toman muestras de suelos (1kg), raíces y estípites con lesiones en palmas enfermas.

Las muestras serán transportadas refrigeradas a los laboratorios de CENIPALMA para aislar los microorganismos, determinarlos y desarrollar pruebas de patogenicidad.

MICROORGANISMOS DEL SUELO: Toma de Muestras para Aislar Microorganismos.

Las muestras de suelo se tomarán a la profundidad de 25cm usando un barrenos - sacabocados y cada muestra será de 1kg por palma afectada.

Las muestras serán transportadas refrigeradas a los laboratorios de CENIPALMA para aislar los microorganismos, determinarlos y desarrollar pruebas de regulación biológica frente a los organismos causantes de enfermedades en palma de aceite.

ARTÍCULO CUARTO: Las localidades para la recolección de especímenes y muestras de la biodiversidad que se autorizan son las que se presentan en el **Anexo 1** del Concepto Técnico 7244 del 28 de noviembre de 2018.

ARTÍCULO QUINTO: La cantidad de individuos y muestras de la biodiversidad que se autorizan son:

Nombre Científico	Tipo de muestra	No. Localidad	Cantidad de especímenes a recolectar
Orden Pythiales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Peronosporales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

Nombre Científico	Tipo de muestra	No. Localidad	Cantidad de especímenes a recolectar
Orden Hypocreales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Phylacthales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Diaportales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Xylariales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Helotiales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Mycosphaerellales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Pleosporales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Agaricales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Uredinales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Ustilaginales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Moniliales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Micelia esterilia	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Sphaeropsidales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Melanconiales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Género Pseudomonas	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Género Xanthomonas	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Género Erwinia	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Género Bacillus	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Género Clavibacter	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Género Xylella	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes

Resolución No. 02431

Del 24 de diciembre de 2018

Hoja No. 6 de 11

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

Nombre Científico	Tipo de muestra	No. Localidad	Cantidad de especímenes a recolectar
Orden Tylorrhiza	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Aphelenchida	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Rhabditida	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Dorylaimida	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Polyponales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Familia Tripanosomatidae	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Clase Mollicutes	Tejido vegetal afectado por microorganismos y tejidos internos de insectos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes 20 insectos 4 veces al mes
Virus-viroides	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Clase Comycetes	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Familia Clavicipitaceae	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Familia Cordycipitaceae	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Familia Ophiocordycipitaceae	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Lepidoptera	Individuo completo	Todas	20 individuos / Semana
Orden Hymenoptera	Individuo completo	Todas	20 individuos / Semana
Orden Coleoptera	Individuo completo	Todas	20 individuos / Semana
Orden Diptera	Individuo completo	Todas	20 individuos / Semana
Orden Orthoptera	Individuo completo	Todas	20 individuos / Semana
Orden Hemiptera	Individuo completo	Todas	20 individuos / Semana
<i>Elaeis guineensis</i>	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
<i>Elaeis guineensis</i> x <i>Elaeis oleifera</i>	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
<i>Elaeis oleifera</i>	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras de tejido vegetal por palma, dos veces al mes
Especies cultivables tales como cacao (<i>Theobroma cacao</i>), coco (<i>Coco sp.</i>) o mango (<i>Mangifera indica</i>).	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras de tejido vegetal por palma, dos veces al mes
Orden Fabales	Esquejes, flores y frutos.	Todas	6 muestras por planta, una vez al mes
Orden Malvales	Esquejes, flores y frutos.	Todas	6 muestras por planta, una vez al mes
Orden Malpighiales	Esquejes, flores y frutos.	Todas	6 muestras por planta, una vez al mes

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

Nombre Científico	Tipo de muestra	No. Localidad	Cantidad de especímenes a recolectar
Orden Lamiales	Esquejes, flores y frutos.	Todas	6 muestras por planta, una vez al mes
Orden Poales	Esquejes, flores y frutos.	Todas	6 muestras por planta, una vez al mes

ARTÍCULO SEXTO. – El cronograma planteado para llevar a cabo la recolección de individuos y muestras en las localidades autorizadas es la realización de muestreos semanales para la colecta de insectos y quincenales para de muestras de tejido de palma de aceite, otras especies vegetales y suelo, aclarándose que los muestreos no se harán en todas las localidades objeto de estudio todo el tiempo, sino que estos dependerán de las áreas de estudio donde se presenten focos de infección o se lleven a cabo diseños de experimentos.

PARAGRAFO. La Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENPALMA deberá, con antelación, mediante comunicación escrita o correo electrónico, informar a la ANLA sobre su desplazamiento a las áreas de estudio y la fecha prevista para realizar las actividades autorizadas y sobre los especímenes que serán objeto de recolección y movilización. Dicha comunicación, junto con la copia del Permiso Individual de Recolección, deberá ser portada por los investigadores cuando realice las actividades de recolección en campo.

ARTÍCULO SÉPTIMO. – Las rutas de movilización para el posterior traslado de muestras biológicas, hasta ser depositadas en una colección registrada ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt durante la vigencia del Permiso, que se autorizan son las siguientes:

Origen	Destino	Modo de transporte	Fecha (Tentativa)
Bolívar: San Pablo, Similití, San Juan de Nepomuceno, Zambrano, El Peñón, Regidor, Morales, Zambrano	Barrancabermeja: Campo Terrestre Experimental Palmer de la Vizcaina	Terrestre	Microorganismos: todos los meses, los días 1, 2, 3, 15, 16 y 17 por localidad. Insectos: todos los meses, los días 1, 2, 7, 8, 14, 15, 21 y 22 de cada mes por localidad. Plantas nectaríferas y de cobertura: entre los días 12 y 18 de cada mes por localidad
Cesar: Agustín Codazzi, Becerril, Bosconia, Chimichagua, Curumani, Gamarra, La Paz, Palfitas, Pelaya, Tamalameque	Zona Bananera: Campo Experimental Palmer de la Sierra	Terrestre	
Cesar: Aguachica, La Gloria, San Alberto, San Martín, La Paz, Río de Oro, El Capuy	Barrancabermeja: Campo experimental Palmer de la Vizcaina Zona Bananera: Campo Experimental Palmer de la Sierra	Terrestre	
Magdalena: Algarrobo, Aracataca, Ariguaní, El Rosal, Pivijay, Pueblo Viejo, Sabanas del Ángel, Zona Bananera	Zona Bananera: Campo Experimental Palmer de la Sierra	Terrestre	
Norte de Santander: La Esperanza	Barrancabermeja: Campo experimental Palmer de la Vizcaina	Terrestre	
Santander: Barrancabermeja, Lebrija, El Carmen, Puerto Wiches, Río Negro, Sabana de Torres, San Vicente del Chicuri, Simacota	Barrancabermeja: Campo experimental Palmer de la Vizcaina	Terrestre	
Cundinamarca: Paratebuena	Paratebuena: Campo Experimental Palmer de las Corcoras	Terrestre	

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

Origen	Destino	Modo de transporte	Fecha (Tentativa)
Puerto López, Restrepo, San Carlos de Guaroa, San Martín, Villavieja.			todos los meses, los días 1, 2, 3, 15, 16 y 17 por localidad.
Nariño: Tumaco	Tumaco: Finca La Providencia	Terrestre	Insectos: todos los meses, los días 1, 2, 7, 8, 14, 15, 21 y 22 de cada mes por localidad. Plantas nectaríferas y de cobertura: entre los días 12 y 18 de cada mes por localidad

ARTÍCULO OCTAVO. – El responsable del proyecto y el grupo de trabajo que se autoriza es:

Investigador	Identificación:	Formación académica	Participación en el Proyecto	
			Responsable	Grupo de trabajo
Grelcy Andrea Santa Villa	CC 48.572.256	Ingeniería Agronómica	X	
Carlos Mauricio Arango Unbe	CC 75.100.011	Ingeniería Agronómica		X
Carlos Enrique Barrios Trilleras	CC 1.110.463.33	Ingeniería Agronómica		X
William Fabian Betancur	CC 1.069.725.466	Ingeniero Agrónomo		X
Natalia Julieth Castillo Villarrago	CC 1.113.637.847	Ingeniero Agrónomo		X
Jesus Aney Matabanchoy	CC 18.147.685	Ingeniería Agronómica		X
Héctor Camilo Medina Cárdenas	CC 1.090.470.989	Ingeniería Agronómica		X
Yuri Adriana Meztizo Garzón	CC 1.069.717.832	Ingeniería Agronómica		X
Luis Guillermo Montes Bezurto	CC 80.819.682	Ingeniería Agronómica		X
Fabian Alexander Moreno Gavilja	CC 94.464.332	Ingeniería Agronómica		X
Rosa Cecilia Aidana de la Torre	CC 31.952.702	Biología		X
Carmenza Montoya Jaramilo	CC 66.725.139	Biología		X
Kelly Ávila	CC 52.844.347	Biología		X
Mariana Herrera Corzo	CC 1.026.263.738	Biología		X
María Camila Rodríguez Cruz	CC 1.023.826.781	Microbiología		X
Catalina Chávez Sierra	CC 1.032.439.886	Microbiología		X
Sandra Yuleth Castillo Corredor	CC 53.090.890	Ingeniería Agronómica		X
Carlos Andrés Sendoya Corrales	CC 1.113.629.884	Ingeniería Agronómica		X
Diana Carolina Vélez Fernández	CC 1.065.547.359	Microbiología		X

ARTÍCULO NOVENO. – La Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA, deberá cumplir con las siguientes obligaciones:

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

- b) Presentar cinco (5) informes parciales de actividades de recolección relacionados con el permiso, uno por año de vigencia del mismo, donde para la entrega de dichos informes se debe tener en cuenta la fecha de ejecutoria del acto administrativo que otorgó el permiso. Aquí, se debe incluir la relación del material recolectado (número de especímenes) que será entregado a colecciones biológicas de referencia, como el que sea eliminado como residuo posterior a las actividades planteadas a llevarse a cabo en el laboratorio. Igualmente, deberá presentar un informe final de actividades que reúna la totalidad de información recolectada en el desarrollo de las actividades del proyecto de investigación. Los informes se deben presentar de acuerdo con el Formato para la Relación del Material Recolectado del Medio Silvestre, y allegar los mismos en formato digital editable y pdf.
- c) Enviar copia digital de las publicaciones que se deriven del proyecto;
- d) Suministrar al Sistema de Información en Biodiversidad de Colombia (SiB) la información asociada a los especímenes recolectados, y entregar a la autoridad competente la constancia emitida por dicho sistema;
- e) El titular de este permiso será responsable de realizar los muestreos de forma adecuada en términos del número total de muestras, frecuencia de muestreo, sitios de muestreo, entre otros aspectos, de manera que no se afecten las especies o los ecosistemas en razón de la sobre-colección, impactos negativos en lugares críticos para la reproducción, afectación de ciclos biológicos, dieta, entre otras.

ARTÍCULO DÉCIMO. – La Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA, deberá tener en cuenta lo definido en el Capítulo 10² del Título 9 de la Parte 2 del Libro 2 del Decreto 1076 de 2015, referente a la Tasa Compensatoria por Caza de Fauna Silvestre, así como también lo establecido por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible a través del Decreto 1272 del 2016³ y las Resoluciones 1372 del 22 de agosto de 2016⁴ y 0589 del 9 de marzo de 2017⁵.

ARTÍCULO DÉCIMO PRIMERO. – Las investigaciones adelantadas en el marco del proyecto que involucren actividades de sistemática molecular, ecología molecular, evolución y biogeografía, no configuran acceso al recurso genético y por tanto, son actividades amparadas por el Permiso Individual de Recolección.

PARAGRÁFO. – La Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA deberá diligenciar la información correspondiente en el "Formato para la Recolección del Material Recolectado del Medio Silvestre" y presentar los soportes respectivos de la entrega de las publicaciones derivadas del proyecto al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y a esta Autoridad.

ARTÍCULO DÉCIMO SEGUNDO. – Para acceder a los recursos genéticos y/o productos derivados, con fines industriales, comerciales o de prospección biológica de los especímenes recolectados en el marco del Permiso Individual de Recolección, deberá

² Adicionado por el Decreto 1272 del 3 de agosto de 2016 "Por el cual se adiciona un capítulo al Título 9 de la Parte 2 del Libro 2 del Decreto 1076 de 2015, Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo sostenible, en lo relacionado con la tasa compensatoria por caza de fauna silvestre y se dictan otras disposiciones."

³ "Por el cual se adiciona un capítulo al Título 9 de la parte 2 del Decreto 1076 de 2015, Decreto Único Reglamentario del

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

suscribir el contrato de acceso a recursos genéticos y/o productos derivados con el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

ARTÍCULO DÉCIMO TERCERO. – Informar a la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA que, el Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica no Comercial, NO AMPARA la recolección de especímenes de especies silvestres de la Diversidad Biológica con fines industriales, comerciales o de prospección biológica; ni tampoco podrán ser aprovechados con fines comerciales.

ARTÍCULO DÉCIMO CUARTO. – Informar a la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite CENIPALMA que, en caso de requerirse exportación de especímenes o muestras de la diversidad biológica, se deberá atender a lo señalado en las disposiciones para la obtención de un permiso CITES y/o NO CITES, según el caso.

ARTÍCULO DÉCIMO QUINTO. – Esta Autoridad verificará el cumplimiento de las condiciones establecidas en el presente permiso individual de recolección, y, en consecuencia, deberá brindar la información y apoyo logístico necesario para efectuar el seguimiento de las obligaciones y condiciones establecidas en el presente permiso.

ARTÍCULO DÉCIMO SEXTO. – El presente Permiso de Recolección podrá ser suspendido o revocado de conformidad con el artículo 62 de la Ley 99 de 1993, mediante acto administrativo motivado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, de oficio o a petición de parte, en los casos en que el investigador haya incumplido las obligaciones señaladas en el mismo o en la normalidad ambiental vigente. Lo anterior, sin perjuicio de las medidas preventivas y sancionatorias de que trata la Ley 1333 de 2009, y de las acciones civiles, penales y disciplinarias a que haya lugar.

ARTÍCULO DÉCIMO SÉPTIMO. – Notificar el contenido del presente acto administrativo a la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite - CENIPALMA, o a su Apoderado debidamente constituido.

ARTÍCULO DÉCIMO OCTAVO. – Comunicar el contenido del presente acto administrativo al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, al Ministerio del Interior, a Parques Nacionales Naturales de Colombia, al Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; al Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI; a la Asociación de Corporaciones Autónomas Regionales y Desarrollo Sostenible- ASOCARS; a la Corporación Autónoma del Alto Magdalena - CAM; a la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca - CAR; a la Corporación Autónoma Regional de Risaralda - CARDER; a la Corporación Autónoma Regional del Canal del Dique - CARDIQUE; a la Corporación Autónoma Regional de Sucre - CARSUCRE; a la Corporación Autónoma Regional de Santander - CAS; a la Corporación para el Desarrollo Sostenible del Norte y Oriente Amazónico - CDA; a la Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga - CDMB; a la Corporación Autónoma Regional para el Desarrollo Sostenible del Chicó - CODECHOCO; a la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia - CORANTIOQUIA; a la Corporación Autónoma Regional de las Cuencas de los Ríos Negro y Nare - CORNARE; a la Corporación Autónoma Regional del Magdalena - CORPAMAG; a la Corporación Autónoma Regional de Boyacá - CORPOBOYACÁ; a la Corporación Autónoma Regional de Caldas - CORPOCALDAS; a la Corporación Autónoma Regional del Cesar - CORPOCESAR; a la Corporación Autónoma Regional de La Guajira - CORPOGUAJIRA; a la Corporación Autónoma Regional del Guavió - CORPOGUAVIO; a la Corporación

"Por la cual se otorga Permiso Individual de Recolección de Especímenes de Especies Silvestres de la Diversidad Biológica con Fines de Investigación Científica No Comercial, y se toman otras determinaciones"

a la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca – CVC; a la Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge – CVS; a la Corporación para el Desarrollo Sostenible del Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina – CORALINA; a la Corporación Autónoma Regional del Río Grande de la Magdalena – CORMAGDALENA; a la Corporación para el Desarrollo Sostenible del Sur de la Amazonia – CORPOAMAZONIA; a la Corporación para el Desarrollo Sostenible de la Mojana y San Jorge – CORPOMOJANA; a la Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá – CORPOURABA; a la Corporación Autónoma Regional de la Orinoquia – CORPORINOQUIA y a la Corporación para el Desarrollo Sostenible de la Macarena – CORMACARENA.

ARTÍCULO DÉCIMO NOVENO. - Publicar el presente acto administrativo en la Gaceta de esta Entidad.

ARTÍCULO VIGÉSIMO. – Contra este acto administrativo procede el recurso de reposición el cual podrá ser interpuesto con el lleno de los requisitos legales de conformidad con lo establecido en los artículos 74, 76 y 77 de la Ley 1437 de 2011.

NOTIFÍQUESE, COMUNÍQUESE, PUBLÍQUESE Y CÚPLASE

Dada en Bogotá D.C., a los 24 de diciembre de 2018



CARLOS ALONSO RODRIGUEZ PARDO
Subdirector de Instrumentos, Permisos y Trámites Ambientales

Ejecutores
BISIANA CAROLINA GONZALEZ
PEREZ
Abogada



Revisor / LCder
CARMEN LIZETH BOLIVAR
MELENDEZ
Abogada/Contralora



Expediente No. RC0005-00-2018
Concepto Técnico N° 7264 de 28 de noviembre de 2018
Fecha: 11 de diciembre de 2018

Proceso No.: 2018163699

Archivado en: RC0006-00-2018
Ruta: Ruta006-00-11-0002

Bibliografía

- (1) Whittaker, R. H.; Feeny, P. P. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. *Science* (80-.). **1971**, *171*, 757–770.
- (2) Brown, W. L.; Eisner, T.; Whittaker, R. H. Allomones and Kairomones: Transspecific Chemical Messengers. *Bioscience* **1970**, *20* (1), 21–22.
- (3) Font Quer, P. *Diccionario de Botánica*, 9º reimpre.; Editorial Labor, S. A.: Barcelona, 1985.
- (4) Freiría, M.; Alvarez, A.; Lorenzo, R.; Racamonde, F.; Rodríguez, A. Aplicaciones de La Técnica Denominada Espacio de Cabeza. *Rev. Cuba. Química* **1998**, *10*, 32–53.
- (5) Asociación de Academias de la Lengua Española. Real Academia de la Lengua Española <https://dle.rae.es>.
- (6) Oxford University Press. Oxford Languages <https://languages.oup.com/google-dictionary-es/>.
- (7) Barrera, J. F.; Toledo, J.; Infante, F. Manejo Integrado de Plagas : Conceptos y Estrategias. In *Manejo Integrado de Plagas*; Editorial Trillas: México, 2008; pp 13–33.
- (8) FAO. Glosario de términos fitosanitarios de la FAO <http://www.fao.org/3/W3587E/w3587e03.htm>.
- (9) Law, J. H.; Regnier, F. E. Pheromones. *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 533–548.
- (10) Dudareva, N.; Klempien, A.; Muhlemann, J. K.; Kaplan, I. Biosynthesis, Function and Metabolic Engineering of Plant Volatile Organic Compounds. *New Phytol.* **2013**, *198* (1), 16–32.
- (11) Anaya Lang, A. L. *Ecología Química*, 1st ed.; Plaza y Valdés, S.A. de C.V: México D.F., 2003.
- (12) Dangond, I. El Aceite Del Post Conflicto. *El Espectador*. 2015.
- (13) Aguilera, D. M. Palma Africana En La Costa Caribe. In *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional, Centro de Estudios Economicos regionales No 30*; Banco de la Republica: Cartagena de Indias, 2002.
- (14) Fedepalma. La palma de Aceite en Colombia <https://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/infografía-palmadeaceite-colombia-2020.pdf>.
- (15) Cenipalma. Sanidad de la Palma <https://www.cenipalma.org/sanidad/>.
- (16) Aldana-De la Torre, R.; Montes-Bazurto, L. G.; Barrios-Trilleras, C. E.; Matabanchoy-Solarte, J. A.; Beltrán-Aldana, I. J.; Rosero-Guerrero, M.; Bustillo-Pardey, A. E. *Guía de Bolsillo Para El Reconocimiento de Las Plagas Más Frecuentes En La Palma de Aceite*; Cenipalma-Fedepalma-SENA: Bogotá D. C., 2017.
- (17) Genty, P.; Desmier de Chenons, R.; Morin, J.-P. Las Plagas de La Palma Aceitera En América Latina. *Oleagineux* **1978**, *33* (7), 326–420.
- (18) Ahumada, M.; Calvache-Guerrero, H.; Cruz, M.; Luque, J. *Strategus aloeus* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae): Biología y Comportamiento En Puerto Wilches (Santander). *Rev. Palmas* **1995**, *16* (3), 9–16.
- (19) Montesinos, G. A. Estudios Preliminares Para La Determinación de Atrayentes

- Sexuales de *Strategus aloeus* (L.) (Coleoptera:Scarabaeidae) Puerto Wilches (Santander), Instituto Universitario de la Paz Barrancabermeja, Colombia, 1999.
- (20) Aldana-De la Torre, R.; Aldana-De la Torre, J. A.; Calvache-Guerrero, H. H.; Franco-Bautista, P. N. *Manual de Plagas de La Palma de Aceite En Colombia*, Cuarta Edi.; Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma- SENA-: Bogotá D. C., 2010.
- (21) Aldana, J.; Pallares, C.; Correa, N. Control Químico de *Strategus aloeus* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Ceniavances*. 2000, pp 1–4.
- (22) Bergmann, J.; González, A.; Zarbin, P. H. G. Insect Pheromone Research in South America. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20* (7), 1206–1219.
- (23) Villanueva Mejía, D. F.; Saldamando Benjumea, C. I. *Tecia Solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): Una Revisión Sobre Su Origen, Dispersión y Estrategias de Control Biológico. *Ing. y Cienc.* **2013**, *9* (18), 197–214.
- (24) Karlson, P.; Butenandt, A. Pheromones (Ectohormones) in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **1958**, *4*, 39–58.
- (25) Romero-Frías, A. A. Estudio de Los Semioquímicos Responsables de La Interacción Entre La Guayaba (*Psidium guajava* L.) y El Picudo de La Guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall, Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- (26) Rochat, D.; Ramirez-Lucas, P.; Malosse, C.; Aldana-De la Torre, R. C.; Kakul, T.; Morin, J. P. Role of Solid-Phase Microextraction in the Identification of Highly Volatile Pheromones of Two Rhinoceros Beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *J. Chromatogr. A* **2000**, *885* (1–2), 433–444.
- (27) Cenipalma. Comunicaciones Personales, 2017.
- (28) Klaschka, U. Chemical Communication by Infochemicals. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2009**, *16* (4), 367–369.
- (29) Nordlund, D. A.; Lewis, W. J. Terminology of Chemical Releasing Stimuli in Intraspecific and Interspecific Interactions. *J. Chem. Ecol.* **1976**, *2* (2), 211–220.
- (30) Visser, J. H.; De Jong, R. Olfactory Coding In The Perception Of Semiochemicals. *J. Chem. Ecol.* **1988**, *14* (11), 2005–2018.
- (31) Stensmyr, M. C. The Fly Nose -Function and Evolution, Swedish Univesity of Agricultural Sciences, 2004.
- (32) Dicke, M.; Sabelis, M. W. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Funct. Ecol.* **1988**, *2* (2), 131–139.
- (33) Karlson, P.; Lüscher, M. “Pheromones”: A New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* **1959**, *183* (4653), 55–56.
- (34) Brown, W. L. An Hypothesis Concerning The Function Of The Metapleural Glands In Ants. *Am. Nat.* **1968**, *102*, 188–191.
- (35) El-ghany, N. M. A. Semiochemicals for Controlling Insect Pests. *J. Plant Protecion Res.* **2019**, *59* (1), 1–11.
- (36) Morse, R. A. Honey Bee Alarm Pheromone: Another Function. *Annu. Entomol. Soc. Am.* **1972**, *756*, 1430.
- (37) Wood, D. L.; Browne, L. E.; Bedard, W. D.; Tilden, P. E.; Silverstein, R. M.; Rodin, J. O. Response of *Ips confusus* to Synthetic Sex Pheromones in Nature. *Science (80-)*. **1968**, *159* (3821), 1373–1374.
- (38) Raffa, K. F.; Dahlsten, D. L. Differential Responses among Natural Enemies and Prey to Bark Beetle Pheromones. *Oecologia* **1995**, *102* (1), 17–23.
- (39) Ngumbi, E.; Fadamiro, H. Comparative Responses of Four *Pseudacteon* Phorid Fly Species to Host Fire Ant Alarm Pheromone and Analogs. *Chemoecology* **2015**, *25* (2), 85–92.

- (40) Wood, W. F. Chemical Ecology: Chemical Communication in Nature. *J. Chem. Educ.* **1983**, *60* (7), 531–539. <https://doi.org/10.1021/ed060p531>.
- (41) Elsevier. Scopus <https://www-scopus-com.ezproxy.unal.edu.co/term/analyzer.uri?sid=40ae560a588554dbb35190defc6ba6dd&origin=resultlist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28%22chemical+ecology%22+OR+%22semiochemical%22%29&sort=plf&sdt=b&sot=b&sl=52&count=4067&analyzeResults=Analyze+re>.
- (42) Ormeño, E.; Goldstein, A.; Niinemets, Ü. Extracting and Trapping Biogenic Volatile Organic Compounds Stored in Plant Species. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (7), 978–989.
- (43) Tholl, D.; Boland, W.; Hansel, A.; Loreto, F.; Ro, U. S. R. Practical Approaches to Plant Volatile Analysis. **2006**, 540–560.
- (44) Materić, D.; Bruhn, D.; Turner, C.; Morgan, G.; Mason, N.; Gauci, V. Methods in Plant Foliar Volatile Organic Compounds Research. *Appl. Plant Sci.* **2015**, *3* (12), 1500044.
- (45) Barbosa-cornelio, R.; Cantor, F.; Coy-barrera, E. Tools in the Investigation of Volatile Semiochemicals on Insects : From Sampling to Statistical Analysis. **2019**, 1–35.
- (46) Huang, S.; Chen, G.; Ye, N.; Kou, X.; Zhu, F.; Shen, J.; Ouyang, G. Solid-Phase Microextraction : An Appealing Alternative for the Determination of Endogenous Substances - A Review. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1077*, 67–86.
- (47) Pawliszyn, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*; Elsevier Inc., 2012; pp 13–60.
- (48) Ouyang, G.; Pawliszyn, J. A Critical Review in Calibration Methods for Solid-Phase Microextraction. **2008**, *7*, 184–197.
- (49) Maia, A. C. D.; Gibernau, M.; Dötterl, S.; Do Amaral Ferraz Navarro, D. M.; Seifert, K.; Müller, T.; Schlindwein, C. The Floral Scent of *Taccarum ulei* (Araceae): Attraction of Scarab Beetle Pollinators to an Unusual Aliphatic Acyloin. *Phytochemistry* **2013**, *93*, 71–78.
- (50) Rochat, D.; Meillour, P. N. Le; Esteban-Duran, J. R.; Malosse, C.; Perthuis, B.; Morin, J. P.; Descoins, C. Identification of Pheromone Synergists in American Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*, and Attraction of Related *Dynamis borassi*. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26* (1), 155–187.
- (51) Romero-frías, A.; Sinuco, D. C.; Bento, J. M. S. Big Avocado Seed Weevil *Heilipus lauri* Management with Volatile Organic Compounds Produced by Males of This Species. In *5th Congress of Latin American Association of Chemical Ecology-ALAEQ*; Valparaíso, Chile, 2018.
- (52) Alves Filho, E. G.; Brito, R. S.; Rodrigues, T. H. S.; Silva, L. M. A.; de Brito, E. S.; Canuto, K. M.; Krug, C.; Zocolo, G. J. Association of Pollinators of Different Species of Oil Palm with the Metabolic Profiling of Volatile Organic Compounds. *Chem. Biodivers.* **2019**, *16* (6).
- (53) Ward, A.; Moore, C.; Anitha, V.; Wightman, J.; Rogers, D. J. Identification of the Sex Pheromone of *Holotrichia reynaudi*. *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28* (3), 515–522.
- (54) Leal, W. S.; Yada, C.; Vijayvergia, J. Aggregation of the Scarab Beetle *Holotrichia consanguinea* in Response to Female-Released Pheromone Suggests Secondary Function Hypothesis for Semiochemical. *J. Chem. Ecol.* **1996**, *22* (8), 1557–1566.
- (55) Cortez, V.; Favila, M. E.; Verdú, J. R.; Ortiz, A. J. Behavioral and Antennal Electrophysiological Responses of a Predator Ant to the Pygidial Gland Secretions of Two Species of Neotropical Dung Roller Beetles. *Chemoecology* **2012**, *22* (1), 29–38.
- (56) Tada, S.; Leal, W. S. Localization and Morphology of Sex Pheromone Glands in Scarab Beetles. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23* (4), 903–915.
- (57) Brezolin, A. N.; Martinazzo, J.; Muenchen, D. K.; de Cezaro, A. M.; Rigo, A. A.; Steffens, C.; Steffens, J.; Blassioli-Moraes, M. C.; Borges, M. Tools for Detecting Insect

- Semiochemicals: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (17), 4091–4108.
- (58) Blight, M. M. Techniques for Isolation and Characterization of Volatile Semiochemicals of Phytophagous Insects. In *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*; McCaffery, A. ., Wilson, I. D., Eds.; Plenum Press: New York, 1990; Vol. 1, pp 281–288.
- (59) Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. Algunos Aspectos Prácticos Para La Identificación de Analitos Por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas. *Sci. Chromatogr.* **2009**, *1* (3), 31–49.
- (60) Jones, G. R.; Oldham, N. J. Pheromone Analysis Using Capillary Gas Chromatographic Techniques. *J. Chromatogr. A.* **1999**, *843* (199–236).
- (61) Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. Algunos Aspectos Prácticos Para La Identificación de Analitos Por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas. *Sci. Chromatogr.* **2010**, *2* (1), 29–47.
- (62) Bruce, T. J. A.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M. Insect Host Location: A Volatile Situation. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10* (6), 269–274.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>.
- (63) Xu, H.; Turlings, T. C. J. Plant Volatiles as Mate-Finding Cues for Insects. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23* (2), 100–111.
- (64) Hilker, M.; Meiners, T. Plants and Insect Eggs: How Do They Affect Each Other? *Phytochemistry* **2011**, *72* (13), 1612–1623.
- (65) Visser, J. Host Odor Perception in Phytophagous Insects. *Annu. Rev. Entomol.* **1986**, *31* (1), 121–144.
- (66) Schneider, D. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- Und Mechanorezeptoren Der Antenne Des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Z. Vergl. Physiol.* **1957**, *40*, 8–41.
- (67) Weissbecker, B.; Holighaus, G.; Schütz, S. Gas Chromatography with Mass Spectrometric and Electroantennographic Detection: Analysis of Wood Odorants by Direct Coupling of Insect Olfaction and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1056* (1-2 SPEC.ISS.), 209–216.
- (68) Hassemer, M. J.; Santana, J.; de Oliveira, M. W. M.; Borges, M.; Laumann, R. A.; Caumo, M.; Blassioli-Moraes, M. C. Chemical Composition of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) Abdominal Glands and the Influence of 1,4-Benzoquinones on Its Behavior. *J. Econ. Entomol.* **2015**, *108*, 2107–2116.
- (69) Saïd, I.; Aldana-De la Torre, R. C.; Morin, J. P.; Rochat, D. Adaptation of a Four-Arm Olfactometer for Behavioural Bioassays of Large Beetles. *Chemoecology* **2006**, *16* (1), 9–16.
- (70) Smith, R. F.; Apple, J. L.; Bottrell, D. G. The Origins of Integrated Pest Management Concepts for Agricultural Crops. *Integr. Pest Manag.* **2012**, 1–16.
- (71) Prokopy, R. J. Two Decades of Bottom-up, Ecologically Based Pest Management in a Small Commercial Apple Orchard in Massachusetts. *Agric. Ecosyst. Environment* **2003**, *94*, 299–309.
- (72) Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36* (1), 80–100.
- (73) Tewari, S.; Leskey, T. C.; Nielsen, A. L.; Piñero, J. C.; Rodriguez-Saona, C. R. *Use of Pheromones in Insect Pest Management, with Special Attention to Weevil Pheromones*; 2013.
- (74) Borrero-Echeverry, F.; Barreto-Triana, N.; Aragón-Rodríguez, S. M.; Rivera-Trujillo, H. F.; Oehlschlager, C.; Cotes-Prado, A. M. Las Feromonas En El Control de Insectos.

- Control biológico fitopatógenos, insectos y ácaros* **2018**, 411–453.
- (75) Bakthavatsalam, N. *Chapter 19 - Semiochemicals*; Elsevier Inc., 2016.
- (76) Bedford, G. O. *Biology and Management of Palm Dynastid Beetles : Recent Advances*. **2013**.
- (77) Gries, R.; Oehlschlager, A. C.; Perez, A. L.; Gonzales, L. M.; Gries, G.; Pierce, H. D. Aggregation Pheromone of the African Rhinoceros Beetle, *Oryctes monoceros* (Olivier) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Zeitschrift für Naturforsch. C* **1994**, *49* (5–6), 363–366.
- (78) Hasni, N.; Pinier, C.; Imed, C.; Ouhichi, M.; Couzi, P.; Chermiti, B.; Frérot, B.; Saïd, I.; Rochat, D. Synthetic Co-Attractants of the Aggregation Pheromone of the Date Palm Root Borer *Oryctes agamemnon*. *J. Chem. Ecol.* **2017**, *43* (7), 631–643.
- (79) Smart, L. E.; Aradottir, G. I.; Bruce, T. J. A. *Role of Semiochemicals in Integrated Pest Management*; Elsevier Inc., 2014.
- (80) Adam, D. Does Colombia hold the answer to sustainable palm oil? <https://chinadialogue.net/en/food/11720-does-colombia-hold-the-answer-to-sustainable-palm-oil/>.
- (81) Fedepalma; SISPA. Sistema de Información Estadística del Sector Palmero <http://sispaweb.fedepalma.org/sispaweb/>.
- (82) Mesa, D. J. Fedepalma, 55 Años de Gestión Gremial Para Desarrollar y Consolidar Agroindustria de La Palma de Aceite En Colombia. *El Palmicultor* **2018**, 552.
- (83) Garcés, I.; Sánchez Cuéllar, M. Productos Derivados de La Industria de La Palma de Aceite : Usos. *Rev. Palmas* **1997**, *18* (1), 33–48.
- (84) Marquez Sierra, J. D.; Sierra, L.; Olivero-Verbel, J. Potencial de La Palma Aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). *Agron. Mesoam.* **2017**, *28* (2), 523–534.
- (85) Henson, I. E. *A Brief History of Oil Palm*; AOCS Press, 1916.
- (86) Nair, K. P. P. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacquin). In *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World*; 2010; pp 209–236.
- (87) Bauer, S.; Kauffman, L. The anatomy of oil palm <https://chinadialogue.net/en/food/the-anatomy-of-an-oil-palm/>.
- (88) Ng, S.; Uexkull, V.; Hardter, R. Aspectos Botánicos de La Palma de Aceite Pertinentes Al Manejo de Cultivo. In *Palma de aceite: manejo para rendimientos altos y sostenibles*.; Fairhurst, T., Hardter, R., Eds.; International Plant: Quito, 2012; pp 33–46.
- (89) Sanabria García, R. Estudio Faunístico de La Tribu Oryctini (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) de Colombia, Universidad Nacional de Colombia, 2012.
- (90) Pardo, L. C. Escarabajos (Coleoptera-Scarabaeidae) de Importancia Agrícola en Colombia, 1994, 159–182.
- (91) Ratcliffe, B. C. A Revision of the Genus *Strategus* (Coleoptera:Scarabaeidae). *Bulletin of the University of Nebraska State Museum.* 1976, pp 93–204.
- (92) Calvache, H.; Gómez, P. . Comportamiento de Las Plagas de La Palma de Aceite En Colombia. *Palmas* **1991**, *12* (3), 7–14.
- (93) Aldana-De la Torre, R. C.; Cabra, M. G.; Pineda, J.; E., B.-P. A. Parámetros Poblacionales de *Strategus aloeus*, Barrenador de La Palma de Aceite. *XIV Reun. Técnica Nac. Palma Aceite.* **2017**, 2011.
- (94) Pallares, C. H.; Aldana-De la Torre, J. A.; Calvache-Guerrero, H.; Ramírez-Lucas, P.; Luque, J.; Correa, N. Análisis Del Comportamiento y Comunicación Química Intraespecífica En *Strategus aloeus* (L.) (Coleoptera, Scarabaeidae - Dynastinae). *Rev. Palmas* **2000**, *21* (especial), 185–194.
- (95) Rodríguez Farías, Á. L. Semioquímicos Para El Manejo Integrado de Insectos Plaga de La Familia Taxonómica Scarabaeidae, Universidad Antonio Nariño, 2019.
- (96) Galante, E.; Marcos, Á. Detrívoros, Coprófagos y Necrófagos. *Bol. S.E.A.* **1997**, *20*, 57–64.
- (97) Arias, L. Evaluación Del Comportamiento Del Escarabajo-Plaga *Strategus aloeus*

- (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) Frente a Compuestos Orgánicos Volátiles Que Median Su Comunicación Química, Universidad Antonio Nariño. Colombia, 2019.
- (98) Valencia, C.; Pérez, S. M.; Aldana De la Torre, R. C.; Mesa, E.; Gomes de Olivera, H. Patogenicidad de Hongos Entomopatógenos Del Género *Metarhizium* Sobre Larvas de *Strategus aloeus* L. (Coleoptera: Scarabaeidae) , En Condiciones de Laboratorio. *Rev. Palmas* **2011**, 32 (4), 30–40.
- (99) ICA. Plaguicidas Registrados <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/registrosnacionales-pqua-15-04-09.aspx>.
- (100) Martínez, L. C.; Plata-Rueda, A.; Zaniccio, J. C.; Serrao, J. E. Comparative Toxicity of Six Insecticides on the Rhinoceros Beetle (Coleoptera : Scarabaeidae). *Florida Entomol.* **2014**, 97 (3), 1056–1062.
- (101) Marín, C.; Céspedes, C. Compuestos Volátiles de Plantas, Origen, Emisión, Efectos, Análisis y Aplicaciones Agro. *Rev. Fitotec. Mex.* **2007**, 30, 327–351.
- (102) Knudsen, J. T.; Eriksson, R.; Gershenzon, J.; Stahl, B. Diversity and Distribution of Floral Scent. *Bot. Rev.* **2006**, 72 (1), 1–120.
- (103) Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D. A.; Orlova, I. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **2006**, 25 (5), 417–440.
- (104) Tholl, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2014**, 123 (July 2015), 127–141.
- (105) Pichersky, E.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science (80-)*. **2006**, 311 (5762), 808–811.
- (106) Ervik, F.; Tollsten, L.; Knudsen, J. T. Floral Scent Chemistry and Pollination Ecology in Phytelephantoid Palms (Arecaceae). *Plant Syst. Evol.* **1999**, 217 (3–4), 279–297.
- (107) Knudsen, J. T.; Tollsten, L.; Ervik, F. Flower Scent and Pollination in Selected Neotropical Palms. *Plant Biol.* **2001**, 3, 642–653.
- (108) Campos, A.; Maia, D.; Reis, L. K.; Maria, D.; Navarro, F.; Aristone, F.; Augusto, C.; Javier, C.; Barrera, C.; Alberto, L.; Avellaneda, N. Chemical Ecology of *Cyclocephala forsteri* (Melolonthidae), a Threat to Macauba Oil Palm Cultivars (*Acrocomia aculeata* , Arecaceae). **2019**, No. April, 1–8.
- (109) Maia, A. C. D.; Santos, G. K. N.; Gonçalves, E. G.; Navarro, D. M. do A. F.; Nuñez-Avellaneda, L. A. 2-Alkyl-3-Methoxypyrazines Are Potent Attractants of Florivorous Scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini) Associated with Economically Exploitable Neotropical Palms (Arecaceae). *Pest Manag. Sci.* **2018**, 74 (9), 2053–2058.
- (110) Knudsen, J. T.; Andersson, S.; Bergman, P. Floral Scent Attraction in *Geonoma macrostachys*, an Understorey Palm of the Amazonian Rain Forest. *Oikos* **1999**, 85 (3), 409.
- (111) Caissard, J.-C.; Meekijironenroj, A.; Baudino, S.; Anstett, M.-C. Localization Of Production And Emission Of Pollinator Attractant On Whole Leaves Of *Chamaerops humilis* (Arecaceae). *Maerican J. Bot.* **2004**, 91 (8), 1190–1199.
- (112) Lumabas, J. L.; Sioson, J. C.; Janairo, J. I. B. Chemical Diversity of Scarab Beetle Pheromones and Its Implication in Chemical Evolution. **2016**, 5 (1), 65–70.
- (113) Parra, R. Contribution of Oil Palm Isoprene Emissions to Tropospheric Ozone Levels in the Distrito Metropolitano de Quito (Ecuador). *116*, 95–104.
- (114) Jardine, K. J.; Gimenez, B. O.; Araújo, A. C.; Cunha, R. L.; Felizzola, J. F.; Piva, L. R.; Chambers, J. Q.; Higuchi, N. Diurnal Pattern of Leaf, Flower and Fruit Specific Ambient Volatiles above an Oil Palm Plantation in Pará State, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 27 (8), 1484–1492.
- (115) Volatiles, F.; Lajis, N. H.; Hussein, M. Y.; Toia, R. F. Extraction and Identification of the

- Main Compound Present in *Elaeis guineensis*. *Pertanika* **1985**, *8* (1), 105–108.
- (116) Muhamad Fahmi, M. H.; Ahmad Bukhary, A. K.; Norma, H.; Idris, A. B. Analysis of Volatile Organic Compound from *Elaeis guineensis* Inflorescences Planted on Different Soil Types in Malaysia. *AIP Conf. Proc.* **2016**, *1784*.
- (117) Zainol Hilmi, N. H.; Idris, A. S.; Mohd Azmil, M. N. Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Detection of Volatile Organic Compounds Released from *Ganoderma boninense* and Oil Palm Wood. *For. Pathol.* **2019**, *49* (4), 1–9.
- (118) Bruce, T. J.; Cork, A. Electrophysiological and Behavioral Responses of Female *Helicoverpa armigera* to Compounds Identified in Flowers of African Marigold, *Tagetes Erecta*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27* (6), 1119–1131.
- (119) Wurmitzer, C.; Blüthgen, N.; Krell, F. T.; Maldonado, B.; Ocampo, F.; Müller, J. K.; Schmitt, T. Attraction of Dung Beetles to Herbivore Dung and Synthetic Compounds in a Comparative Field Study. *Chemoecology* **2017**, *27*, 75–84.
- (120) Weevil, A. P.; Rhynchophorus, L. Ethyl Propionate : Synergistic Kairomone For. *Agriculture* **1994**, *20* (4), 889–897.
- (121) Vacas, S.; Melita, O.; Michaelakis, A.; Milonas, P.; Minuz, R.; Riolo, P.; Abbass, M. K.; Lo Bue, P.; Colazza, S.; Peri, E.; Soroker, V.; Livne, Y.; Primo, J.; Navarro-Llopis, V. Lures for Red Palm Weevil Trapping Systems: Aggregation Pheromone and Synthetic Kairomone. *Pest Manag. Sci.* **2017**.
- (122) Hasni, N.; Pinier, C.; Imed, C.; Ouhichi, M.; Couzi, P.; Chermiti, B.; Frérot, B.; Saïd, I.; Rochat, D. Synthetic Co-Attractants of the Aggregation Pheromone of the Date Palm Root Borer *Oryctes agamemnon*. *J. Chem. Ecol.* **2017**, *43* (7), 631–643.
- (123) Ruther, J.; Mayer, C. J. Response of Garden Chafer, *Phyllopertha horticola*, to Plant Volatiles: From Screening to Application. *Entomol. Exp. Appl.* **2005**, *115* (1), 51–59.
- (124) Leal, W. S. Chemical Ecology of Phytophagous Scarab Beetles. *Annu. Rev. Entomol.* **2002**, *43* (1), 39–61.
- (125) Leal, W. S.; Ono, M.; Hasegawa, M.; Sawada, M. Kairomone from Dandelion, *Taraxacum officinale*, Attractant for Scarab Beetle *Anomala Octiescostata*. *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20* (7), 1697–1704.
- (126) Imai, T.; Maekawa, M.; Tsuchiya, S.; Fujimori, T. Field Attraction of *Hoplia communis* to 2-Phenylethanol, a Major Volatile Component from Host Flowers, *Rosa spp.* *J. Chem. Ecol.* **1998**, *24* (9), 1491–1497.
- (127) Chen, R. zhao; Klein, M. G.; Sheng, C. fa; Li, Y.; Li, Q. yun. Male and Female *Popillia quadriguttata* (Fabricius) and *Protaetia brevitarsis* (Lewis) (Coleoptera: Scarabaeidae) Response to Japanese Beetle Floral and Pheromone Lures. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2013**, *16* (4), 479–484.
- (128) Hallett, R. H. Aggregation Pheromones Of Coleopteran Pests Of Palms, Simon Fraser University, 1996.
- (129) Barber, I. A.; McGovern, T. P.; Beroza, M.; Hoyt, C. P.; Walker, A. Attractant for de Coconut Rhinoceros Beetle. *J. Econ. Entomol.* **1971**, *64* (5), 1042–1044.
- (130) Maddison, P. A.; Beroza, M.; McGovern, T. P. Ethyl Chrysanthemumate as an Attractant for the Coconut Rhinoceros Beetle. *J. Econ. Entomol.* **1972**, *66* (3), 591–592.
- (131) El-Sayed. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals <http://www.pherobase.com>.
- (132) Levinson, H. Z.; Levinson, A. R.; U., M. Action and Composition of the Alarm Pheromone of the Bedbug *Cimex lectularius* L. *Naturwissenschaften* **1974**, *61*, 684–685.
- (133) Collins, R. P. Carbonyl Compounds Produced by the Bed Bug, *Cimex lectularius*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1967**, *61* (5), 1338–1340.
- (134) Choudhuri, D. K. On the Chemical Components of the Stink of *Khrysocoris stollid* Wolf.

- (Heteroptera : Pentatomidae : Insecta). **1969**.
- (135) Pontes, G. B.; Bohman, B.; Unelius, C. R.; Lorenzo, M. G. Metasternal Gland Volatiles and Sexual Communication in the Triatomine Bug, *Rhodnius prolixus*. **2008**, 450–457.
- (136) Morgan, E. D.; Tyler, R. C.; Cammarets, C. Identification of the Components of Dufour Gland Secretion of the Ant *Myrmica rubra* and Responses to Them. *J. Insect Physiol.* **1977**, *23*, 511–515.
- (137) Cammaerts-Tricot, M.-C.; Morgan, E. D.; Tyler, R. C.; Braekman, J.-C. Dufour's Gland Secretion of *Myrmica rubra*: Chemical, Electrophysiological, and Ethological Studies. *J. Insect Physiol.* **1976**, *22*, 927–932.
- (138) Inouchi, J.; Shibuya, T.; Hatanaka, T. Food Odor Responses of Single Antennal Olfactory Cells in Japanese Dung Beetle, *Geotrupes auratus* (Coleoptera: Geotrupidae). *Appl. Entomol. Zool.* **1988**, *23* (2), 167–174.
- (139) Moretto, P. Pollination of *Amorphophallus Barthlottii* and *A. abyssinicus* subsp. *akeassii* (Araceae) by Dung Beetles (Insecta: Coleoptera: Scarabaeoidea). *Cathar. La Rev.* **2019**, *18* (April), 19–36.
- (140) Krell, F.; Schmitt, T.; Herzner, G. The Attractive Odors of Dung. In *The Third, Highly Irregular, Scarab Workshop*; 2006.
- (141) Kite, G. C.; Hetterscheid, W. L. A. Phytochemistry Phylogenetic Trends in the Evolution of in Florescence Odours in *Amorphophallus*. *Phytochemistry* **2017**, *142*, 126–142.
- (142) Vitta, A. C. R.; Bohman, B.; Unelius, C. R.; Lorenzo, M. G. Behavioral and Electrophysiological Responses of *Triatoma brasiliensis* Males to Volatiles Produced in the Metasternal Glands of Females. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35* (10), 1212–1221.
- (143) Manrique, G.; Vitta, A. C. R.; Ferreira, R. A.; Zani, C. L.; Unelius, C. R.; Lazzari, C. R.; Diotaiuti, L.; Lorenzo, M. G. Chemical Communication in Chagas Disease Vectors. Source, Identity, and Potential Function of Volatiles Released by the Metasternal and Brindley's Glands of *Triatoma infestans* Adults. *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32* (9), 2035–2052.
- (144) Brossut, R. Allomonal Secretions in Cockroaches. *J. Chem. Ecol.* **1983**, *9* (1), 143–158.
- (145) Skubatz, H.; Kunkel, D. D.; Howald, W. N.; Trenkle, R.; Mookherjee, B. The *Sauromatum guttatum* Appendix as an Osmophore: Excretory Pathways, Composition of Volatiles and Attractiveness to Insects. *New Phytol.* **1996**, *134*, 631–640.
- (146) Knudsen, J.T.; Eriksson, E.; Gershenzon, J.; Ståhl, B. Diversity and Distribution of Floral Scent. *New York Botanical Review* Springer. **2016**, *72* (1), 1–120.
- (147) Choudhary, D. K.; Sharma, A. K.; Agarwak, P.; Varma, A.; Tuteja, N. *Volatiles and Food Security*; Springer: Singapore, 2017.
- (148) Kite, G.; Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, Third Edit.; Wiley: Chichester, 2007; Vol. 53.
- (149) Sigma-Aldrich. No TitlePlas-Labs Nitrogen dry-boxes
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/plaslabsnitrogendryboxglovebox1234598765?lang=en®ion=CO> (accessed Feb 15, 2017).
- (150) Engewald, K. D. W. Adsorbent Materials Commonly Used in Air Analysis for Adsorptive Enrichment and Thermal Desorption of Volatile Organic Compounds. *Anal Bioanal Chem* **2002**, *373* (6), 490–500.
- (151) Buško, M.; Kulik, T.; Ostrowska, A.; Góral, T.; Perkowski, J. Quantitative Volatile Compound Profiles in Fungal Cultures of Three Different *Fusarium graminearum* Chemotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *359* (1), 85–93.
- (152) Bouwmeester, H. The Role of Volatiles in Plant Communication. *Plant J.* **2019**, 1–16.
- (153) Castells, A. A. The Role of Terpenes in the Defensive Responses of Conifers against Herbivores and Pathogens, Universitat Autònoma de Barcelona, 2015.

- (154) Mumm, R.; Posthumus, M. A.; Dicke, M. Significance of Terpenoids in Induced Indirect Plant Defence against Herbivorous Arthropods. *Plant, Cell Environ.* **2008**, *31* (4), 575–585.
- (155) Garms, S.; Boland, W.; Arimura, G. I. Early Herbivore-Elicited Events in Terpenoid Biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* **2008**, *3* (6), 418–419.
- (156) Wei, J.; Yang, Z.; Hao, H.; Du, J.; Hope, M.; Blessig, M.; Hope, A. (R) - (+) -Limonene, Kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a Natural Enemy of Longhorned Beetles. *Agric. For. Entomol.* **2008**, *10* (4), 323–330.
- (157) Azuma, H.; Toyota, M.; Asakawa, Y.; Takaso, T.; Tobe, H. Floral Scent Chemistry of Mangrove Plants. **2002**, *Journal of* (115), 47–53.
- (158) Cipriano, A. ; Moya, O. ; Rincón, Á. ; Aldana, R. ; Oliveira, H. ; Ruiz, R. ; Avila, R. Dinámica de Reproducción de *Strategus aloeus* Bajo Diferentes Métodos de Erradicación y Daño Causado En La Nueva Siembra. *Ceniavance* **2010**, *166*, 1–4.
- (159) Ávila, R. A.; Bayona, C.; Ricón, Á.; Romero, H. M. Effect of Replanting Systems on Populations of *Strategus aloeus* (L.) and *Rhynchophorus palmarum* (L.) Associated with the Oil Palm OxG Interspecific Hybrid (*Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*) in Southwestern Colombia. *Agron. Colomb.* **2014**, *32* (2), 224–231.
- (160) Burger, B. V.; Petersen, W. G. B.; Tribe, G. D. Semiochemicals of the Scarabaeinae, IV*: Identification of an Attractant for the Dung Beetle *Pachylomerus femoralis* in the Abdominal Secretion of the Dung Beetle *Kheper lamarcki*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **1995**, *50* (9–10), 675–680.
- (161) Kumano-Nomura, Y.; Yamaoka, R. Beetle Visitations, and Associations with Quantitative Variation of Attractants in Floral Odors of *Homalomena propinqua* (Araceae). *J. Plant Res.* **2009**, *122* (2), 183–192.
- (162) Ambrogi, B. G.; Vidal, D. M.; Zarbin, P. H. G.; Rosado-Neto, G. H. Feromônios de Agregação Em Curculionidae (Insecta: Coleoptera) e Sua Implicação Taxonômica. *Quim. Nova* **2009**, *32* (8), 2151–2158.
- (163) Song, Y.; Kong, Y.; Wang, J.; Ruan, Y.; Huang, Q.; Ling, N.; Shen, Q. Identification of the Produced Volatile Organic Compounds and the Involved Soil Bacteria during Decomposition of Watermelon Plant Residues in a Fusarium-Infested Soil. *Geoderma* **2018**, *315* (November 2017), 178–187.
- (164) Stotzky, G.; Schenck, S. Sources of Organic Reagents. *Adv. Org. Synth.* **1971**, No. May, 161–165.
- (165) Azmi, W. A.; Daud, S. N.; Hussain, M. H.; Wai, Y. K.; Chik, Z.; Sajap, A. S. Field Trapping of Adult Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) with Food Baits and Synthetic Pheromone Lure in a Coconut Plantation. *Philipp. Agric. Sci.* **2014**, *97* (4), 409–415.
- (166) Tillman, J. A.; Seybold, S. J.; Jurenka, R. A.; Blomquist, G. J. Insect Pheromones — an Overview of Biosynthesis and Endocrine Regulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29*, 481–514.
- (167) Vanderwel, D.; Oehlschlager, A. C. Biosynthesis of Pheromones and Endocrine Regulation of Pheromone Production in Coleoptera. In *Pheromone Biochemistry*; Prestwich, G., Blomquist, G., Eds.; Academic Press, 1987; pp 175–215.
- (168) Seybold, S. J.; Vanderwel, D. Biosynthesis and Endocrine Regulation of Pheromone Production in the Coleoptera. In *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*; Blomquist, G., Vogt, R., Eds.; Academic Press, 2003; pp 137–200.
- (169) Jurenka, R.; Blomquist, G. J.; Schal, C.; Tittiger, C. *Biochemistry and Molecular Biology of Pheromone Production* ☆; 2017.
- (170) Blomquist, G. J.; Jurenka, R.; Schal, C.; Tittiger, C. *Pheromone Production: Biochemistry and Molecular Biology*; Elsevier, 2012.

- (171) De Mazo, L.; Vit, S. Contribution to the Knowledge of *Palaearctic batrisinae* (Colopetera: Pselaphidae). Antennal Male Glands of *Batrisus* Aubé and *Batrisodes* Reitter: Morponogy, Histology and Taxonomical Implications. *Entomologica* **1983**, *18*, 77–110.
- (172) Faustini, D. L.; Post, D. C.; Burkholder, W. E. Histology of Aggregation Pheromone Gland in the Red Flour Beetle. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1982**, *75*, 187–190.
- (173) Hoshino, K.; Nakaba, S.; Inoue, H.; Iwabuchi, K. Structure and Development of Male Pheromone Gland of Longicorn Beetles and Its Phylogenetic Relationships within the Tribe Clytini. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **2015**, *324*, 68–76.
- (174) Tumlinson, J. H.; Klein, M. G.; Doolittle, R. E.; Ladd, T. L.; Proveaux, A. T. Identification of the Female Japanese Beetle Sex Pheromone: Inhibition of Male Response by an Enantiomer. *Science (80-)*. **1977**, *197* (4305), 789–792.
- (175) Zhang, A. Essential Amino Acid Methyl Esters: Major Sex Pheromone Components of the Cranberry White Grub, *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23* (1), 231–245.
- (176) Henzel, R. F.; Lowe, M. D. Sex Attractant of the Grass Grub Beetle Social Organization in the Bat *Myotis adversus*. *Science (80-)*. **1970**, *168* (2), 1005–1006.
- (177) Larsson, M. C.; Hedin, J.; Svensson, G. P.; Tolasch, T.; Francke, W. Characteristic Odor of *Osmoderma eremita* Identified as a Male-Released Pheromone. *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29* (3), 575–587.
- (178) Hallett, R. H.; Perez, A. L.; Gries, G.; Gries, R.; Pierce, H. D.; Yue, J.; Oehlschlager, A. C.; Gonzalez, L. M.; Borden, J. H. Aggregation Pheromone of Coconut Rhinoceros Beetle, *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21* (10), 1549–1570.
- (179) Rochat, D.; Mohammadpoor, K.; Malosse, C.; Avand-Faghih, A.; Lettere, M.; Beauhaire, J.; Morin, J.-P.; Pezier, A.; Renou, M.; Absollahi, G. A. Male Aggregation Pheromone of Date Palm Fruit Stalk Borer *Oryctes elegans*. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30* (2), 387–407.
- (180) Saïd, I.; Hasni, N.; Abdallah, Z.; Couzi, P.; Ouhichi, M.; Renou, M.; Rochat, D. Identification of the Aggregation Pheromone of the Date Palm Root Borer *Oryctes agamemnon*. *J. Chem. Ecol.* **2015**, *41* (5), 446–457.
- (181) Bento, J. M. S. Comunicaciones Personales, 2019.
- (182) Opitz, S. E. W.; Mu, A. C. Plant Chemistry and Insect Sequestration. **2009**, 117–154.
- (183) Rudinsky, B. J. A.; Morgan, M. E.; Libbey, L. M.; Putnam, T. B. Limonene Released by the Scolytid Beetle *Dendroctonus pseudotsugae*. *Zeitschrift für Angew. Entomol.* **1977**, *82*, 376–380.
- (184) Burger, B. V. First Investigation of the Semiochemistry of South African Dung Beetle Species. In *Neurobiology of Chemical Communication*; Mucignat-Caretta, C., Ed.; 2014; pp 57–95.
- (185) Manjeri, G. *Oryctes* Rhinoceros Beetles, an Oil Palm Pest in Malaysia. *Annu. Res. Rev. Biol.* **2014**, *4* (22), 3429–3439.
- (186) Allou, K.; Morin, J. P.; Kouassi, P.; N’Klo, F. H.; Rochat, D. *Oryctes monoceros* Trapping with Synthetic Pheromone and Palm Material in Ivory Coast. *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32* (8), 1743–1754.
- (187) Leal, W. S. Molecules and Macromolecules Involved in Chemical Communication of Scarab Beetles. **2001**, *73* (3), 613–616.
- (188) Leal, W. S. Chapter 4. **2005**, 45–57.
- (189) Harvey, D. J.; Vuts, J.; Hooper, A.; Finch, P.; Woodcock, C. M.; Caulfield, J. C.; Kadej, M.; Smolis, A.; Withall, D. M.; Henshall, S.; Pickett, J. A.; Gange, A. C.; Birkett, M. A.

- Environmentally Vulnerable Noble Chafers Exhibit Unusual Pheromone-Mediated Behaviour. *PLoS One* **2018**, *13* (11), 1–15.
- (190) Rochat, D.; Morin, J. P.; Kakul, T.; Beaudoin-Ollivier, L.; Prior, R.; Renou, M.; Malosse, I.; Stathers, T.; Embupa, S.; Laup, S. Activity of Male Pheromone of Melanesian Rhinoceros Beetle *Scapanes australis*. *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28* (3), 479–500.