



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Feromona sexual como estrategia para el manejo integrado de *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 en cultivos de palma de aceite

Jenifer Jhoana Bustos Cortés

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2023

Feromona sexual como estrategia para el manejo integrado de *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 en cultivos de palma de aceite

Jenifer Jhoana Bustos Cortés

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Química

Directora:

Prof. Dra. Carolina Chegwin Angarita
Faculta de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Dr. Anuar Morales Rodríguez.
Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma

Asesora:

Prof. Dra. Alicia Romero Frías
Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño

Línea de Investigación:

Ecología Química

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación en Manejo Integrado de Plagas de la Palma de Aceite, Cenipalma
Grupo de Investigación en Química de Hongos Macromicetos, Universidad Nacional de Colombia
Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas, Universidad Antonio Nariño

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

2023

“Como no estás experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad, te parecen imposibles. Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas, a muchas amargas dificultades.”

Miguel de Cervantes Saavedra

Dedicatoria

A mi mami, **Sandra María**,

Por su amor y apoyo incondicional, porque aún en las circunstancias más difíciles ha sido para mí ejemplo de fortaleza y honestidad. Por ayudarme a forjar mis alas y permitirme volar. Gracias a ella soy una persona responsable y disciplinada.

A mis abuelitos, **Marina y Custodio**,

Por sus innumerables cuidados, porque son el mayor ejemplo de resiliencia, por enseñarme que el trabajo duro hecho con amor siempre trae buenos frutos.

A mis tías, **Leydi y Nydia**,

Por alentarme a cumplir mis sueños, por ser ejemplo de dedicación, por enseñarme la importancia de disfrutar más del proceso que de la meta.

A **Jefery**,

Por sus consejos y por brindar siempre su ayuda desinteresada.

A mi hermano **Sebastián**,

Por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva, a ser una persona más paciente y a intentar llevar la vida con más calma.

A mi hermana **Diana**,

Por ser mi eterna cómplice, por siempre tenerme fe, en especial en aquellos momentos donde no lograba creer en mí. Tú me has rescatado incontables veces.

Gracias por brindarme un maravilloso hogar, este y cada uno de los sueños que he podido cumplir se los debo a ustedes. Los amo profundamente.

Agradecimientos

A las siguientes entidades, por el apoyo financiero que permitió el desarrollo de esta tesis de maestría:

- **Centro de Investigación en Palma de Aceite** (Cenipalma). Programa de Plagas y Enfermedades.
- **Federación Nacional de Cultivadores de Palma** (Fedepalma). Fondo de Fomento Palmero.
- **Grupo de Investigación en Química de Hongos Macromicetos**, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
- **Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas**, Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño.

A las personas que facilitaron y me acompañaron en la realización de esta investigación:

- A mi asesora, la profesora **Alicia Romero** y a mis directores, la profesora **Carolina Chegwin** y el Dr. **Anuar Morales**, por depositar su confianza en mí y abrirme las puertas de sus grupos de investigación, por sus conocimientos y tiempo, por guiarme con paciencia durante todo este proceso de formación y por alentarme cada vez que me sentí abrumada.
A la profe Alicia, le agradezco por mostrarme el apasionante mundo de la ecología química, por enseñarme a tomar la vida con más tranquilidad, a disfrutar de mis procesos de aprendizaje y a defender aquello en lo que creo, por recordarme la importancia de no olvidar que un ejercicio académico, es a veces solamente eso, y está bien. A la profe Carolina, le agradezco por sus consejos, por enseñarme que incluso las situaciones que nos disgustan suceden para algo, que no es necesario preocuparse, es un ejercicio desgastante, resulta mejor ocuparse en lo que podemos manejar, recordando lo bueno que nos ha permitido la vida. Al Dr. Anuar, le agradezco por escuchar y valorar mis ideas, por permitirme participar de diferentes escenarios en Cenipalma, donde crecí a nivel personal, académico y profesional.
- A todo el grupo del Programa de Plagas y Enfermedades de Cenipalma, por acogerme y compartir conmigo sus conocimientos en el área de entomología y agronomía; en especial a los investigadores **Rosa Aldana** y **José Pastrana** por su colaboración en la colecta, cría y envío de los insectos.
- Al profesor **Edgar Daza** del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por permitirme establecer las colonias de los insectos e instalarme en su laboratorio.
- Al profesor **Oscar Patiño** del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por el suministro de la muestra del nerolidol.
- Al profesor **Jocelyn Millar** del Departamento de Entomología de la Universidad de California, Riverside, por el suministro de la muestra del (Z)-7-heptadeceno.

- A **Walter Medina** Coordinador del Laboratorio de Servicios a Posgrados (LASAP) de la Universidad Nacional de Colombia, por su disposición y apoyo para el uso del CG-EM.
- A la doctora **Nancy Barreto** Investigadora PhD Asociada del Centro de Investigación Tibaitatá de Agrosavia, por poner a mi disposición la infraestructura del Laboratorio de Entomología para la evaluación de la respuesta de los insectos. Igualmente, a las investigadoras **Stephanie Numa** y **Yuly Sandoval** por compartir conmigo sus conocimientos y guiarme en el uso del túnel de viento y el electroantenógrafo.
- A la estudiante **Sara Flores** del Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño, por sus aportes en la cuantificación de los compuestos liberados por los insectos, por su apoyo y buena disposición en todo el proceso.
- A mi papá **Julio Mauricio**, por su amor, por sus palabras de aliento aún desde la distancia. A mi hermana **Paula Alejandra**, por sus palabras de entusiasmo durante este proceso.
- A mis amigos del Grupo de Investigación en Química de Hongos Micromicetos: **Juan Carlos, Juan Pablo, Kevin, María Paula, Ana María, Mariana** y **Nicolás**, por hacer del laboratorio un lugar al que siempre quería llegar, por las risas, los juegos, por escuchar una y otra vez las historias de mis tribulaciones.
- A **Valentina**, la hermana que me brindó la universidad, por su incondicionalidad, porque la vida se tornó mucho más amable cada vez que me escuchó y me ayudó a buscar la luz, aun cuando el escenario fue más que oscuro para la dos.
- A **Angie**, mi amiga del alma, por escucharme siempre, por las risas interminables que me alegraban los días, por hacerme parte de su amorosa familia (PD: Intentaré ser la mejor madrina para Isaac).
- A los amigos que me dejó la universidad **Juan A, Lau, Juan E, Gabi, Daniel, Juan G, Mateo, Mala, Stefy, Lelo** y **José**, por su cariño y consejos, por escucharme y alentarme cada vez que lo necesité.
- A las mejores *roomies*, **Saira, Ana** y **Natalia**, por su amor y sus cuidados, por hacer de cualquier lugar en el que durmiéramos un hogar.
- Y a cada una de las personas, que de una u otra forma, me ayudaron durante el camino para poder alcanzar este logro.

Resumen

Feromona sexual como estrategia para el manejo integrado de *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 en cultivos de palma de aceite

Uno de los principales insectos-plaga que afecta actualmente al sector palmicultor de Colombia es *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae). El alto consumo foliar del estadio larval de este lepidóptero lo convierte en una especie agresiva de difícil manejo, causante de pérdidas económicas significativas. Las características bioecológicas de *O. cassina* en el cultivo de palma de aceite indican que uno de los puntos clave para su manejo integrado es el monitoreo y control de las poblaciones de adultos. En este sentido, la modificación del comportamiento en respuesta al uso de estímulos de naturaleza química como las feromonas, resulta un escenario promisorio. El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de extracción, análisis químico y evaluación de los semioquímicos que modulan la conducta sexual de *O. cassina*. Para ello, la investigación se desarrolló en tres etapas: en la primera se estudió el comportamiento de la especie bajo condiciones de laboratorio; en la segunda, se extrajeron e identificaron los VOCs liberados por los adultos y finalmente, en la tercera, se evaluó la respuesta electrofisiológica y comportamental de los insectos frente a los compuestos identificados.

La separación de los individuos adultos, de acuerdo con las características de dimorfismo sexual de la especie, permitió establecer la presencia de estructuras glandulares en el abdomen y alas de los machos, las cuales se han asociado con la producción de la feromona sexual de insectos de la misma familia y género. Por su parte, las observaciones del comportamiento bajo condiciones de laboratorio sugirieron que el llamado de los machos hacia las hembras ocurre entre las 18:00 y las 20:00 h, horario en el cual el macho llena sus estructuras glandulares, tiembla, realiza movimientos de abdomen y expone los penachos de las alas posteriores, mientras libera la feromona sexual. El análisis por CG-EM de las muestras de extracción directa con solvente, *head-space* dinámico HSD y *head-space* estático con micro-extracción en fase sólida HS-MEFS, permitió identificar tres VOCs específicos de los machos como (E)-nerolidol, vainillina y (Z)-7-heptadeceno. La evaluación por electroantenografía EAG, mostró que las hembras son estimuladas por los compuestos, lo que sugiere su posible participación en la interacción intraespecífica de la especie; sin embargo, bajo las condiciones empleadas en la evaluación comportamental no fue posible confirmar su acción atrayente. Pese a ello, los semioquímicos identificados pueden constituir 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: *Opsiphanes cassina*, palma de aceite, feromona, manejo integrado de plagas, control etológico.

Abstract

Sex pheromone as a strategy for the integrated management of *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 in oil palm crops

One of the leading pest insects affecting the Colombian palm sector is *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae). The high foliar consumption of the larval stage of this lepidopteran makes it an aggressive species that is difficult to manage, causing significant economic losses. The bioecological characteristics of *O. cassina* in oil palm cultivation indicate that one of the critical points for its integrated management is the monitoring and controlling of adult populations. In this sense, the modification of behavior in response to the use of stimuli of a chemical nature, such as pheromones, is a promising scenario. The objective of this work was to establish the extraction conditions, chemical analysis, and evaluation of the semiochemicals that modulate the sexual behavior of *O. cassina*. For this, the research involved three stages: in the first, the behavior of the specie was studied under laboratory conditions; in the second, the VOCs released by the adults were extracted and identified and finally, in the third, the electrophysiological and behavioral response of the insects against the identified compounds was evaluated.

The separation of the adult individuals, according to the characteristics of sexual dimorphism of the species, allowed us to establish the presence of glandular structures in the abdomen and wings of the males, which are associated with the production of the sex pheromone of insects of the same family and genus. On the other hand, the observations of behavior under laboratory conditions suggested that the call of the males towards the females occurs between 18:00 and 20:00 h, a time in which the male fills his glandular structures, trembles, makes movements in the abdomen and exposes the tufts of the hind wings, while releasing the sex pheromone. The analysis by GC-MS of the samples of direct extraction with solvent, DHS, and HS-SPME, allowed to identify of three specific VOCs of the males as (E)-nerolidol, vanillin, and (Z)-7-heptadecene. The evaluation by EAG, showed the females are stimulated by the compounds, which suggests their possible participation in the intraspecific interaction of the species; however, under the conditions used in the behavioral evaluation, it was not possible to confirm its attracting action. Despite this, the identified semiochemicals may constitute an alternative to be incorporated into the IPM of this pest in oil palm crops, so their evaluation in the field is recommended.

Keywords: *Opsiphanes cassina*; oil palm, pheromone, integrated pest management, ethological control.

Contenido

	Pag.
Resumen	XIII
Abstract	XV
Lista de abreviaturas	XIX
Lista de figuras	XXI
Lista de tablas	XXV
Introducción	1
Capítulo 1. Estado actual del tema.....	3
1.1. Ecología química como una herramienta para el manejo integrado de plagas	3
1.1.1. Aleloquímicos en el MIP: repelentes de herbívoros y atrayentes de enemigos naturales	4
1.1.2. Feromonas en el MIP: estrategias de monitoreo y control etológico.....	5
1.2. Etapas involucradas en el estudio de feromonas	11
1.2.1. Métodos de extracción.....	12
1.2.2. Caracterización e identificación de feromonas de insectos	15
1.2.3. Evaluación de la respuesta de los insectos frente a las feromonas bajo condiciones de laboratorio	15
1.3. El cultivo de palma de aceite.....	19
1.3.1. Generalidades	19
1.3.2. Incidencia y manejo de plagas en el cultivo de palma de aceite en Colombia.....	21
1.4. El insecto-plaga defoliador <i>Opsiphanes cassina</i> Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae)	23
1.4.1. Biología, ecología y comportamiento	23
1.4.2. Manejo de <i>Opsiphanes cassina</i> en el cultivo de palma de aceite	25
1.4.3. Comportamiento sexual en mariposas	26
1.4.4. Características estructurales de VOCs reportados para lepidópteros	27
Capítulo 2. Evaluación del comportamiento sexual de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio	33
2.1. Metodología	33
2.1.1. Insectos	33
2.1.2. Desarrollo de adultos de <i>O. cassina</i> bajo condiciones de laboratorio	34
2.1.3. Evaluación del comportamiento de adultos de <i>O. cassina</i> bajo condiciones de laboratorio	34
2.2. Resultados y discusión	36
2.2.1. Desarrollo de adultos de <i>O. cassina</i> bajo condiciones de laboratorio	36
2.2.2. Comportamiento de adultos de <i>O. cassina</i> bajo condiciones de laboratorio.....	37
2.3. Conclusiones.....	42
Capítulo 3. Estudio de la feromona sexual macho-específica de <i>Opsiphanes cassina</i>	43
3.1. Metodología	43
3.1.1. Insectos	43
3.1.2. Extracción de VOCs liberados por adultos de <i>O. cassina</i> bajo condiciones de laboratorio.....	43

3.1.3. Análisis CG-FID y CG-EM de los extractos obtenidos de adultos de <i>O. cassina</i>	46
3.2. Resultados y discusión	47
3.2.1. Extracción e identificación de VOCs liberados por adultos de <i>O. cassina</i> bajo condiciones de laboratorio.....	47
3.3. Conclusiones	60
Capítulo 4. Evaluación de la respuesta de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> frente a los VOCs macho-específicos identificados	61
4.1. Metodología	61
4.1.1. Insectos	61
4.1.2. Evaluación de la respuesta de adultos de <i>O. cassina</i>	61
4.2. Resultados y discusión	65
4.2.1. Evaluación de la respuesta electrofisiológica de adultos de <i>O. cassina</i>	65
4.2.2. Evaluación de la respuesta comportamental de adultos de <i>O. cassina</i>	68
4.3. Conclusiones	69
Capítulo 5. Conclusiones generales.....	71
Perspectivas	71
Participación en congresos	72
Referencias	91

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Definición
CAR	Carboxen
CG	Cromatografía de gases
DVB	Divinilbenceno
EAG	Electroantenografía
EM	Espectrometría de masa
EVB	Etilvinilbenceno
FID	Detector de ionización de llama (<i>flame ionization detector</i>)
HIPV	Compuestos volátiles de plantas inducidos por herbívoros (<i>herbivore-induced plant volatiles</i>)
HS	Espacio de cabeza (<i>head-space</i>)
HSD	Espacio de cabeza dinámico
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
IE	Ionización electrónica
IR	Índice de retención
IQ	Ionización química
MEFS	Microextracción en fase sólida
MIP	Manejo integrado de plagas
OBP	Proteínas de unión (<i>odorant-binding protein</i>)
ODE	Enzimas degradadoras (<i>odorant-degrading enzyme</i>)
ORCo	Correceptor olfativo (<i>odorant receptor coreceptor</i>)
OR	Receptor olfativo (<i>odorant receptor</i>)
OSN	Neuronas sensoriales olfativas (<i>olfactory sensory neuron</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PM	Peso molecular
TIC	Cromatograma de iones totales (<i>total ion chromatogram</i>)
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles (<i>volatile organic compounds</i>)

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1. A. Efecto del ataque de <i>Spodoptera frugiperda</i> sobre la oviposición y desarrollo de larvas en plantas de maíz. B. Atracción de <i>Trichogramma pretiosum</i> en plantas de maíz y arroz ovipositadas por <i>S. frugiperda</i> (Elaboración propia, creado con BioRender).....	5
Figura 1.2. Uso de feromonas para el monitoreo de lepidópteros-plaga en cultivos de frutales de interés comercial en América Latina (Elaboración propia, creado con BioRender).	8
Figura 1.3. Uso de feromonas en combinación con agentes de control químico y biológico para el manejo de <i>Tuta absoluta</i> en cultivos de tomate (Elaboración propia, creado con BioRender).	9
Figura 1.4. Uso de feromonas para la interrupción de la cópula de <i>Amyelois transitella</i> en cultivos de almendras (Elaboración propia, creado con BioRender).	10
Figura 1.5. Uso de feromonas como estrategia de MIP en el cultivo de palma de aceite en Colombia A. Esquema del control etológico de <i>Rhynchophorus palmarum</i> con semioquímicos B. Esquema de la evaluación de los VOCs de la feromona de <i>Strategus aloeus</i> (Elaboración propia, creado con BioRender).	11
Figura 1.6. Esquema de los montajes para extracción de los VOCs liberados por insectos (Elaboración propia, creado con BioRender).	12
Figura 1.7. Esquema del proceso olfativo de los insectos 1. Un VOC llega a las sensilias en la antena del insecto. 2. En las OSN, las OBP transportan el VOC a través de la hemolinfa hasta el complejo OR-ORCo 3. Activación del OSN y transmisión del impulso nervioso hasta los glomérulos del lóbulo antenal 4. Envío de las señales desde el lóbulo antenal a los cuerpos laterales y fungiformes 5. Liberación del VOC por acción de las ODE) (Figura adaptada, ^{14,66} creada con BioRender).	16
Figura 1.8. Esquema del principio de registro de electroantenografía (Figura adaptada, ⁷⁹ modificada con BioRender).	17
Figura 1.9. Esquema del montaje para la evaluación de feromonas para lepidópteros bajo condiciones de laboratorio (Figura adaptada, ¹⁴ creada con BioRender).	18
Figura 1.10. Cultivo de palma de aceite (<i>Elaeis guineensis</i>) en el municipio de Tumaco, Nariño, Colombia. Foto: J. Pastrana.	19
Figura 1.11. Distribución y participación en la producción de aceite de las cuatro zonas palmeras en Colombia en el periodo 2019 – 2022 (ID: Indonesia, MY: Malasia, TH: Tailandia, CO: Colombia, NG: Nigeria, GT: Guatemala, PG: Papúa Nueva Guinea, HN: Honduras, CI: Costa de Marfil, BR: Brasil, EC: Ecuador) (Figura adaptada, ^{88,96} creada con BioRender).	21
Figura 1.12. Ciclo de vida de <i>Opsiphanes cassina</i> [♀(hembra) ♂(macho)] (Elaboración propia, creada con BioRender. Fotos: J. Pastrana – J. Bustos).	23
Figura 1.13. Cultivo de palma (híbrido interespecífico OxG) defoliado por <i>Opsiphanes cassina</i> . Foto: J. Pastrana..	24
Figura 1.14. Esquema de las estrategias de búsqueda de pareja en machos de mariposas (Elaboración propia, creado con BioRender).	27
Figura 1.15. Estructuras características de feromonas producidas por lepidópteros [Z = doble enlace con isomería <i>cis</i> ; E = doble enlace con isomería <i>trans</i> ; el número antes del guion = posición del doble enlace; número después del guion = el número de carbonos de la cadena lineal; OAc = acetato; OH = alcohol; Ald = aldehído; H = ausencia de un grupo funcional terminal; Δ = doble enlace terminal; epo = anillo <i>cis</i> -epoxi; t-epo = anillo <i>trans</i> -epoxi; Me = grupo metilo; y, ket = grupo cetona] (Figura adaptada, ⁸¹ creada en ChemDraw).	28

Figura 2.1. A. Características de dimorfismo sexual de adultos del género <i>Opsiphanes</i> (Nymphalidae) [♀(hembra) ♂(macho)]. B. Jaulas entomológicas para mantenimiento de adultos. Fotos: J. Pastrana y J. Bustos.	34
Figura 2.2. Esquema de la metodología empleada para la evaluación del comportamiento de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio.....	34
Figura 2.3. Características de dimorfismo sexual de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> emergidos bajo condiciones de laboratorio [♀(hembra) ♂(macho)]. (A la izquierda se compara la vista dorsal y ventral de los adultos; a la derecha se compara el abdomen y las alas posteriores de los adultos, señalando las zonas donde se presentan las estructuras glandulares en machos). Fotos: J. Bustos	36
Figura 2.4. Horario de emergencia de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio [♀(hembras) ♂(machos)] (♂n= 74 y ♀n=56).....	37
Figura 2.5. Ritmo de emergencia de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio [♀(hembras) ♂(machos)] (♂n= 74 y ♀n=56).....	37
Figura 2.6. Horario de actividad de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio (se presenta el promedio \pm desviación estándar de las observaciones de 5 días para 20 adultos) (♂n= 15 y ♀n=5) (La vibración y movimiento de abdomen solo se presentó en machos).....	38
Figura 2.7. Horario de actividad sexual de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio (se presenta el promedio \pm desviación estándar de las observaciones de 3 días para 8 parejas y 2 grupos a adultos; la vibración y movimiento de abdomen solo se presentó en machos).	39
Figura 2.8. Horario de llamado de machos de <i>Opsiphanes cassina</i> de diferentes días de edad, bajo condiciones de laboratorio.	41
Figura 2.9. Duración del llamado (A) y número de llamados (B) de machos de <i>Opsiphanes cassina</i> de diferentes días de edad, bajo condiciones de laboratorio.	41
Figura 3.1. Esquema de la metodología empleada para la extracción y detección de VOCs liberados por adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> bajo condiciones de laboratorio (HSD: <i>head-space</i> dinámico, HS-MEFS: <i>head-space</i> estático con microextracción en fase sólida).	44
Figura 3.2. Montaje de HSD empleado para la extracción de VOCs liberados por adultos de <i>Opsiphanes cassina</i>	45
Figura 3.3. Montaje de HS-MEFS empleado para la extracción de VOCs liberados por adultos de <i>Opsiphanes cassina</i>	46
Figura 3.4. Cromatogramas CG-FID de los VOCs detectados por extracción directa con hexano en muestras de abdomen de 13 machos adultos de campo y cría de <i>Opsiphanes cassina</i> en una columna HP-5.....	47
Figura 3.5. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción directa con hexano en muestras de alas de machos (♂) y hembras (♀) adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.1. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos. .	49
Figura 3.6. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción directa con diclorometano en muestras de alas de machos (♂) y hembras (♀) adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.1. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos.	49
Figura 3.7. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción por HSD con Porapak-Hexano en muestras de machos (♂) y hembras (♀) adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.2. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos. .	51
Figura 3.8. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción por HS-MEFS en muestras de machos (♂) y hembras (♀) adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.3. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos. .	52
Figura 3.9. Espectro de masas por IE a 70 eV del compuesto macho-específico (E)-nerolidol (4) liberado por <i>Opsiphanes cassina</i>	54
Figura 3.10. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs liberados por machos (♂) y hembras (♀) adultos de cría de <i>Opsiphanes cassina</i> en presencia de foliolos de palma de aceite, en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.4.....	55
Figura 3.11. Espectro de masas por IE a 70 eV del compuesto macho-específico vainillina (3) liberado por <i>Opsiphanes cassina</i>	57

Figura 3.12. Espectro de masas por IE a 70 eV del compuesto macho-específico (Z)-7-heptadeceno (5) liberado por <i>Opsiphanes cassina</i> .	58
Figura 3.13. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs presentes en muestras de extracción directa de alas con hexano y diclorometano de machos de <i>Opsiphanes cassina</i> de dos poblaciones geográficas diferentes en una columna HP-5.	59
Figura 4.1. Montaje del sistema de electroantenografía empleado para la evaluación de la respuesta electrofisiológica de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> .	63
Figura 4.2. Montaje túnel de viento empleado para la evaluación de la respuesta comportamental de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> .	63
Figura 4.3. Esquema de las respuestas de comportamiento consideradas en la evaluación en túnel de viento.	65
Figura 4.4. Morfología de antenas de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> . Fotos: J. Bustos.	65
Figura 4.5. Respuestas EAG de la antena de una hembra de <i>Opsiphanes cassina</i> obtenida al evaluar mediante <i>puffs</i> los VOCs macho-específicos.	66
Figura 4.6. Tiempo de respuesta EAG de antenas de hembras de <i>Opsiphanes cassina</i> al VOC macho-específico mayoritario (A=antena, n=4).	66
Figura 4.7. Respuestas EAG a 0, 5 y 10 minutos de las antenas de hembras de <i>O. cassina</i> frente al VOC macho-específico mayoritario. Se realizó un análisis ANOVA, concluyendo que no hay diferencias significativas entre las medias de las respuestas EAG para los tres tiempos evaluados con una confianza del 95 % ($p < 0,05$), ($F_{\text{experimental}} [0,088] < F_{\text{crítico}} [4,256]$).	66
Figura 4.8. Respuestas EAG de las antenas de hembras y machos de <i>Opsiphanes cassina</i> frente a extractos cuticulares de machos y compuestos individuales macho-específicos (se presenta el promedio \pm desviación estándar de la respuesta de 3 antenas para cada sexo).	67
Figura 4.9. Respuesta comportamental de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> en bioensayo de túnel de viento, frente al VOC macho-específico mayoritario a diferentes dosis bajo condiciones de laboratorio.	68

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Dispensadores y trampas empleadas para el uso de feromonas en el control de lepidópteros.	6
Tabla 1.2. Características de las fibras para extracción HS estático-MEFS. *	13
Tabla 1.3. Características de los adsorbentes para extracción HE-dinámico. *	14
Tabla 1.4. Características estructurales de los VOCs que constituyen la feromona sexual producida por machos de especies de la familia Nymphalidae, subfamilia Satyrinae.	29
Tabla 3.1. VOCs detectados en muestras de extracción directa con solvente de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> por CG-EM, bajo condiciones de laboratorio.....	48
Tabla 3.2. VOCs detectados en muestras de extracción por HSD de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> por CG-EM, bajo condiciones de laboratorio. *	50
Tabla 3.3. VOCs detectados en muestras de extracción por HS-MEFS de adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> por CG-EM, bajo condiciones de laboratorio.....	51
Tabla 3.4. VOCs liberados por adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> extraídos mediante HS-MEFS, HSD y extracción directa con solvente bajo condiciones de laboratorio. *	53
Tabla 4.1. Estímulos olfativos evaluados sobre adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> por EAG.	62
Tabla 4.2. Estímulos olfativos evaluados sobre adultos de <i>Opsiphanes cassina</i> en túnel de viento.	64

Introducción

El lepidóptero *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) es un insecto-plaga que reduce significativamente el rendimiento del cultivo de palma de aceite en países productores como Colombia, Brasil y Costa Rica.^{1,2,3} El daño en la planta es provocado por el consumo foliar que realiza el insecto durante el estadio larval. Inicialmente la tasa de alimentación es baja, afectando solamente los bordes de los folíolos, pero al llegar al cuarto instar, la larva elige un prospecto y genera una incisión inclinada en ambos lados de la vena central del folíolo, alcanzando un consumo de hasta 300 cm²/individuo.⁴ Esta condición incide directamente sobre el crecimiento de la palma de aceite ya que, este depende del desarrollo progresivo de su área foliar; así mismo, la pérdida de calidad del follaje disminuye la eficacia fotosintética de la planta y, por tanto, la productividad del cultivo.^{5,6}

Para abordar esta problemática actualmente se realizan prácticas de control cultural, mecánico, etológico, biológico y químico; sin embargo, no se ha logrado realizar un manejo integrado de *O. cassina* que resulte efectivo y tenga un impacto favorable a nivel ambiental.⁷ Entre las estrategias que fomentan los mecanismos naturales de control de adultos de lepidópteros y generan la menor alteración de los ecosistemas agrícolas, se encuentra la modificación del comportamiento en respuesta al uso de estímulos de naturaleza química como las feromonas.⁸ Estas sustancias corresponden a mezclas de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) que median la comunicación intraespecífica de los insectos y son pieza clave en la localización de parejas, así como en el proceso de cópula.^{9,10} Además, gracias a su alta especificidad y capacidad de atracción a bajas concentraciones constituyen una herramienta ideal para el diseño de trampas cebadas con atrayentes para el monitoreo y control de las poblaciones efectivas de adultos, así como un mecanismo para la interrupción de la cópula.^{11,12,13} En el caso particular de la familia Nymphalidae, subfamilia Satyrinae, se ha reportado que los machos son los responsables de producir la feromona sexual que regula el proceso de cópula, encontrando que los VOCs que la componen se derivan tanto de rutas de biosíntesis endógena reportadas para el orden Lepidoptera, como de compuestos producidos por la planta hospedera.^{2,14,15,16,17,18,19,20}

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este proyecto de maestría fue contribuir al manejo integrado de la especie *O. cassina* en el cultivo de palma de aceite a través del estudio de los VOCs que constituyen su feromona sexual. El cumplimiento de este objetivo se desarrolló en tres etapas: en la primera, se estudió el comportamiento sexual de la especie bajo condiciones de laboratorio, con el fin de determinar algunas de las condiciones requeridas para la extracción de los VOCs liberados por los adultos, como la ubicación de las secciones glandulares del insecto emisor y el horario de actividad. En la segunda etapa se identificaron los semioquímicos que podrían mediar la comunicación sexual de los adultos de *O. cassina*. Finalmente, en la última fase se evaluó la respuesta del insecto frente a los

compuestos previamente identificados. La organización de este documento responde a las tres etapas mencionadas, presentando en el primer capítulo los conceptos generales involucrados en la aplicación de la ecología química como una estrategia de manejo integrado y su potencial para el manejo de *O. cassina* en cultivos de palma de aceite.

Capítulo 1. Estado actual del tema

Este capítulo corresponde a una revisión sobre los conceptos generales involucrados en el tema de investigación abordado en esta tesis de maestría. En primer lugar, se explica cómo la ecología química resulta una herramienta estratégica en el manejo integrado de plagas, definiendo y ejemplificando los tipos de interacciones mediadas por semioquímicos. Igualmente, se presentan los aspectos teóricos y metodológicos involucrados en el estudio de feromonas de insectos. Posteriormente, se exponen las generalidades e importancia del cultivo de palma de aceite (*Elaeis guineensis*, *E. oleifera* Kunth e híbridos interespecíficos OxG), describiendo algunas características agronómicas y fitosanitarias del cultivo en Colombia. Así mismo, se describen las características bioecológicas y de comportamiento de *Opsiphanes cassina*, exponiendo los métodos de control empleados para su manejo actual y mostrando el potencial que presenta el estudio de la feromona sexual para su monitoreo y control.

1.1. Ecología química como una herramienta para el manejo integrado de plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es un programa que coordina múltiples estrategias de monitoreo y control de manera compatible realizando análisis de costo-beneficio que toman en cuenta los intereses e impactos sobre los productores, la sociedad y el medio ambiente. El concepto *integrado* implica que se adopta un enfoque interdisciplinario amplio aplicando principios de fisiología vegetal, entomología y ecología, entre otros, para fusionar en un solo sistema una variedad de estrategias y tácticas de manejo; a su vez esta integración debe ser compatible con los sistemas totales de producción y comercialización de las materias primas derivadas del cultivo. Por su parte, el *manejo* es el proceso de toma de decisiones para controlar las poblaciones de plagas de manera planificada y sistemática manteniendo su número y/o daño a niveles económicamente aceptables.^{21,22} En este escenario, el papel de la química ha estado asociado principalmente con el uso de sustancias que tienen un efecto tóxico en el organismo-plaga permitiendo regular sus poblaciones, sin embargo, su participación es mucho más amplia y significativa e involucra aspectos como el estudio de las interacciones de naturaleza química entre los individuos y su entorno, así como las consecuencias de esas interacciones sobre el comportamiento y el desarrollo de los organismos involucrados, a través de la ecología química.^{23,24}

Las sustancias químicas emitidas por plantas, animales, hongos y otros organismos (o análogos sintéticos de tales sustancias), que estimulan una respuesta fisiológica o un comportamiento entre individuos de la misma u otra especie, se conocen como semioquímicos y se clasifican en dos grupos, aquellos que median la comunicación dentro de una especie, denominados feromonas, y los responsables de la señalización entre diferentes especies, llamados aleloquímicos.^{25,26} Estos a su vez se agrupan según el beneficio que un emisor y/o receptor puede obtener de la quimios señal en: alomonas,

cairomonas, sinomonas y apneumonas. En el caso de las alomonas, solo el emisor se beneficia de la señal liberada; por ejemplo, una sustancia enviada por una planta puede repeler a un insecto herbívoro o atraer a un insecto a una trampa. En cambio, las cairomonas transmiten información que es positiva solo para el receptor, que puede ser, por ejemplo, un depredador que se siente atraído por el olor de la presa. Por su parte, las sinomonas tienen un efecto beneficioso para ambas partes, como cuando el polinizador de una planta es recompensado con néctar. Finalmente, se encuentran las apneumonas, que son liberadas por materia no viva y pueden contener información beneficiosa para el receptor, por ejemplo, cuando las heces de algunos herbívoros atraen dípteros o coleópteros coprófagos indicando sitios de oviposición y/o alimentación.^{27,28,29} Gracias a las diversas funciones ecológicas que ejercen los semioquímicos, que en su mayoría corresponden a emisiones individuales o mezclas de compuestos orgánicos volátiles (VOCs *Volatile Organic Compounds*), su estudio y aplicación se ha convertido en una herramienta útil en la búsqueda de estrategias para realizar mejores programas de MIP.³⁰

1.1.1. Aleloquímicos en el MIP: repelentes de herbívoros y atrayentes de enemigos naturales

Las plantas al ser atacadas por insectos producen un grupo de sustancias denominadas compuestos volátiles de plantas inducidos por herbívoros (HIPV *Herbivore-Induced Plant Volatiles*), que pueden incluir aleloquímicos que actúan como repelentes, disuasorios de alimentación e inhibidores de oviposición de plagas herbívoras o, por otro lado, como atrayentes para organismos antagónicos a estas plagas, incluyendo depredadores y parasitoides.^{31,32,33} Los estudios sobre los mecanismos que conducen a la producción de HIPV han revelado el papel de elicitores específicos, moléculas derivadas de insectos herbívoros o de la actividad de alimentación de los mismos, que las plantas reconocen y les permiten modular la activación de varias vías de señalización, lo que resulta en la acumulación o liberación de sustancias químicas defensivas o de tolerancia.^{34,35} Como ejemplo, en un estudio sobre el gusano cogollero de plantas de cereales *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), se encontró que hubo una preferencia significativa por la oviposición en plantas de maíz (*Zea mays* (Poaceae)) que carecían de daño por alimentación de larvas, y además que las larvas alimentadas con tejido de plantas dañadas exhibieron pesos y anchos de cápsula de cabeza reducidos.³⁶ Así mismo, se observó que la alimentación de las larvas promovió un aumento significativo de las concentraciones VOCs en comparación con las plantas de maíz sin ningún tipo de ataque, principalmente en la producción de ácido linoleico, compuesto que previamente ha reportado toxicidad para larvas del género *Spodoptera*, lo que explicaría la disuasión en la alimentación.^{36,37,38} Adicionalmente, la liberación de VOCs diferenciales puede indicar que las defensas de las plantas han sido superadas y que, en consecuencia, están debilitadas y hay una disminución en la calidad del recurso (**Figura 1.1 A**).³³ En cuanto a relaciones tritróficas, en un estudio realizado sobre la interacción entre el insecto-plaga *S. frugiperda* y el parasitoide de huevos *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en plantas de maíz y arroz (*Oryza sativa* (Poaceae)), se observó que *T. pretiosum* se sintió más atraído por las plantas con daño por herbivoría en comparación con las plantas no dañadas. Igualmente, los parasitoides prefirieron las plantas ovipositadas sobre las plantas de control y hubo un mayor parasitismo en huevos centinela ubicados cerca de plantas dañadas por herbivoría. Esto sugirió que el cambio en el perfil de VOCs emitidos por plantas de arroz y maíz atacadas por larvas de *S. frugiperda* no solo genera la atracción de su enemigo natural *T. pretiosum*, sino que mejora la búsqueda de huevos e incrementa su parasitismo (**Figura 1.1 B**).³⁹

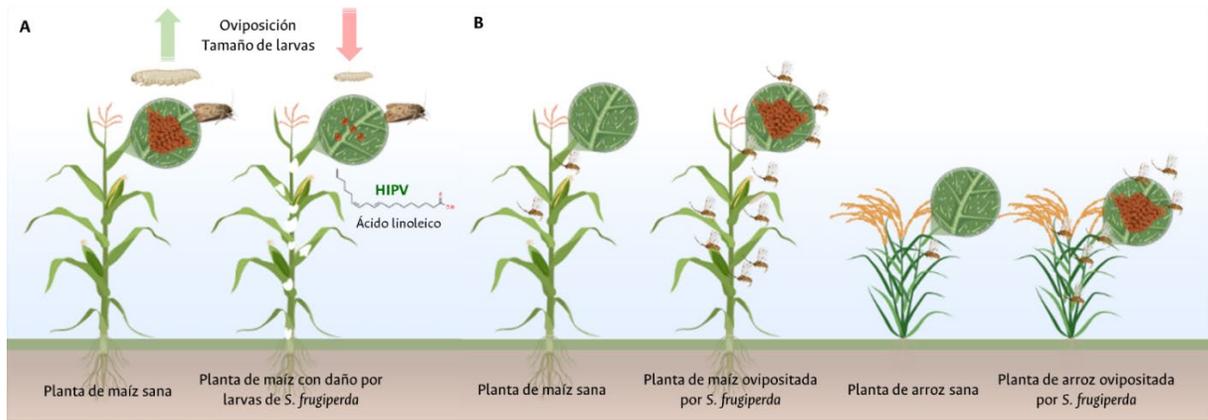


Figura 1.1. A. Efecto del ataque de *Spodoptera frugiperda* sobre la oviposición y desarrollo de larvas en plantas de maíz. **B.** Atracción de *Trichogramma pretiosum* en plantas de maíz y arroz ovipositadas por *S. frugiperda* (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.1.2. Feromonas en el MIP: estrategias de monitoreo y control etológico

Entre las sustancias más estudiadas en la ecología química de los insectos se encuentran las feromonas, compuestos que intervienen en la comunicación intraespecífica, regulando procesos de selección de alimento, evasión de depredadores, apareamiento, oviposición, entre otros.⁸ Esto se debe a que para estos artrópodos el olfato resulta ser una de las principales modalidades sensoriales para percibir su entorno externo y modular su comportamiento.⁴⁰ Aunque algunas feromonas pueden contener un solo compuesto químico, la mayoría consiste en mezclas de varios VOCs en proporciones y concentraciones específicas; se ha reportado que para algunas especies la estructura química de estos compuestos está relacionada con el grupo taxonómico (orden, familia y género) del insecto, al igual que con el perfil químico de las sustancias producidas por la planta hospedera.⁹

Las feromonas suelen presentar un efecto benéfico tanto para el emisor como para el receptor y dependiendo del dominio del tiempo en el que actúan, las feromonas se distinguen como liberadoras o iniciadoras.⁴¹ Las liberadoras activan una respuesta conductual breve e inmediata en el receptor, mientras que las iniciadoras provocan cambios fisiológicos duraderos o preparan al receptor para una señalización posterior.⁴² A su vez, las feromonas pueden ser de alarma, para avisar la presencia de amenazas; de reclutamiento, para reunir individuos con el fin de aprovechar un recurso o para ocupar un nicho; de territorialidad, para indicar el área específica donde se puede establecer o no una colonia; de marcación, para orientar hacia fuentes de alimento o nuevos sitios de vivienda; de agregación, para asociar miembros de ambos sexos a actividades de alimentación o hibernación; y sexuales para regular procesos de apareamiento, entre otras, nombradas dependiendo de sus funciones.¹⁴ En el caso de los lepidópteros, las feromonas sexuales son las más estudiadas, dado que incitan comportamientos estereotípicos al ser la principal señal que utilizan para localizar pareja. Se ha encontrado que la feromona sexual liberada por hembras tiene el potencial de estimular a los machos para la cópula actuando a largas distancias, mientras que la feromona sexual producida por los machos, tiene la característica de actuar a distancias más cortas, favoreciendo la aceptación de la hembra para la cópula.¹⁰

Gracias a la alta especificidad, baja toxicidad para el medio ambiente, capacidad de atracción a bajas concentraciones y al papel que desempeñan en la localización de parejas y el proceso de cópula, las feromonas sexuales se han convertido en los semioquímicos más empleados como herramientas de monitoreo y control de lepidópteros-plaga en cultivos de interés comercial.^{11,12,13} Su uso ha logrado a largo plazo la reducción de poblaciones con un impacto mínimo sobre enemigos naturales y fauna benéfica, e igualmente, ha disminuido significativamente el uso de insecticidas químicos convencionales, proporcionando así planes de MIP sostenibles y ecológicos en los cultivos agrícolas.^{43,44} Entre las estrategias empleadas para la aplicación de feromonas, de manera general, se encuentra el monitoreo y/o captura masiva con atrayentes y la interrupción de la cópula. En el monitoreo con atrayentes se usan trampas con superficies impregnadas con feromonas; esa estrategia se emplea para detectar el insecto-plaga, identificarlo y evaluar su evolución en un periodo de tiempo, permitiendo generar programas de intervención. Por su parte, la captura masiva se basa en colocar una alta densidad de trampas para atraer y capturar grandes cantidades de individuos de la especie de interés, reduciendo su población efectiva.⁴⁵ En cuanto a la interrupción de la cópula, esta estrategia se basa en dispersar grandes cantidades de feromona en el cultivo, para impedir la comunicación entre hembras y machos, interrumpiendo el ciclo reproductivo del insecto-plaga.⁴⁶

La elección de la estrategia a aplicar en campo es determinante, ya que con ella se definirán los aspectos técnicos (cantidad, formulación, degradación, tipo de dispensación), y de mercado (sostenibilidad) para el desarrollo de un producto aplicable.¹⁴ En este escenario, la elección de dispensadores y trampas es uno de los puntos de especial atención; los desafíos respecto a los dispensadores implican factores como la protección de los VOCs de la degradación por factores ambientales al igual que su liberación constante y uniforme a lo largo del tiempo (velocidad de difusión del compuesto a través de la matriz y velocidad de evaporación del compuesto en el aire).^{47,48} En cuanto a las trampas, se deben considerar en su diseño características como el tamaño, el color, la vía de ingreso del insecto, así como el mecanismo para su retención. Adicionalmente, es necesario tener en cuenta la altura, la posición con respecto a la vegetación, así como la densidad y distribución de las trampas en el cultivo.⁴⁹ En la **Tabla 1.1** se muestran algunos ejemplos de los tipos de dispensadores y trampas que se han empleado para el control etológico de lepidópteros.

Tabla 1.1. Dispensadores y trampas empleadas para el uso de feromonas en el control de lepidópteros.

Dispensadores ^{47,50}			
Láminas de Polipropileno	Láminas de Polietileno	Septas de Polibutadieno	Septas de goma (75 % Polibutadieno - 25 % Poliestireno)
			
Fórmula: $(C_3H_6)_n$	Fórmula: $(C_2H_4)_n$	Fórmula: $(C_4H_6)_n$	Fórmula: $(C_4H_6)_n + (C_8H_8)_n$

Trampas ^{48,49,51,52}			
Delta	De agua	De alas	De cubo
			
<p>Triangular con dos vías de acceso para el insecto, usando como estrategia de captura una superficie adhesiva.</p>	<p>Recipiente plástico con agua y con una pequeña cantidad de aceite vegetal o jabón que impide que el insecto escape y disminuye la tasa de evaporación del agua.</p>	<p>Dos superficies rectangulares unidas de manera paralela con un cable, que proporcionan amplio acceso para el insecto, usando como estrategia de captura una superficie adhesiva.</p>	<p>Recipiente plástico que consta de 1 tapa, 1 canasta para ubicar el señuelo con tapa, 1 embudo y 1 balde. El insecto queda atrapado en el balde, el cual ocasionalmente contiene insecticidas.</p>

A continuación, se muestran algunas consideraciones para el uso de feromonas en las diferentes estrategias de MIP, al igual que ejemplos de aplicación en cultivos de interés comercial.

1.1.2.1. Monitoreo

Los sistemas de monitoreo se basan en la relación entre las capturas en trampas y la población de plagas o el efecto inducido por las mismas; a su vez, el número de capturas se utiliza para establecer umbrales de daño económico que permiten tomar decisiones sobre cuándo es aconsejable realizar acciones de control.⁵³ Las feromonas sexuales son muy útiles para evaluar las capturas de trampas porque son altamente sensibles cuando hay niveles bajos de población de insectos y son específicas para cada especie; así mismo estas características permiten la detección y el estudio de especies invasoras, permitiendo a los productores realizar aplicaciones oportunas de insecticidas, lo que reduce los costos económicos y ambientales.^{43,54} En un estudio reciente realizado sobre *Proeulia auraria* (Clarke, 1949) (Lepidoptera: Tortricidae), una plaga nativa, polífaga y creciente en varios cultivos frutales de Chile, con importancia cuarentenaria para varios mercados, fue posible optimizar la mezcla de los componentes de la feromona para el monitoreo de adultos y determinar el período de actividad de los difusores en condiciones de campo, encontrando que los difusores cargados con 200 µg de acetato de (E)-11-tetradecenilo + 60 µg de (E)-11-tetradecenol permitieron realizar capturas en trampa eficientes hasta por 10 semanas.⁵⁵ Esta mezcla además les permitió estudiar la fenología de machos adultos en viñedos, manzanos y huertos de arándanos, identificando dos largos ciclos de vuelo por temporada, que duran de septiembre a mayo y sugieren 2 o 3 generaciones durante la temporada;⁵⁵ esta información resulta importante pues les permite determinar en qué momento resultaría eficiente implementar estrategias de control (**Figura 1.2**).⁴⁵ Otro ejemplo, que muestra los beneficios económicos del uso a largo plazo de trampas cebadas con la feromona sexual, es la del monitoreo y control del barrenador de los cítricos *Gymnandrosoma aurantianum* (Lima, 1927) (Lepidoptera: Tortricidae) en el centro-sur de Brasil.⁵⁶ El estudio realizado mostró que desde la identificación de la feromona en 2001 (acetato de (E)-8-dodecenilo y (E)-8-dodecenol),⁵⁷ hasta el 2013, los productores de cítricos evitaron pérdidas acumuladas por plagas de 132,7 millones a 1,32 mil millones de dólares en ingresos brutos, considerando pérdidas potenciales de cultivos

en el rango de 5 – 50 %. Así mismo los datos mostraron una relación costo-beneficio de 2.655 a 26.548 dólares por dólar gastado en investigación con una pérdida de rendimiento evitada estimada en el rango de 5 – 50 % (**Figura 1.2**).⁵⁸

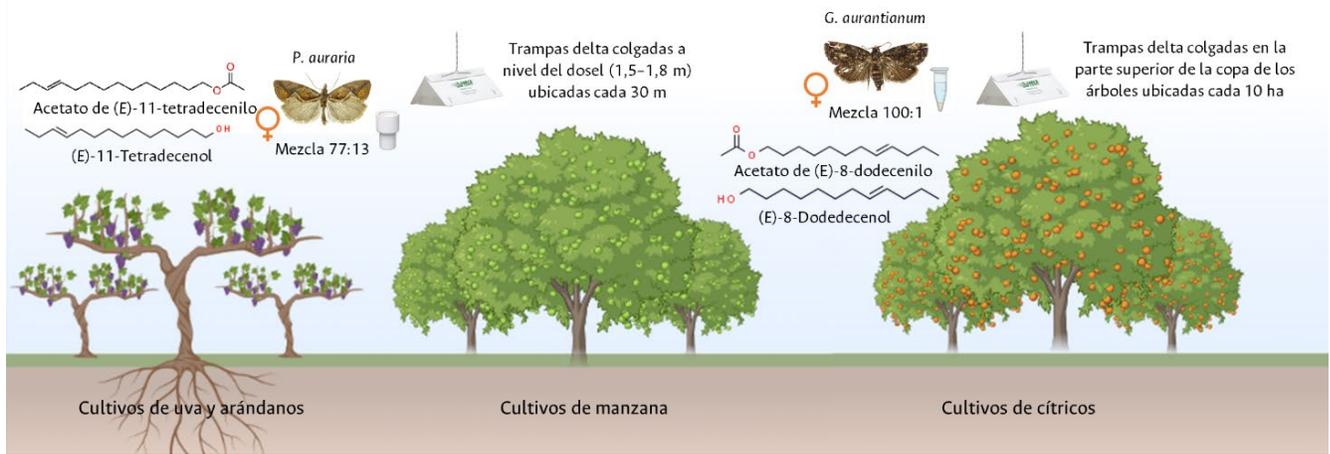


Figura 1.2. Uso de feromonas para el monitoreo de lepidópteros-plaga en cultivos de frutales de interés comercial en América Latina (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.1.2.2. Eliminación masiva

La eliminación masiva, mediante captura masiva o uso de atraccidas (“*attract-and-kill*”), es una estrategia de control directo, en la que se utiliza una alta densidad de trampas de gran capacidad o trampas que contienen insecticidas, para reducir la población del insecto-plaga de interés.⁵⁹ Como se mencionó anteriormente, es importante considerar que el diseño de la trampa es una característica importante en la atracción y captura de insectos, además de la feromona en sí misma. Varios factores bioecológicos, incluido el tamaño del insecto, la capacidad de vuelo, la densidad de población, la planta hospedera, el hábito y comportamiento, así como factores ambientales, tales como lluvia, humedad relativa, temperatura, velocidad y dirección del viento, entre otros, pueden afectar la eficiencia de una trampa para atrapar insectos.^{60,61} En un trabajo realizado en cultivos de maíz en dos regiones de México durante 2020 y 2021, se encontró que el uso de trampas cebadas con la feromona sexual (acetato de (Z)-9-tetradecenilo y acetato de (Z)-7-dodecenilo) resulta útil para el control de *S. frugiperda*. La trampa, que consistió en una jarra plástica blanca de 5L con tres ventanas cuadradas (dos de 14×19 cm y una de 14×12 cm), con agua jabonosa al 5 % como solución de ahogamiento y un dispensador de caucho rojo colgado en la parte superior de la jarra, mostró una eficiencia del 42,5 % en la captura de machos.⁶² Esta trampa en comparación con otras evaluadas permitió de manera diferencial la navegación del insecto a lo largo de la pluma hasta su fuente y una amplia área de caída libre para la retención.⁶²

En cuanto a las estrategias “*attract-and-kill*”, se ha reportado tanto el uso de agentes de control químico como biológico para el control de adultos.⁶³ En un estudio realizado en cultivos de tomate en Etiopía, se evaluó el efecto de la combinación de la feromona sexual del minador *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) (acetato de (E3, Z8, Z11)-tetradecatrienilo) con el uso de Spinosad (spinosinas A y D: compuestos tetracíclicos de macrólidos), un

insecticida no sistémico que actúa por contacto e ingestión; los resultados mostraron que tanto el daño a las hojas como al fruto fue más bajo en el tratamiento integrado de la feromona con el insecticida respecto a los tratamientos individuales (Figura 1.3).⁶⁴ Por otro lado, en un estudio realizado en Kenia, se evaluó la compatibilidad de hongos entomopatógenos con la feromona sexual comercial de *T. absoluta* (TUA-Optima®), observando que tres cepas de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) que fueron efectivas contra adultos y larvas del cuarto instar, mostraron compatibilidad con la feromona y además presentaron transmisión horizontal del inóculo del hongo entre sexos, lo que muestra su potencial para emplearlas en ensayos de auto diseminación en aplicaciones de campo (Figura 1.3).⁶⁵

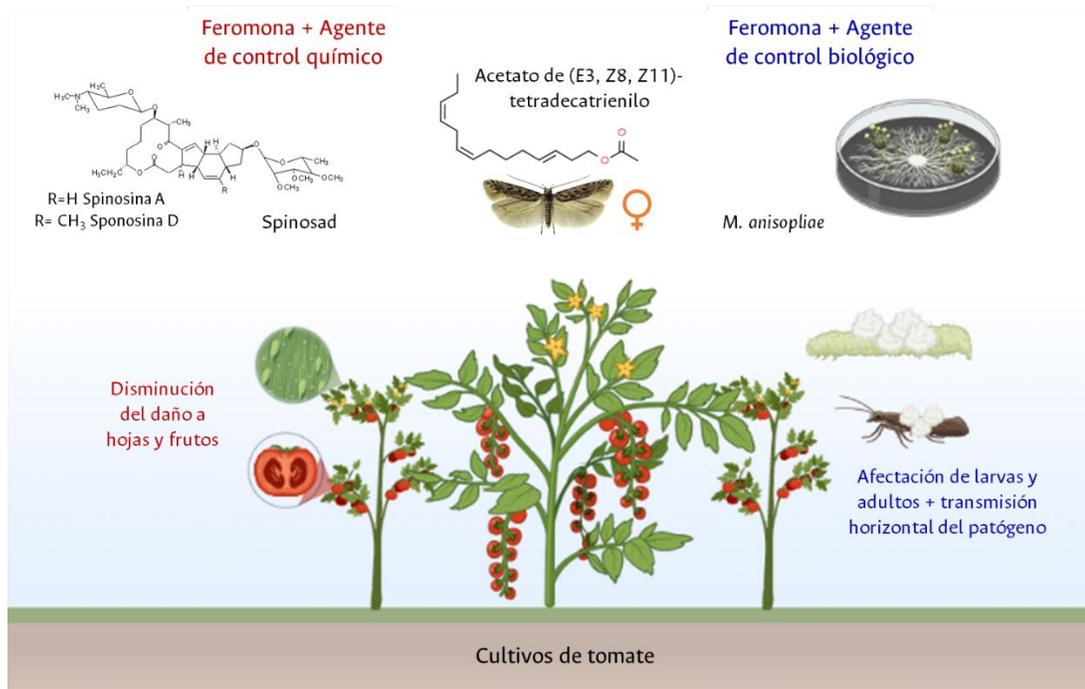


Figura 1.3. Uso de feromonas en combinación con agentes de control químico y biológico para el manejo de *Tuta absoluta* en cultivos de tomate (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.1.2.3. Interrupción de la cópula

La liberación de grandes cantidades de feromonas en un cultivo para evitar o retrasar el apareamiento ha sido notablemente eficiente en una variedad de casos, por lo que ahora es una opción de control empleada considerablemente en el control de lepidópteros-plaga.⁴³ Para explicar esta estrategia se han sugerido dos tipos de interrupción: la competitiva y la no competitiva. En la primera, los dispensadores de la feromona compiten directamente con el insecto que produce la feromona, creando gradientes químicos falsos que impiden que el insecto receptor encuentre a su pareja. En el segundo caso, se proponen mecanismos variados que están relacionados con una afección de la fisiología del insecto, entre los que se encuentra la supresión en la liberación de feromonas por parte del insecto emisor, o alteraciones en el sistema olfativo de los insectos receptores.^{14,66} Es necesario considerar que la efectividad de la interrupción de la cópula está fuertemente relacionada con la densidad de la población, y en muchos casos

donde la densidad poblacional del insecto es muy alta, el control con esta estrategia presenta mayores dificultades.⁶³ Por otro lado, también debe considerarse el diseño y distribución del dispensador, que entre otras características, debe liberar la feromona a un ritmo constante y a su vez emitir altas cantidades de feromona empleando el menor número de dispensadores por hectárea para reducir los costos de mano de obra.^{43,67} En un trabajo realizado entre 2017 y 2018 en cultivos de almendra en California, Estados Unidos, se estudió la efectividad varios tratamientos para la interrupción de la cópula del insecto-plaga *Amyelois transitella* Walker, 1863 (Lepidoptera: Pyralidae). En todos los tratamientos, se lograron reducir las capturas de machos en trampas de feromonas en más del 94 %, el daño directo al grano se redujo entre un 65 – 78 %, y a su vez se obtuvo un aumento promedio en el valor de la cosecha de 357 dólares/ha. Los análisis económicos mostraron que los aumentos en los rendimientos de los cultivos excedieron los costos de implementación de los sistemas de interrupción de la cópula con un punto de equilibrio que osciló entre 0,86 – 1,06 % del daño del grano, indicando que la inclusión de este tipo de estrategia es una forma rentable de reducir el daño al cultivo (Figura 1.4).⁶⁸

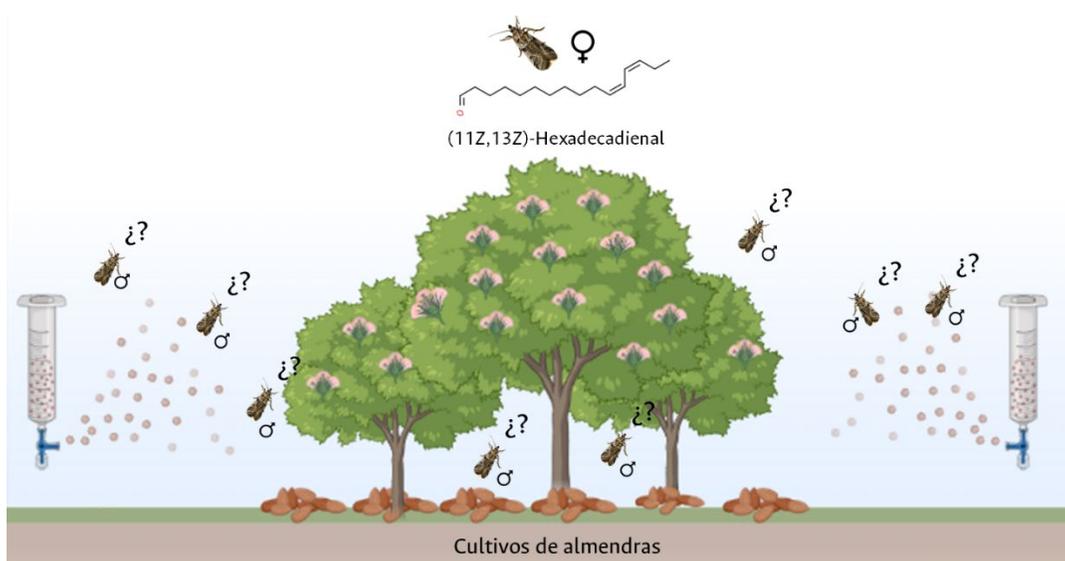


Figura 1.4. Uso de feromonas para la interrupción de la cópula de *Amyelois transitella* en cultivos de almendras (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.1.2.4. Repeler y atraer

Una estrategia cada vez más incluida en programas de MIP es el uso simultáneo de un estímulo atrayente y otro repelente para desviar los insectos-plaga del cultivo y llevarlos a áreas alejadas donde puedan ser eliminados; esto con el objetivo reducir el daño a los cultivos modificando la distribución de la población.⁴³ El éxito de la aplicación de esta estrategia requiere del conocimiento de la biología de los insectos, de su ecología química y la interacción con plantas hospederas, plantas compañeras y enemigos naturales.⁵⁴ En este escenario, las feromonas sexuales y de agregación, además de servir como atrayentes, contribuyen al establecimiento del momento en que se deben introducir los estímulos; por su parte, las feromonas de alarma, inhibitorias de agregación, oviposición y/o alimentación resultan útiles como repelentes.

Adicionalmente, la combinación con otros aleloquímicos presenta en muchos casos efectos aditivos o sinérgicos que favorecen la modulación del comportamiento del insecto-plaga de acuerdo a lo que sea requerido para realizar su control.⁶⁹

Además de los ejemplos expuestos anteriormente, el uso de feromonas se ha implementado como estrategia de MIP en uno de los cultivos agroindustriales más importantes de Colombia, la palma de aceite. Al estudiar al picudo negro *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Curculionidae), (barrenador del estípite y cogollo de la planta y vector del nematodo causante del anillo rojo de hoja corta), se determinó que los machos de esta especie liberan una feromona de agregación constituida por el Rincoforol (6-metil-2-hepten-4-ol) que atrae individuos de ambos sexos; adicionalmente se ha establecido que en presencia de una mezcla fermentada de melaza, agua y caña de azúcar (que genera caïromonas como acetato de etilo) hay un incremento del poder atrayente. En el campo, se emplean trampas ubicadas en el suelo que contienen la feromona y material vegetal de la planta hospedera, con las que se ha logrado una captura masiva efectiva (**Figura 1.5 A**).⁷⁰ Por otro lado, se han adelantado estudios sobre el escarabajo *Strategus aloeus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Scarabaeidae) (barrenador del estípite y cogollo de la planta) y los resultados indican que los machos producen una feromona de agregación que se encuentra constituida por tres VOCs (2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol, acetato de sec-butilo y 4-metiloctanoato de etilo (58:24:8)) que en bioensayos de laboratorio mostraron potencial como atrayentes de individuos de ambos sexos (**Figura 1.5 B**).⁷¹

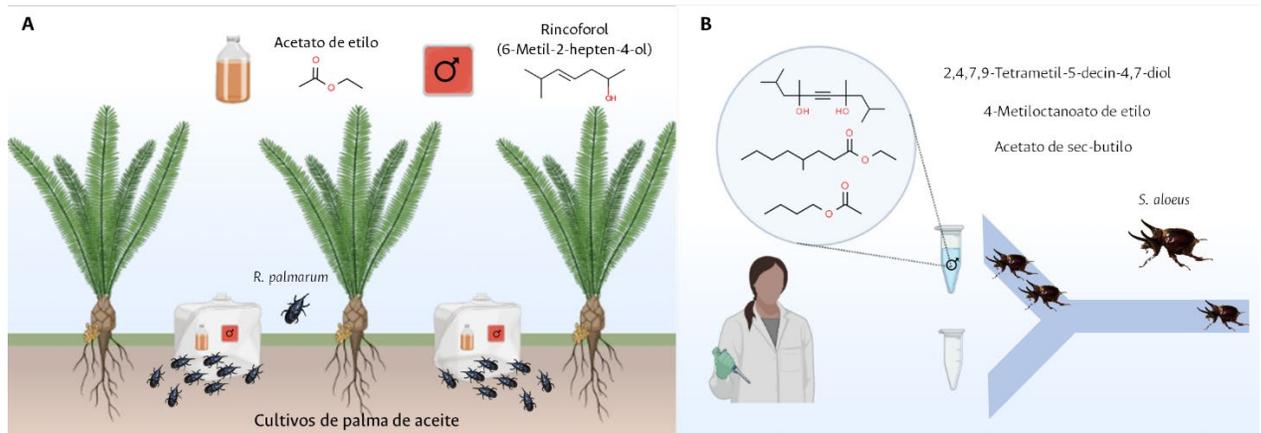


Figura 1.5. Uso de feromonas como estrategia de MIP en el cultivo de palma de aceite en Colombia **A.** Esquema del control etológico de *Rhynchophorus palmarum* con semioquímicos **B.** Esquema de la evaluación de los VOCs de la feromona de *Strategus aloeus* (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.2. Etapas involucradas en el estudio de feromonas

El estudio de feromonas es un proceso complejo, que en términos generales involucra cuatro etapas principales: **a)** evaluación del comportamiento del insecto, **b)** extracción, **c)** identificación y caracterización, y **d)** evaluación de la respuesta, las cuales se encuentran influenciadas por varios factores. En primer lugar, es necesario conocer el comportamiento de la especie de interés, para determinar quién es el emisor (hembras, machos o ambos) de la señal química, dónde se ubican las estructuras glandulares, en qué horario se da la liberación de los VOCs y si va acompañada de conductas

estereotipadas, particularmente en el proceso de cópula;^{72,73} esta información es de gran utilidad para establecer posteriormente las condiciones de extracción y evaluación de la feromona. Debido a que los insectos producen feromonas en cantidades sumamente bajas (ng-pg/min) y a la alta volatilidad de los mismos, es necesario seleccionar un método de extracción que logre capturar una cantidad suficiente de los compuestos para que estos puedan ser detectados a través de las técnicas instrumentales disponibles. A su vez, debe seleccionarse un método analítico que permita separar los constituyentes de la feromona y brinde información estructural de cada componente; en este sentido la cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) constituye una herramienta útil. En cuanto a la evaluación, debe seleccionarse un bioensayo que permita demostrar que los VOCs probados son bioactivos, es decir, que además de ser detectados, generan atracción intraespecífica de forma consistente y reproducible. Para ello se deben considerar las características bioecológicas del insecto, como su periodo de actividad, estado de apareamiento, entre otros.⁷⁴ A continuación, se presenta una breve revisión de los métodos empleados para la extracción e identificación de feromonas, así como de los bioensayos para su evaluación en lepidópteros.

1.2.1. Métodos de extracción

Para aislar las feromonas de los insectos puede emplearse la extracción directa de las glándulas con solventes, o la extracción *in-vivo* del espacio de cabeza (*head-space* en inglés), un método no destructivo que utiliza adsorbentes de amplio espectro y que presenta dos variantes, conocidas como *head-space* estático y *head-space* dinámico (Figura 1.6).



Figura 1.6. Esquema de los montajes para extracción de los VOCs liberados por insectos (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.2.1.1. Extracción cuticular asistida por solventes

Cuando el insecto a estudiar presenta glándulas visibles, es posible diseccionar estas estructuras y extraer la feromona empleando solventes orgánicos (normalmente hexano o diclorometano). En el caso de los lepidópteros, en las hembras se encuentran comúnmente como membranas modificadas entre los segmentos abdominales octavo y noveno; en los machos, se presentan glándulas androconiales que pueden encontrarse dispersas por alas, tórax, abdomen o patas, o concentrarse en manchas, estigmas e invaginaciones del anverso de las alas anteriores, a veces ocultas por otras escamas.¹⁰ La extracción directa permite aislar grandes cantidades de la

sustancias presentes en la glándula, sin embargo, es un método destructivo y no funciona para muchos tipos de insectos cuyo lugar de secreción glandular es de difícil acceso.⁷⁴

1.2.1.2. Head-space estático

En esta técnica el insecto o sus partes son encerradas en un recipiente, donde el aire que rodea la muestra permanece estático y los VOCs liberados se atrapan sobre un adsorbente específico. El proceso de adsorción se realiza empleando la microextracción de fase sólida (MEFS), que es un método rápido y simple para capturar VOCs en concentraciones en el rango de las ppb. La MEFS se basa en la adsorción de compuestos volátiles sobre una fibra inerte cubierta con diferentes tipos de adsorbentes y su posterior desorción al interior de un cromatógrafo de gases para su análisis. La fibra se aloja dentro de la aguja de una jeringa modificada, que se inserta a través de un sello al recipiente usado en la recolección de los VOCs, y luego es expuesta al espacio de cabeza. Después de alcanzar el tiempo de equilibrio entre el adsorbente y la muestra, la fibra es retraída dentro de la aguja y se transfiere al cromatógrafo de gases para ser directamente desorbida por efecto térmico. Esta desorción térmica elimina la necesidad de usar solventes que pueden contener impurezas, las cuales pueden llegar a interferir con el análisis de las muestras.⁷⁴ La elección de la fibra depende de la polaridad y volatilidad de los compuestos a analizar y su correcta selección es un aspecto determinante en la extracción de los VOCs (**Tabla 1.2**). Por su parte, la cantidad de compuesto adsorbido está relacionado con el espesor de la cubierta de la fibra y de la constante de reparto del analito, que generalmente se incrementa con su peso molecular y punto de ebullición. Para obtener resultados cuantitativos reproducibles, la fibra y la muestra deben alcanzar el equilibrio. El tiempo de equilibrio depende de la volatilidad y polaridad del analito, de las propiedades del adsorbente y de otros parámetros como la temperatura y la agitación (en muestras líquidas).⁷⁴

Este método resulta conveniente para capturar los VOCs que son emitidos en más bajas concentraciones ya que no existe un flujo continuo de aire que pueda enmascararlos. Sin embargo, presenta algunas desventajas, como la acumulación de humedad y calor en el espacio de cabeza, condiciones que pueden interferir con los procesos fisiológicos y afectar la emisión de los VOCs. Adicionalmente, la cantidad retenida en la fibra puede ser insuficiente para realizar la elucidación estructural de los compuestos desconocidos que se capturen debido a la saturación de la misma.⁷⁴

Tabla 1.2. Características de las fibras para extracción HS estático-MEFS. *

Tipo de analito	Fibra recomendada	Características de la fibra
Gases y compuestos de bajo peso molecular (PM 30 – 225)	30 µm CAR/PDMS – 50 µm DVB	Carboxen (CAR): tamiz molecular de carbono altamente poroso e hidrófobo.
VOCs (PM 60 – 275)	100 µm PDMS	Polidimetilsiloxano (PDMS): polímero lineal de dimetilsiloxano, inerte e hidrófobo.
VOCs en general, aminas y compuestos nitro-aromáticos (PM 50 – 300)	65 µm PDMS/DVB	Divinilbenceno (DVB): recubrimiento apolar de alta porosidad y sensibilidad.

VOCs polares (PM 80 – 300)	85 μ m Poliacrilato	Policrilato: polímero de acrilato de sodio que presenta alta capacidad de absorción de agua.
Compuestos no polares con alto peso molecular (PM 125 – 600)	7 μ m PDMS	
VOCs no polares (PM 80 – 500)	30 μ m PDMS	Carbowax: polímero lineal de etilenglicol con alta lubricidad e higroscopicidad.
Alcoholes y compuestos polares (PM 40 – 275)	60 μ m Carbowax	

*Tabla adaptada.⁷⁴

1.2.1.3. Head-space dinámico

En este método una corriente de aire continuo fluye a través de un recipiente que contiene el insecto y los VOCs son arrastrados para ser atrapados sobre adsorbentes a medida que el gas circula, esto permite aumentar la cantidad de VOCs atrapados para realizar su detección y posterior análisis instrumental. En este proceso, es importante garantizar una entrada de aire limpia para evitar la interferencia de sustancias no deseadas. El material adsorbente usualmente es empacado en tubos de vidrio o metal entre fibra de vidrio en capas de 2 – 50 mm. Durante la toma de muestra, el aire que contiene los VOCs pasa a través del adsorbente a una velocidad de flujo fija. Los compuestos atrapados pueden ser extraídos de la matriz adsorbente mediante el empleo de solventes puros o mezclas de solventes orgánicos de bajo punto de ebullición. Sí el material adsorbente presenta alta estabilidad térmica puede emplearse desorción térmica de VOCs, como una alternativa a la extracción con solventes. El principal problema que presentan los materiales adsorbentes es la adsorción incompleta de los VOCs, debido a que presentan afinidades muy específicas para algunos compuestos, por lo que, al recolectar mezclas complejas o desconocidas de VOCs puede requerirse el empleo de más de un tipo de adsorbente (Tabla 1.3). Esto puede lograrse mediante el uso de una adsorbente en multicapa, en el cual matrices con características diferentes de retención se colocan en serie.^{14,74}

Tabla 1.3. Características de los adsorbentes para extracción HE-dinámico. *

Material adsorbente	Características
Porapak Q	Copolímero de etilvinilbenceno-divinilbenceno EVB-DVB, alta área superficial, sensible a la luz
Hayesep D	Copolímero de divinilbenceno DVB, alta área superficial, relativamente inerte, hidrofóbico
Super Q	Polímero de acrilato de sodio, resistente al vapor de agua
Carbotrap	Carbón activado, buen adsorbente, estabilidad térmica
ORBO-32	Carbón activado, alta área superficial

*Tabla adaptada⁷⁴

Todos los métodos empleados para el análisis de feromonas buscan obtener un perfil fiel a la realidad de la mezcla de compuestos emitidos por el insecto de interés, para ello a menudo es necesario emplear más de una técnica de extracción y comparar los perfiles obtenidos con cada una de ellas, esto con el fin

de llegar a la correcta identificación de los constituyentes de la mezcla estudiada. Una vez las feromonas han sido extraídas, se debe hacer uso de diferentes técnicas de análisis instrumental para poder caracterizar e identificar sus componentes.

1.2.2. Caracterización e identificación de feromonas de insectos

La caracterización de las feromonas requiere que los compuestos individuales de la muestra aislada sean separados para su posterior identificación, para ello el análisis por cromatografía de gases resulta el más adecuado. Después de la separación en la columna de CG, los compuestos volátiles deben ser analizados usando diferentes detectores. El detector de ionización por llama (FID) es usado generalmente para el análisis cuantitativo, debido a su amplio rango lineal, estabilidad en la respuesta y alta sensibilidad con límites de detección del orden de pg a ng por compuesto. Sin embargo, el detector de EM es el más usado en el análisis de VOCs, ya que proporciona información estructural. Para realizar la identificación, los espectros de masas (obtenidos por ionización electrónica o ionización química) y los índices de retención deben ser determinados y comparados con los espectros de masas e índices de retención de compuestos de referencia o, si se utilizan los datos de la literatura, debe corroborarse que los mismos hayan sido determinados mediante el uso de patrones. Para determinar la configuración absoluta y la distribución enantiomérica de los compuestos quirales, los índices de retención de los correspondientes estereoisómeros deben ser determinados con el uso de sustancias de referencia, analizadas en columnas quirales. Si se detecta un compuesto nuevo, una propuesta de la estructura debe derivarse de toda la información obtenida por espectrometría de masas y luego confirmarse por análisis espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del compuesto sintético.^{74,44}

1.2.3. Evaluación de la respuesta de los insectos frente a las feromonas bajo condiciones de laboratorio

1.2.3.1. Percepción de compuestos orgánicos volátiles: el olfato en los insectos

A la hora de evaluar la respuesta de un organismo frente a estímulos de naturaleza química, es importante primero comprender cómo se da el proceso de detección. En el caso de los insectos, los VOCs son percibidos a través de las antenas, y en algunos casos los palpos maxilares. La superficie de estos órganos olfativos está cubierta por pelos sensoriales denominados sensilias, que de acuerdo a su morfología pueden ser basicónicas, celocónicas, aurículas y tricoideas; se ha reportado que las sensilias que responden a feromonas son de tipo tricoidea.¹⁴ Las sensilias son estructuras cuticulares porosas que albergan las dendritas de hasta cuatro neuronas sensoriales olfativas (OSN *olfactory sensory neuron*), que su vez, expresan un único tipo de receptor olfativo (OR *odorant receptor*) que es selectivo a un determinado perfil de VOCs (**Figura 1.7**). Por lo general, los OR tienen una topología de siete dominios transmembranales y forman heterodímeros con un correceptor llamado ORCo (*odorant receptor coreceptor*), y se cree que este dímero puede funcionar como un canal iónico regulado por ligandos.⁷⁵ Adicionalmente, se ha encontrado que para una misma especie se expresan diferentes subconjuntos de OR según el sexo o la etapa de la vida, con el fin de adaptarse a las necesidades ecológicas de los individuos.⁷⁶

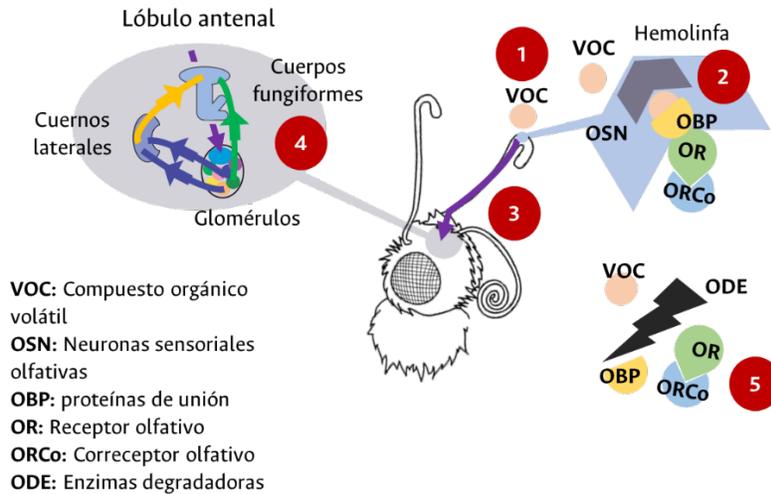


Figura 1.7. Esquema del proceso olfativo de los insectos (1. Un VOC llega a las sensilas en la antena del insecto. 2. En las OSN, las OBP transportan el VOC a través de la hemolinfa hasta el complejo OR-ORCo 3. Activación del OSN y transmisión del impulso nervioso hasta los glomérulos del lóbulo antenal 4. Envío de las señales desde el lóbulo antenal a los cuerpos laterales y fungiformes 5. Liberación del VOC por acción de las ODE) (Figura adaptada,^{14,66} creada con BioRender).

Las OSN se encuentran rodeadas por linfa sensiliar acuosa, que debe ser atravesada por los VOCs, que generalmente son de carácter hidrofóbico. Para ello existen proteínas de unión de olores (OBP *odorant-binding protein*), que permiten la solubilización de los compuestos.⁷⁵ Una vez se activan las OSN, el impulso nervioso se transmite a través del nervio antenal hasta el primer centro de procesamiento neural olfativo, conocido como el lóbulo antenal. Este lóbulo, corresponde a una región del cerebro de los insectos dedicada exclusivamente a la recopilación e integración de la información química; además, está compuesto por un número determinado de estructuras globulares llamadas glomérulos. Cada glomérulo recibe los axones de todas las OSN que expresan el mismo tipo de receptor, de forma que reúne la información de todas las neuronas que perciben los mismos compuestos.⁶⁶

Los glomérulos están interconectados con interneuronas laterales inhibitorias y acoples eléctricos excitatorios; estas conexiones permiten que el lóbulo antenal reciba la información de compuestos individuales y la transmita como olores integrados a los centros cerebrales superiores. Los compuestos que tienen una importancia ecológica particular como las feromonas, suelen tener receptores muy específicos y glomérulos especializados denominados “macroglomerulos”, que han sido estudiados principalmente en lepidópteros. En los casos en los que las feromonas tienen más de un componente, el conjunto de los macroglomerulos se denomina “complejo macroglomerular”.⁷⁷ Posteriormente, las señales son enviadas a los cuerpos fungiformes y los cuernos laterales del cerebro desde el lóbulo antenal, mediante neuronas de proyección. Algunos estudios indican que los cuerpos fungiformes están involucrados en la memoria y la plasticidad comportamental, mientras que los cuernos laterales están involucrados principalmente en los olores responsables del comportamiento innato, como la detección de plantas hospederas y de feromonas; adicionalmente se ha encontrado que

estos centros cognitivos también están interconectados, y tanto la experiencia como el estado fisiológico pueden modular el comportamiento sexual.^{14,78}

Una vez se ha activado el receptor, el compuesto debe ser liberado para que la sensibilidad de la OSN no se vea afectada y para que el sistema olfativo no se sature. Este proceso se lleva a cabo mediante la función de las enzimas degradadoras de odorantes (ODE *odorant-degrading enzyme*), que regulan la reactivación de los OR y la modulación de la selectividad de los mismos al reducir interferencias, eliminando ciertos compuestos de la linfa.⁶⁶

1.2.3.2. Respuesta electrofisiológica

Para determinar cuáles de los compuestos extraídos e identificados son detectados por el insecto, se evalúa su respuesta electrofisiológica a través de la electroantenografía (EAG). Esta técnica permite establecer mediante una señal eléctrica cuando un VOC o mezcla de VOCs, son detectados por el insecto. La EAG registra los cambios de potencial, entre las secciones distal y proximal del flagelo antenal, causados por la superposición de simultáneas despolarizaciones de membrana de numerosas OSN, considerando que el potencial resultante es la suma de la respuesta de varias OSN que se encuentran en serie.^{79,80} Cuando la antena es estimulada con compuestos aislados, la amplitud de la señal correlaciona con la concentración de la sustancia aplicada (**Figura 1.8**). La alta sensibilidad y selectividad de los receptores olfativos del insecto permiten instrumentalizar la detección electroantenográfica que, en conjunto con una separación por CG, constituyen una técnica analítica muy valiosa. Frecuentemente la detección EAG es usada en paralelo a un detector FID como una técnica acoplada (CG-FID/EAG). Cuando se analizan muestras de composición desconocida, adicionalmente al sistema se acopla a un espectrómetro de masas, obteniendo no solo información estructural de cada VOC separado sino además, de la percepción de insecto.⁸¹ La mayor parte de las referencias sobre el uso de la técnica EAG están relacionadas con lepidópteros, ya que han sido aplicadas principalmente al estudio de feromonas sexuales.¹⁴

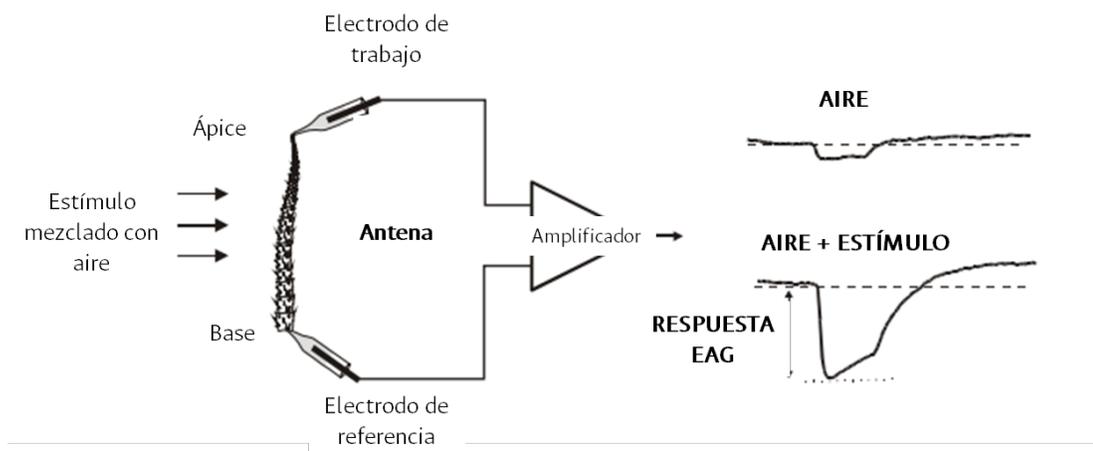


Figura 1.8. Esquema del principio de registro de electroantenografía (Figura adaptada,⁷⁹ modificada con BioRender).

Además de la EAG, se puede emplear el registro de una sola sensilia (SSR *Single Sensillum Recording*), donde los potenciales de acción generados por las OSN pueden medirse mediante un electrodo en contacto con la linfa del receptor extracelular. Las OSN individuales a menudo se pueden separar por la amplitud del potencial de acción, que se cree que es el resultado del diámetro de la célula nerviosa que genera la señal. De esta manera, se puede obtener una evaluación detallada de la sensibilidad y selectividad de las OSN individualmente. Como las OSN que expresan el mismo tipo de receptor convergen en la misma región del cerebro del insecto, la electrofisiología de una sola sensilia puede ser una técnica muy eficaz para mapear el rango receptivo de las OBP expresadas dentro de las OSN.⁸²

1.2.3.3. Respuesta comportamental

Para evaluar la capacidad de percepción y respuesta de insectos frente a los VOCs previamente identificados, en condiciones de laboratorio se emplean olfatómetros o túneles de viento. Se diferencian dos tipos generales de diseño: los de flujo de aire y los de aire estático. Los primeros se usan en estudios encaminados a la detección y medición de respuestas de atracción de insectos a señales olfativas emitidas en distancias largas y medianas, mientras los de aire estático se usan para medir respuestas quimiotáctiles u olfativas a cortas distancias o en situaciones en donde las señales químicas se difunden en el espacio sin necesidad de ser transportadas por una corriente forzada de aire. Los modelos con flujo de aire requieren de un sistema que permita la circulación continua de aire dentro del dispositivo y su diseño está relacionado con las características de movilidad del insecto. Para lepidópteros (insectos voladores) se emplea generalmente el diseño de túnel de viento con flujo de aire, que consiste en una cámara alargada con la fuente de olor en uno de los extremos y una corriente de aire que pasa por ésta y se dirige hacia el otro extremo, en donde se ubican los insectos (**Figura 1.9**).⁷⁴

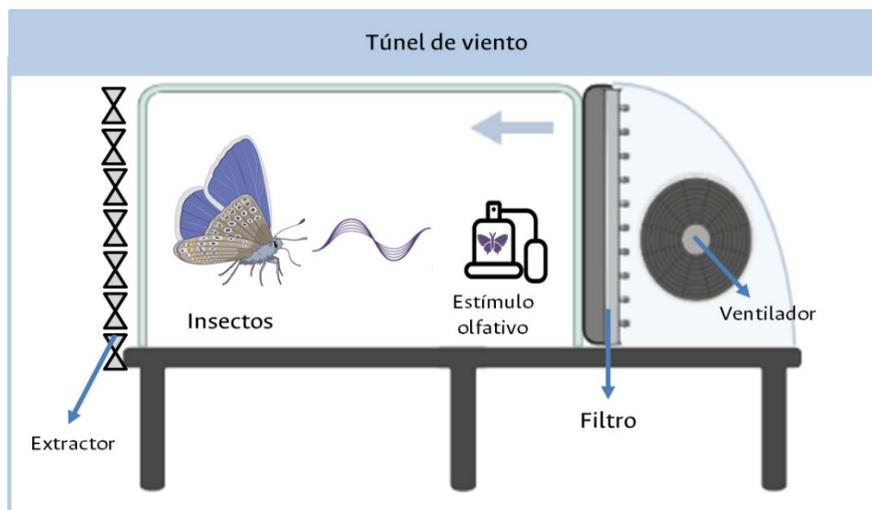


Figura 1.9. Esquema del montaje para la evaluación de feromonas para lepidópteros bajo condiciones de laboratorio (Figura adaptada,¹⁴ creada con BioRender).

1.3. El cultivo de palma de aceite

1.3.1. Generalidades

La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq. 1897, *E. oleifera* Kunth 1897 e híbridos interespecíficos OxG) es una planta monocotiledónea tropical perenne perteneciente al orden Arecales, familia Arecaceae, que se cultiva en las regiones tropicales de América, África, Asia y Oceanía (**Figura 1.10**).^{1,2,3} Estas especies se caracterizan por presentar un único tallo leñoso sin crecimiento secundario; un solo meristemo de tallo apical produce nuevos fitómeros en sucesión regular que constan de un entrenudo, una hoja y una inflorescencia masculina o femenina en su axila.⁸³ La duración del desarrollo de un fitómero, que comienza con la iniciación de la hoja y termina con la madurez de su inflorescencia femenina axilar, es de alrededor de 3 a 4 años; posteriormente el crecimiento y desarrollo vegetativo son continuos y constantes en condiciones favorables, a pesar de las variaciones estacionales del crecimiento reproductivo.⁸⁴ Las fechas de floración y madurez, asociadas con el crecimiento y desarrollo de los racimos del fruto, muestran un marcado ritmo anual, permitiendo la realización de rondas de cosecha cada 7 a 15 días; esta periodicidad está asociada con la edad de la planta, y a su vez dependerá del potencial genético de la variedad vegetal, las condiciones ambientales y las características fenológicas, así como de las prácticas agronómicas y de manejo integrado del cultivo.^{85,86,87,88} El fruto resultante es una drupa sésil con una forma esférica, ovoide o alargada; el pericarpio está formado por el exocarpio, mesocarpio y endocarpio, el último de los cuales rodea a la almendra.⁸⁹ La madurez comercial para realizar la cosecha del racimo se da cuando se presenta la máxima cantidad posible de aceite en sus frutos, y se determina considerando principalmente el color del exocarpio.⁹⁰ Una palma de aceite se puede cultivar económicamente durante 20 a 25 años, ya que luego de este periodo la planta alcanza una altura que la hace difícil de cosechar, adicionalmente, la cantidad de racimos de fruta es muy limitada, por lo que ya no es rentable su mantenimiento más allá de esa edad.⁸⁸



Figura 1.10. Cultivo de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) en el municipio de Tumaco, Nariño, Colombia. Foto: J. Pastrana.

La cadena productiva de esta oleaginosa la conforman tres eslabones: cultivo, extracción y refinación; dónde los productos resultantes de mayor interés comercial son el aceite de mesocarpio, el aceite de almendra y la torta de palmiste, todos obtenidos del racimo de la fruta.^{1,91} El aceite del mesocarpio es el más consumido en el mundo (35 % del consumo total de aceites vegetales) y se caracteriza por un alto contenido de ácidos grasos saturados (mirístico, palmítico y esteárico), antioxidantes (ácidos fenólicos y flavonoides) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles).⁹² Además del uso en la industria de alimentos, la versatilidad de la palma de aceite permite su aprovechamiento en el sector farmacéutico, cosmético, oleoquímico, de energías renovables y de productos derivados de la biomasa.⁹³

La producción mundial de aceite de palma para el año 2021 fue de 76,0 millones de toneladas y se estima que para el periodo 2022/2023 alcanzaría los 79,2 millones de toneladas; Colombia con una participación del 2,4 %, estimada en 7,7 billones de pesos, continúa siendo el cuarto productor a nivel mundial, luego de Indonesia (61,2 %), Malasia (26,1 %) y Tailandia (4,3 %).⁹⁴ En el país, las plantaciones de palma se encuentran distribuidas en cuatro zonas: Norte (Norte del Cesar, Atlántico, Guajira, Norte de Bolívar, Córdoba, Urabá Antioqueño y Sucre), Central (Santander, Norte de Santander, Sur del César, Sur de Bolívar), Oriental (Meta, Cundinamarca, Casanare, Caquetá) y Sur Occidental (Nariño, Cauca, Caquetá), que abarcan 162 municipios en 21 departamentos.⁹⁵ En el periodo 2019–2022, la distribución de la producción de aceite por zonas ha sido del 45,6 % en la región Oriental, 33,1 % en la región Central, 18,2 % en la región Norte y 3,1 % en la región Suroccidental (**Figura 1.2**);⁹⁶ las cifras de las zonas Oriental y Central se deben a que los departamentos de Meta, Casanare, Santander y Norte de Santander cuentan con las mayores superficies de tierra cultivada con palma de aceite y además, se caracterizan por presentar muy buenos rendimientos por hectárea (2,8 – 4,4 toneladas de aceite de palma crudo por hectárea).⁹⁷ El sector palmicultor en Colombia funciona a través de 70 asociaciones de plantas extractoras de aceite con las plantaciones que les proveen el fruto, conocidas como núcleos palmeros, que actualmente, reúnen a más de 6.700 productores en 595.722 hectáreas sembradas y han permitido la generación de 197.000 puestos de trabajo directo e indirecto; mostrando que el sector palmicultor es prioritario para la economía nacional, por su aporte a nivel de empleo y divisas, así como por la generación e impulso de nuevas empresas.^{91,97,98}

Aunque el cultivo de palma de aceite constituye un eje estratégico de desarrollo a nivel agroindustrial gracias a su alta productividad, alcanzando picos de rendimiento de 12 t aceite/ha/año en pequeñas plantaciones y un máximo rendimiento teórico de 18,5 t aceite/ha/año;⁹⁹ factores como la edad de las plantaciones, áreas muy extensas dedicadas al monocultivo, zonas con vegetación y suelos inadecuados, entre otras condiciones ecológicas de las diferentes zonas y subzonas palmeras, aumentan la susceptibilidad del cultivo a múltiples problemas fitosanitarios que disminuyen significativamente su productividad promedio, que se ha estancado en aproximadamente 3 t aceite/ha/año.^{100,101,102} Para abordar esta situación la mayoría de países productores en Asia y África optaron por aumentar las áreas sembradas, sin embargo, considerando que la expansión del cultivo conllevó al desplazamiento de bosques tropicales de gran biodiversidad, desviación de fuentes hídricas y a condiciones laborales indignas, las alternativas más convenientes para satisfacer la demanda global de productos derivados de la palma de aceite, de acuerdo con la organización *Mesa Redonda sobre Aceite de Palma Sostenible (RSPO)*, están relacionadas con la obtención de mayores cifras de rendimiento.⁹⁹ Entre ellas, se encuentra la reducción de la incidencia de plagas y enfermedades con el desarrollo de mejores programas de manejo

integrado con un impacto favorable a nivel ambiental, así como un crecimiento regulado del área de siembra hacia zonas previamente degradadas o intervenidas.¹⁰³

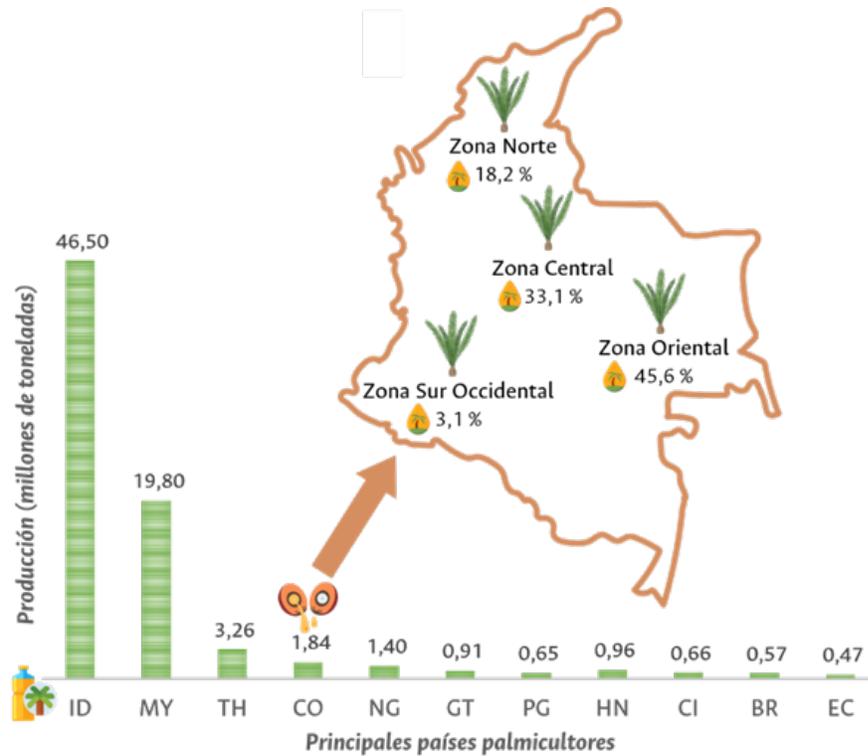


Figura 1.11. Distribución y participación en la producción de aceite de las cuatro zonas palmeras en Colombia en el periodo 2019 – 2022 (ID: Indonesia, MY: Malasia, TH: Tailandia, CO: Colombia, NG: Nigeria, GT: Guatemala, PG: Papúa Nueva Guinea, HN: Honduras, CI: Costa de Marfil, BR: Brasil, EC: Ecuador) (Figura adaptada,^{88,96} creada con BioRender).

A continuación, se exponen algunas generalidades de las enfermedades y plagas más comunes en el cultivo de palma de aceite en Colombia, así como de su manejo fitosanitario.

1.3.2. Incidencia y manejo de plagas en el cultivo de palma de aceite en Colombia

Entre las principales enfermedades que afectan a la palma de aceite se encuentran la pudrición del cogollo causada por el hongo *Phytophthora palmivora*, el anillo rojo causado por el nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, la marchitez sorpresiva causada por el tripanosomátido *Phytomonas staheli* y la marchitez letal causada por un agente de etiología desconocida. Por su parte, el ataque de artrópodos-plaga es más amplio y variado, incluyendo presencia de ácaros, hemípteros, coleópteros, himenópteros y lepidópteros, que actúan como vectores, raspadores de frutos, barrenadores de raíces, racimos y estípite, picadores-chupadores o defoliadores.¹⁰⁴

En el país, el Instituto Colombiano Agropecuario ICA en asociación con la Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite (Fedepalma) y la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma), se encarga de desarrollar estrategias que permiten identificar, implementar y verificar las medidas necesarias para contar con un sistema de regulación fitosanitario efectivo. Según la

normativa vigente (Resolución ICA No. 092771 de 2021), las enfermedades y plagas de la palma de aceite de control oficial en el territorio nacional son: marchitez letal, anillo rojo, marchitez sorpresiva, pudrición del cogollo y los insectos *Strategus aloeus* y *Rhynchophorus palmarum*. El manejo de estos organismos se ha estudiado arduamente logrando establecer algunas estrategias que permiten mantener el daño dentro de un nivel aceptable, que incluyen en general, censos fitosanitarios periódicos, eliminación de focos de propagación y sitios de reproducción, así como de tejidos y plantas infectadas; igualmente se incluyen prácticas de control cultural, biológico y etológico. Cuando se presenta afectación severa se realiza control químico con aplicación de plaguicidas autorizados por el ICA.¹⁰⁵

Actualmente, otro problema fitosanitario que preocupa al sector palmicultor es el ataque de insectos-plaga defoliadores, debido al impacto negativo que generan en el rendimiento y a la falta de estrategias para un manejo integrado efectivo. El crecimiento de la palma de aceite depende, fundamentalmente, del desarrollo progresivo de su área foliar y la calidad de la misma es una condición determinante en la eficacia fotosintética de la planta y, por tanto, en la productividad del cultivo.⁵ La calidad está dada por un número adecuado de hojas y por su estado de sanidad; mientras el número está relacionado con la edad de las palmas, el grado de sanidad depende del daño causado por insectos-plaga y/o enfermedades.¹⁰⁶ Cualquier tipo de daño al follaje es considerado como pérdida. En condiciones normales una palma tolera niveles de defoliación cercanos al 15 % sin afectar los rendimientos. No obstante, cuando la defoliación es mayor se provoca un estrés a la palma y el efecto inmediato es la reducción del peso promedio de racimos y, dos a tres años más tarde, la disminución del número de racimos. Si la defoliación se presenta en hojas nuevas, el impacto será aún mayor.⁶ La pérdida continua del número de hojas puede reducir entre 5 y 30 t/ha/año de fruto fresco en un periodo que puede variar de 2 a 4 años, además si la defoliación ocurre en el nivel superior del dosel de la palma, esta puede tardar entre uno y dos años para recuperar totalmente su follaje.¹⁰⁷ Debido a esto, es necesario trabajar en la implementación de programas de manejo integrado para este tipo de plaga.

Numerosas especies de lepidópteros de las familias Limacodidae, Megalopygidae, Dalceridae, Stenomidae, Glyphipterigidae, Psychidae, Castniidae, Saturnidae y Nymphalidae han sido descritas como plagas defoliadoras de la palma de aceite; entre las que presentan mayor impacto en cultivos de Centro y Sur América se encuentran las mariposas pertenecientes al género *Opsiphanes* (Nymphalidae).¹⁰⁸ La especie *O. cassina*, se ha registrado en Colombia, Brasil, Ecuador, Guatemala y Paraguay.¹⁰⁹ En Colombia, se encuentra distribuida en las 4 zonas palmeras, con mayor incidencia en el sur del Cesar y en algunas regiones del Meta y Nariño, donde el consumo foliar puede alcanzar el 90 % en las áreas afectadas, por lo que se ha convertido en una plaga de monitoreo permanente.¹¹⁰

Para comprender un poco más el efecto de *O. cassina* en el cultivo de palma de aceite, en la próxima sección se describe la biología, la ecología, el comportamiento y formas de manejo actual de este insecto-plaga.

1.4. El insecto-plaga defoliador *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae)

1.4.1. Biología, ecología y comportamiento

La hembra adulta de *Opsiphanes cassina* oviposita en el envés de los folíolos cerca al raquis de la hoja. Los huevos colocados son esféricos y globosos, presentan corión con superficie estriada longitudinalmente, son de color crema con tres manchas concéntricas de color café y alcanzan hasta 2 mm de diámetro. En huevos próximos a eclosionar, se forman bandas transversales color marrón, correspondientes a la formación larval en su interior. Dependiendo de las condiciones ambientales, la duración de la fase de huevo varía entre 8 y 10 días. Las larvas recién nacidas se distribuyen en todos los niveles de las hojas, principalmente en el tercio medio y superior de la palma, ubicándose en el envés de los folíolos a lo largo de la nervadura central o paralelo a ésta. Las larvas son de gran tamaño y de tipo eruciforme; al emerger miden alrededor de 7 mm y crecen hasta 80 mm de longitud cuando ingresan a la etapa de prepupa. Inicialmente son de color rosa, con cinco bandas longitudinales amarillas, la cápsula cefálica es hirsuta y negra. Con el tiempo se tornan de color verde con bandas amarillas (un par en las pleuras y otro en el dorso que se prolonga en la cápsula cefálica); la cabeza y la parte caudal del cuerpo tienen apéndices en forma de cuernos. Se presentan 5 instares larvales, que se completan entre 40 y 45 días. Las pupas son de tipo obrecta (apéndices fuertemente adheridos al cuerpo) y se forman preferiblemente sobre las plantas epifitas que crecen en el estípite de la palma, en el envés de los folíolos y bases peciolares o en las malezas; se adhiere a estos sustratos por el cremaster o sección espinosa del extremo final del cuerpo. Recién formada es de color verde claro y a medida que avanza su desarrollo se torna café claro; esta etapa dura entre 10 y 15 días (Figura 1.12).^{3,4,108}

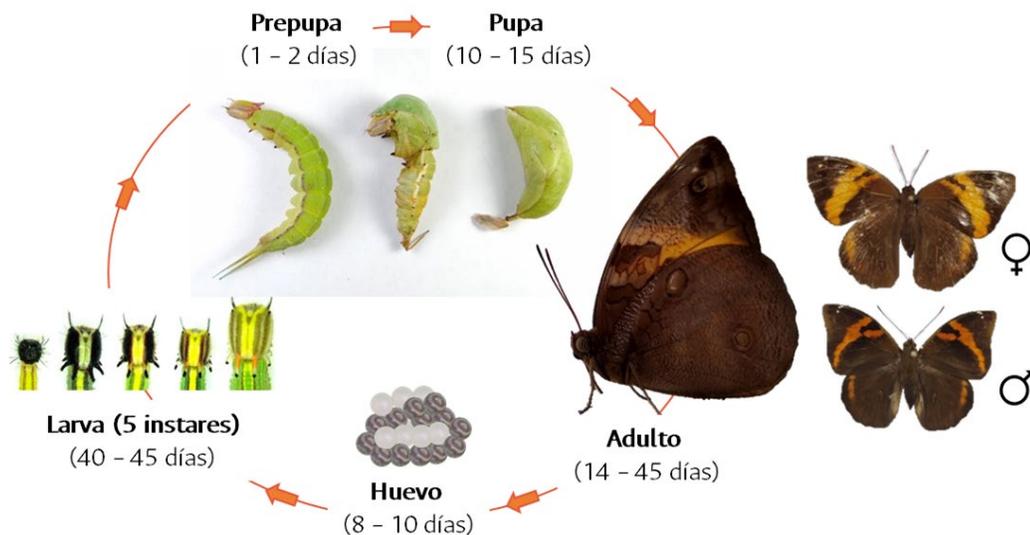


Figura 1.12. Ciclo de vida de *Opsiphanes cassina* [♀(hembra) ♂(macho)] (Elaboración propia, creada con BioRender. Fotos: J. Pastrana – J. Bustos).

Los adultos de *O. cassina* son frugívoros, de hábito diurno, vuelo eficiente y dimorfismo sexual marcado. Son mariposas de color pardo con una envergadura alar de 60 a 65 mm en el macho y de 70 a 75 mm en la hembra; ambos presentan bandas transversales de color naranja, formando una Y en las alas anteriores. En el lado ventral de las alas presentan manchas circulares (ocelo): una en el ala anterior (negra con halo amarillo) y dos en las alas posteriores (una marrón con halo negro y otra blanca con dos anillos; uno negro y otro blanco). Los machos presentan dos penachos a manera de pincel en las alas posteriores, que se han descrito como un mecanismo para la liberación de feromonas. El adulto puede tener una longevidad de 18 a 45 días, siendo las hembras menos longevas.^{4,108}

El daño causado por *O. cassina* en la palma de aceite es provocado por las larvas, que pueden alcanzar un consumo foliar de 300 cm²/individuo.⁴ Las larvas son de hábito solitario; inicialmente el consumo es bajo y se alimentan de los bordes de los folíolos, pero al llegar al cuarto instar, la larva elige un prospecto y se alimenta moviendo su cabeza hacia adelante y hacia atrás. Este comportamiento hace un corte inclinado en un lado de la vena central del folíolo y luego las larvas cambian de posición para iniciar un corte similar en el otro lado de la vena, que finalmente deja un característico corte en forma de flecha (**Figura 1.13**). Las larvas se alimentan durante la mayor parte del día, excepto cuando las temperaturas son demasiado altas; adicionalmente, dejan de alimentarse aproximadamente un día antes y medio después de la muda. Los adultos se sienten atraídos por fluidos de frutos maduros de donde obtienen carbohidratos y proteínas, que les aportan los nutrientes necesarios para volar y alcanzar la madurez sexual.⁴



Figura 1.13. Cultivo de palma (híbrido interespecífico OxG) defoliado por *Opsiaphanes cassina*. Foto: J. Pastrana.

En un estudio realizado en la costa del Pacífico Sur de Costa Rica se identificó que los adultos emergen de manera consecutiva durante un período de 2 a 3 meses; primero (10-15 días) predominan los machos, luego aparecen las hembras para finalmente alcanzar una proporción de sexos cercana a 1:1. Igualmente, se indica que el aumento de la población de adultos en los cultivos de palma de aceite, comienza a partir de individuos aislados que migran desde la vegetación natural circundante en áreas abiertas, donde se forman túneles de viento que favorecen la diseminación de semioquímicos que agregan más individuos a la población. También se indica que los adultos muestran dos picos de actividad: uno durante las

primeras horas de la mañana (6:00 – 8:00 h) y el principal en las últimas horas de la tarde (15:30 – 17:30 h); las hembras pueden aparearse desde el segundo día después de emerger de la pupa y realizan la oviposición al final de la tarde.³ Hasta donde se conoce, en Colombia no se han realizado estudios de comportamiento para esta especie. A continuación, se mencionan las generalidades de las estrategias empleadas actualmente para el manejo de este insecto-plaga.

1.4.2. Manejo de *Opsiphanes cassina* en el cultivo de palma de aceite

Para el manejo de *O. cassina*, en Centro y Sur América se han probado varios métodos. En primer lugar, se encuentra el control cultural con la colecta manual de pupas y larvas del V instar, que son depositadas en concavidades del suelo del cultivo y cubiertas con una malla metálica que permita la salida de los parasitoides, pero retenga los adultos. Como control etológico, se realizan capturas de adultos a través de trampas cebadas con material orgánico en fermentación, con mezcla ocasional de insecticidas. El control biológico es mayoritariamente conservativo, manteniendo plantas nectaríferas, que promueven el desarrollo de enemigos naturales como himenópteros parasíticos que atacan huevos (*Telenomus* sp., *Anastatus* sp.), larvas (*Cotesia* sp.) y pupas (*Conura maculata* Fabricius, 1787, *Conura* sp. y *Brachymeria* sp.). Igualmente, se han identificado como depredadores especies de hemípteros como *Alcaeorrhynchus grandis* Dallas, 1851 (Pentatomidae), *Podisus* sp. y tres especies del orden Araneae regulando poblaciones de larvas, pupas y adultos.⁷ Por otro lado, en ocasiones se realizan aspersiones con formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*. Finalmente, cuando las poblaciones de adultos y larvas son muy altas, se emplea el control químico con aplicación de benzoilureas (inhibidores de síntesis de quitina) como triflumurón y diflubenzurón por aspersión; o aplicación de organofosforados (inhibidores de acetilcolinesterasa) como malatión, por inyección por el estipe y absorción radical.⁷ Estas prácticas de control cultural, biológico y químico no han permitido lograr un manejo integrado de *O. cassina* que resulte eficiente y se requiere de la implementación de estrategias que permitan mantener el daño causado al cultivo dentro de un nivel aceptable, sin generar efectos negativos sobre el medio ambiente o la salud de los trabajadores.

En este sentido, al considerar las características bioecológicas de *O. cassina* en el cultivo de palma de aceite, se encuentra que uno de los puntos clave para su manejo integrado es el monitoreo y control de las poblaciones de adultos.¹¹ De acuerdo con lo expuesto anteriormente, entre las estrategias que fomentan los mecanismos naturales de control de adultos de lepidópteros y generan la menor alteración de los ecosistemas agrícolas, se encuentra la modificación del comportamiento en respuesta al uso de estímulos de naturaleza química, debido a que el proceso de localización de parejas se encuentra fuertemente regulado por la emisión y recepción de señales químicas.¹⁴ Además, el uso de feromonas presenta gran potencial para el manejo de la especie *O. cassina*, no solo por la efectividad que ha evidenciado en el control de poblaciones de lepidópteros-plaga sino porque es una estrategia que ha mostrado resultados exitosos y compatibilidad con las estrategias de MIP en el cultivo de palma de aceite.

A continuación, se describen las generalidades del comportamiento sexual en mariposas e igualmente se presentan las características estructurales de los componentes de feromonas reportadas para lepidópteros. Esta información en conjunto resulta valiosa pues permite seleccionar adecuadamente las condiciones de extracción de los VOCs liberados por los adultos, así como su posterior evaluación.

1.4.3. Comportamiento sexual en mariposas

En el orden Lepidoptera, las polillas y las mariposas han estado sujetas a diferentes presiones evolutivas que han generado diferencias no solo en sus características morfológicas, sino en su comportamiento, especialmente en la reproducción sexual.^{112,113} El cambio de hábito nocturno a diurno y la correspondiente dependencia creciente de la comunicación visual para la búsqueda de alimento y pareja, han llevado a la suposición generalizada de que las mariposas han experimentado un cambio significativo en sus conductas mediadas por señales químicas.¹⁸ De hecho, la mayoría de mariposas hembra no producen feromonas de larga distancia, de las que dependen casi exclusivamente las polillas, sino que la búsqueda de pareja se realiza típicamente esperando y/o vigilando a los machos, los cuales realizan conductas estereotipadas de llamado mientras producen feromonas sexuales que están involucradas en exhibiciones de cortejo a corta distancia que complementan los patrones visuales en muchas especies de mariposas, y que pueden desempeñar un papel decisivo en el reconocimiento de especies y la elección de pareja por parte de las hembras.^{114,115} Adicionalmente, los machos han desarrollado diversas estructuras liberadoras de VOCs que se pueden encontrar en prácticamente cualquier parte del cuerpo; por ejemplo, en placas abdominales, o en androconias presentes en alas y/o penachos.¹¹⁶

Para las mariposas, el proceso de encontrar, reconocer y atraer a una pareja implica una combinación de señales químicas y visuales, donde los machos utilizan básicamente dos estrategias para buscar hembras, posarse *perching* y/o patrullar *patrolling*, y posteriormente son ellas las que deciden si ocurre o no la cópula.^{117,118} Los machos que realizan *perching* permanecen posados mientras que esperan a las hembras y generalmente son territoriales, fieles a los sitios donde se posan y dispuestos a expulsar a otros machos mediante interacciones aéreas sin contacto; los dos machos que luchan por un territorio, dan vueltas o flotan cerca uno del otro durante un período de tiempo antes de que uno de ellos se aleje volando del sitio. Por su parte, los machos que realizan *patrolling* no esperan, sino que vuelan realizando una búsqueda más activa de hembras.¹¹⁷ Posarse y esperar tiene sentido en situaciones en las que el hábitat proporciona recursos, como plantas hospederas (para oviposición o alimentación de estadios inmaduros), fuentes de néctar o lugares para tomar el sol, que atraen a las hembras. Así mismo, posarse en un punto de vista estratégico, le permite al macho inspeccionar un sitio a través del cual las hembras transitan previsiblemente y localizar parejas candidatas de manera más eficiente. Por el contrario, cuando las características y los recursos de interés y atracción para las hembras están ampliamente dispersos por todo el hábitat, o aparecen de manera impredecible, tiene más sentido que los machos vayan en busca de hembras patrullando activamente el entorno (**Figura 1.14**).^{117,119} Estas dos estrategias pueden no ser mutuamente excluyentes y algunas especies pueden realizar ambas, dependiendo generalmente de la densidad de hembras receptivas en el hábitat; las densidades bajas favorecen el *perching* y las densidades altas fomentan el *patrolling*. Después de detectar a la hembra, tanto los machos *perching* como los *patrolling*, la persiguen de cerca, evaluando su tamaño, forma y patrón de alas para asegurarse de que sea adecuada para el apareamiento. En este rango cercano, los machos realizan diferentes conductas de cortejo mientras liberan la feromona sexual induciendo a las hembras a realizar la cópula.¹²⁰ Además de las dos estrategias previamente descritas, se ha reportado para algunas especies de mariposas, que los machos se reúnen en grupo (*lek*), generalmente cerca de los lugares más altos de sus hábitats y realizan dentro del *lek* la liberación de la feromona atrayendo a las hembras para participar en comportamientos de cortejo y posteriormente aparearse (**Figura 1.14**).^{119,121}

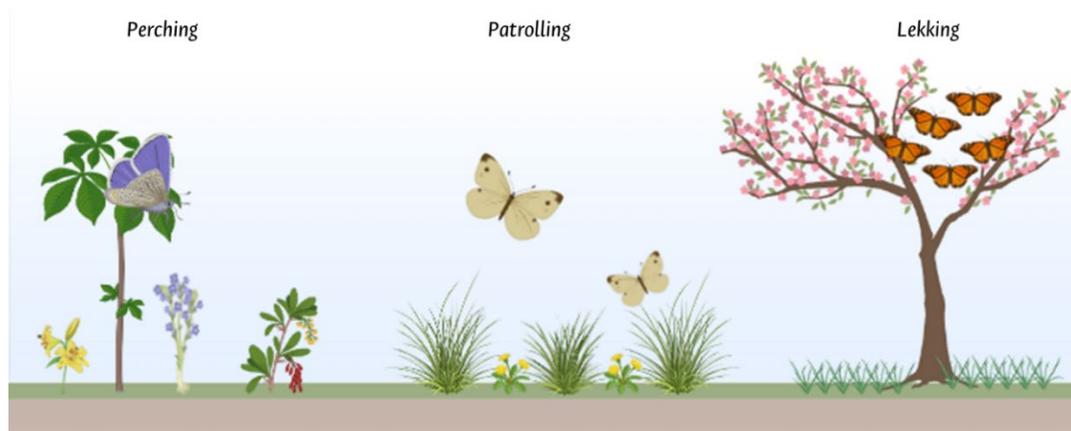


Figura 1.14. Esquema de las estrategias de búsqueda de pareja en machos de mariposas (Elaboración propia, creado con BioRender).

1.4.4. Características estructurales de VOCs reportados para lepidópteros

Las feromonas sexuales producidas por lepidópteros, que en su mayoría corresponden a polillas, han sido clasificadas en dos grupos principales. Las feromonas de tipo I, están compuestas por alcoholes primarios y sus derivados (principalmente acetatos y aldehídos) con una cadena lineal larga (C_{10} - C_{18}).¹⁰ Los compuestos de este grupo, constituyen el 75 % de las feromonas conocidas de lepidópteros. Este tipo de feromonas se produce por biosíntesis de ácidos grasos saturados a partir de acetil CoA, seguida de modificación de cadena mediante desaturación, β -oxidación citosólica (acortamiento de cadena) o alargamiento de cadena, y finalmente producción del grupo terminal por acción de oxidasas, reductasas y/o acetiltransferasas. Cada una de estas enzimas es clave para producir la mezcla de feromonas específica de compuestos utilizados por cada especie. La biosíntesis probablemente ocurre total o principalmente dentro de las células epidérmicas de la glándula, aunque se ha sugerido que el paso de oxidación final en la producción de aldehídos podría ocurrir en la cutícula.^{122,123,124} Por otro lado, en las feromonas de tipo II, se encuentran los hidrocarburos poliinsaturados y sus derivados epoxy con una cadena lineal más larga (C_{17} - C_{23} y, excepcionalmente, C_{25} - C_{27}). El sitio de síntesis de las feromonas sexuales derivadas de hidrocarburos involucra a otro grupo de células llamadas oenocitos que generalmente se asocian con células epidérmicas en todo el abdomen. Una vez que se producen los hidrocarburos, la lipoforina los transporta a través de la hemolinfa hasta las glándulas sexuales.⁸¹ La mayoría de estos hidrocarburos poliinsaturados presentan los dobles enlaces en las posiciones 3-6-9 o 6-9, lo que indica que se derivan del ácido linolénico o linoleico, respectivamente. Los lepidópteros no pueden biosintetizar los ácidos linolénico y linoleico, por lo que deben obtenerse de la dieta. En cuanto a los monoepóxidos de los hidrocarburos poliénicos, estos suelen presentar los dobles enlaces y el grupo epoxy en las posiciones 3-6-9 o 6-9, lo que indica de nuevo que están biosintetizados a partir de ácidos linolénico o linoleico, respectivamente. Aunque la producción de hidrocarburos se da en los oenocitos, la etapa de epoxidación tiene lugar en las estructuras glandulares. Adicionalmente, se ha determinado que en algunas especies existe una monooxigenasa que ataca regioespecíficamente el doble enlace n-3 independientemente de la longitud de la cadena o el grado de insaturación.¹⁰ Además de las feromonas de tipo I y II, se han identificado alcoholes secundarios, cetonas y ésteres de cadena larga no ramificada, así como algunos compuestos ramificados con grupos metilo (**Figura 1.15**).⁸¹

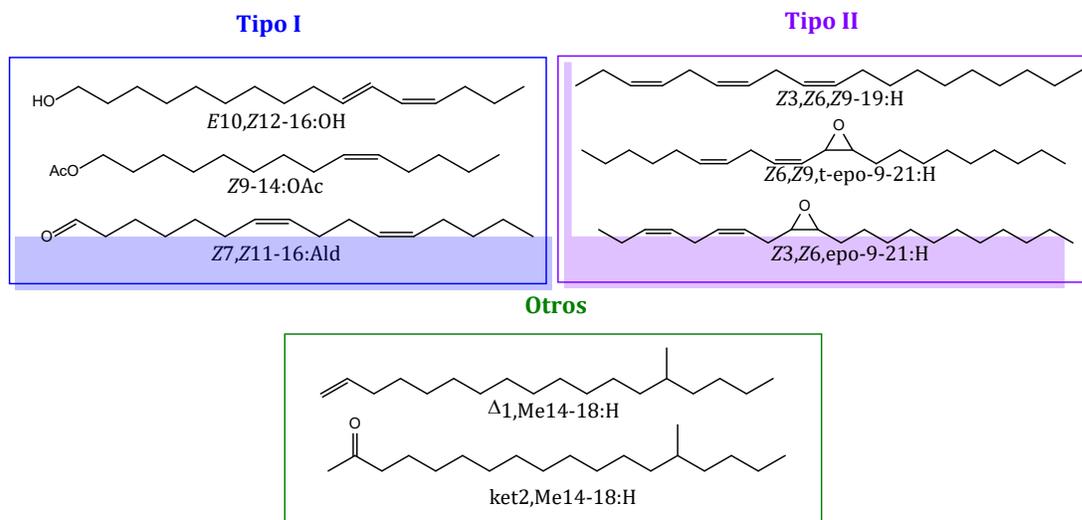


Figura 1.15. Estructuras características de feromonas producidas por lepidópteros [Z = doble enlace con isomería *cis*; E = doble enlace con isomería *trans*; el número antes del guion = posición del doble enlace; número después del guion = el número de carbonos de la cadena lineal; OAc = acetato; OH = alcohol; Ald = aldehído; H = ausencia de un grupo funcional terminal; Δ = doble enlace terminal; epo = anillo *cis*-epoxi; t-epo = anillo *trans*-epoxi; Me = grupo metilo; y, ket = grupo cetona] (Figura adaptada,⁸¹ creada en ChemDraw).

La diversidad de mariposas existente es paralela a una gran diversidad química en los VOCs que constituyen sus feromonas producidas por machos, incluyendo derivados de alcaloides, terpenoides, compuestos aromáticos o ácidos carboxílicos.¹⁸ Sí bien en varios casos los VOCs de feromonas sexuales de las mariposas producidas por machos son similares a los VOCs de feromonas sexuales de las polillas producidas por las hembras, en muchos casos se sugiere o se ha demostrado que son compuestos derivados de sus plantas hospederas.^{125,126,127,128} La gran variedad de VOCs macho-específicos es un indicativo que, los rasgos de señalización de las mariposas y las rutas biosintéticas subyacentes han evolucionado varias veces de forma independiente,¹⁸ mostrando la gran influencia que tiene para este subgrupo de lepidópteros la composición química de la planta hospedera. Existen reportes que dan indicios sobre la posibilidad de que los insectos pueden usar compuestos obtenidos directamente de la planta hospedera como fuente de los componentes de sus feromonas. Esto se debe a que la dieta es posiblemente el factor ambiental más importante que da forma a las señales químicas en los insectos. En casos muy particulares, los componentes de la dieta se convierten directamente en feromonas, pero de manera más general, la variación en la dieta de un individuo influye en su desarrollo y, por lo tanto, en su capacidad para sintetizar la señal. Debido a esto, para el estudio de los VOCs que constituyen la feromona se debe procurar que las condiciones de desarrollo del insecto sean muy similares a las del hábitat natural, garantizando que la dieta tenga la menor alteración.

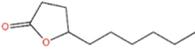
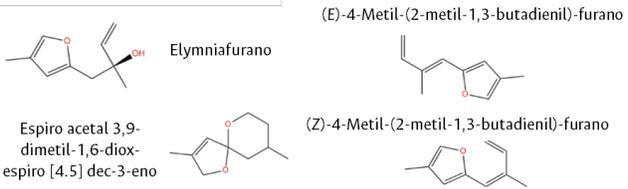
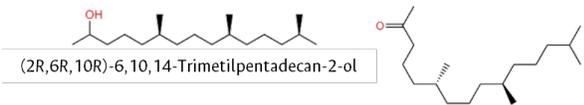
1.4.4.1. Feromonas de lepidópteros de la familia *Nymphalidae*, subfamilia *Satyrinae*

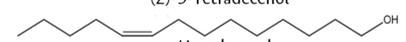
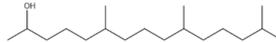
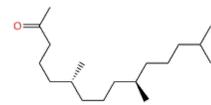
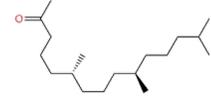
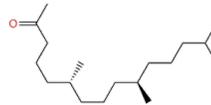
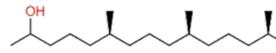
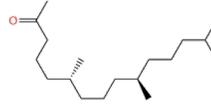
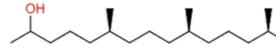
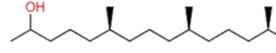
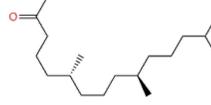
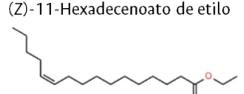
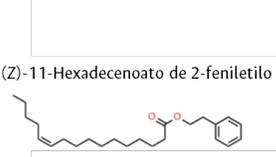
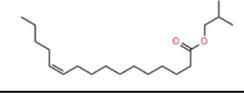
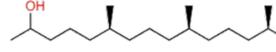
Para el caso particular de la familia *Nymphalidae*, subfamilia *Satyrinae*, hasta donde se conoce, se ha estudiado la feromona sexual para 20 especies¹⁵ de los géneros *Bicyclus* (17 especies),^{16,17,18} *Elymnias* (1 especie),¹⁹ *Lethe* (1 especie),²⁰ y *Opsiphanes* (1 especie).² En todos los casos, la feromona es producida por el macho, sin embargo, en cuanto a características estructurales, se presenta una considerable diversidad. Para *Lethe marginalis* Motschulsky, 1860 se identificó como

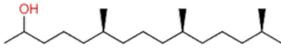
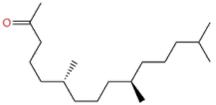
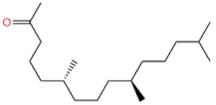
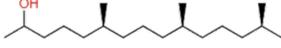
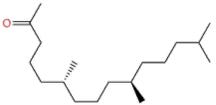
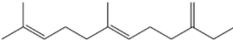
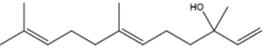
compuesto principal de la feromona la γ -decalactona;²⁰ para *Elymnias thryallis* (Kirsch, 1877) se identificaron el elymniafurano, los isómeros (E) y (Z)-4-metil-(2-metil-1,3-butadienil)-furano y el espiro acetal 3,9-dimetil-1,6-diox-espiro-[4.5]-dec-3-eno (Tabla 3.1).¹⁹ Estos compuestos no presentan similitud con los VOCs que se derivan de las rutas de biosíntesis endógena de polillas,¹⁰ por lo que posiblemente podrían ser derivados de compuestos de la planta hospedera. Adicionalmente, los furanos y lactonas se caracterizan por presentar olores afrutados, que han sido descritos como característicos de algunas secreciones de lepidópteros.^{129,130,131}

Por su parte, para el género *Bicyclus*, se ha reportado que algunos de los VOCs que constituyen las feromonas masculinas se producen de forma endógena a través de vías biosintéticas compartidas con hembras de muchas especies de polillas.^{18,16,17} Se reporta que dos de los constituyentes de la feromona sexual de *Bicyclus anynana* (Butler, 1879), el (Z)-9-tetradecenol y el hexadecanal, se producen a través de la actividad de una acidograso- Δ 11-desaturasa y dos acidograso-reductasas especializadas en la formación de alcoholes.¹⁸ Para la especie *B. martius - sanaos* (Fabricius, 1793) también se identificó una Δ 11-desaturasa involucrada en la biosíntesis de (Z)-11- hexadecenoatos de etilo, isobutilo y 2-feniletilo, VOCs que hacen parte de la feromona producida por el macho.¹⁷ En el caso del género *Opsiphanes*, el reporte para *O. invirae* (Hübner, 1818) muestra un compuesto que podría sintetizarse de manera endógena ((Z)-7-Heptadeceno) y dos constituyentes terpénicos ((E)- β -Farneseno, (E)-Nerolidol) que posiblemente toma de la planta hospedera (*Eleais guinensis*) o sintetiza usando un precursor presente en ella (Tabla 1.4).^{2,10} Teniendo en cuenta los reportes para mariposas de la subfamilia Satyrinae, es probable encontrar un comportamiento sexual similar en la especie de interés *O. cassina*, en el que el macho sea el productor de la feromona. Así mismo, debido a la cercanía taxonómica entre *O. invirae* y *O. cassina*, es posible sugerir que la feromona de *O. cassina* esté constituida por VOCs con estructuras químicas muy similares o derivadas con pequeños cambios de concentración y/o proporción de componentes.

Tabla 1.4. Características estructurales de los VOCs que constituyen la feromona sexual producida por machos de especies de la familia Nymphalidae, subfamilia Satyrinae.

Especie	VOCs presentes en la feromona	Ref
<i>Lethe marginali</i>	<p>γ-Decalactona</p> 	20
<i>Elymnias thryallis</i>	 <p>Elymniafurano</p> <p>Espiro acetal 3,9-dimetil-1,6-diox-espiro [4.5] dec-3-eno</p> <p>(E)-4-Metil-(2-metil-1,3-butadienil)-furano</p> <p>(Z)-4-Metil-(2-metil-1,3-butadienil)-furano</p>	19
<i>Bicyclus anisops</i>	 <p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> <p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p>	16

<i>Bicyclus anynana</i>	<p>(Z)-9-Tetradecenol</p>  <p>Hexadecanal</p>  <p>6,10,12-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	17
<i>Bicyclus buea</i>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	16
<i>Bicyclus dentata</i>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	16
<i>Bicyclus dorothea</i>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	16
<i>Bicyclus ephorus</i>	<p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	16
<i>Bicyclus golo</i>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	16
<i>Bicyclus graueri</i>	<p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	16
<i>Bicyclus ignobilis</i>	<p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	16
<i>Bicyclus mandanes</i>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	16
<i>Bicyclus martius sanaos</i>	<p>(Z)-11-Hexadecenoato de etilo</p>  <p>(Z)-11-Hexadecenoato de 2-feniletilo</p>  <p>(Z)-11-Hexadecenoato de isobutilo</p> 	18
<i>Bicyclus mollitia</i>	<p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	16

<p><i>Bicyclus safitza</i></p>	<p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	<p>16</p>
<p><i>Bicyclus sambulos</i></p>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	<p>16</p>
<p><i>Bicyclus sandace</i></p>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	<p>16</p>
<p><i>Bicyclus sebetus</i></p>	<p>(2R,6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ol</p> 	<p>16</p>
<p><i>Bicyclus vulgaris</i></p>	<p>(6R,10R)-6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona</p> 	<p>16</p>
<p><i>Opsiphanes invirae</i></p>	<p>(E)-11-Farneseno</p>  <p>(Z)-7-Heptadeceno</p>  <p>(E)-Nerolidol</p> 	<p>2</p>

Capítulo 2. Evaluación del comportamiento sexual de adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio

Encontrar pareja es uno de los mayores desafíos que enfrenta cualquier animal, en el caso de los lepidópteros, es resuelto a través de la liberación y detección de estímulos de naturaleza química en combinación con conductas estereotipadas de cortejo que, en conjunto, determinan que ocurra o no el apareamiento. En este capítulo se presenta la evaluación del comportamiento sexual de adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio, y se discute el efecto de las condiciones ambientales sobre las conductas de respuesta. Además, se establecen algunos de los factores a considerar para realizar la extracción de los semioquímicos que podrían estar involucrados en la conducta sexual de la especie.

2.1. Metodología

2.1.1. Insectos

Las prepupas y pupas de *O. cassina* fueron colectadas^{1*} en cultivos comerciales de palma de aceite (Plantación Sepropal, 4°16'02"N71°58'58"W) con altos niveles de infestación (más de 7 larvas de V instar por hoja),¹¹⁰ ubicados en el municipio de Puerto Gaitán, Meta. Las capturas se realizaron durante los meses de junio, julio y octubre de 2021 y el mes de abril de 2022; los insectos fueron colectados manualmente de las hojas de la palma, principalmente de las hojas 17 y 25, cortando la parte del foliolo donde se encontraba adherido el *cremaster* (ápice del último segmento del abdomen de la pupa, que funciona como elemento de unión con el techo del que cuelga). A continuación, las prepupas y pupas fueron llevadas a los laboratorios del Campo Experimental Palmar de las Corocoras, Paratebueno, Cundinamarca (4°22'5.5"N73°10'16.9"W); una parte de los insectos se usó para establecer la cría y la otra fue enviada a la ciudad de Bogotá. Para el traslado, las prepupas y pupas fueron depositadas en neveras o recipientes plásticos con algodón mientras que los adultos (que emergieron en el campo experimental), se aislaron en sobres triangulares de papel pergamino para que las alas del insecto no sufrieran ningún daño.

^{1*}Para la colecta de insectos se cuenta con el permiso individual de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial emitido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA, bajo la Resolución N° 02431 del 24 de diciembre de 2018. Ver **Anexo 1**.

2.1.2. Desarrollo de adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio

En el laboratorio en Bogotá, las prepupas se colocaron en un recipiente con foliolos de palma de aceite para favorecer su adherencia en la formación de la pupa; las pupas se distribuyeron entre 3 y 9 unidades por recipiente de plástico, de acuerdo con el tamaño del mismo, colocando papel toalla en la base, facilitando así la emergencia de los adultos y el adecuado despliegue de sus alas. A través de observaciones en el laboratorio se realizó el registro de la duración del estadio de pupa y adulto, así como del horario durante el cual ocurría la emergencia. Los adultos se diferenciaron sexualmente de acuerdo con las características de dimorfismo sexual descritas para especies del mismo género: coloración más intensa en alas de machos, mayor envergadura alar y abdomen más grueso en hembras (Figura 2.1 A);² diferencias causadas por procesos de selección natural y sexual.^{132,133} Posteriormente, los adultos separados por sexo se mantuvieron, hasta la realización de estudios de comportamiento sexual, en jaulas fabricadas con tela de muselina (Figura 2.1 B) y tubos de PVC (1.51 m x 0.66 m x 0.66 m) con agua con azúcar como alimento, a una temperatura entre 13-22 °C y una humedad relativa entre 46 – 59 %.

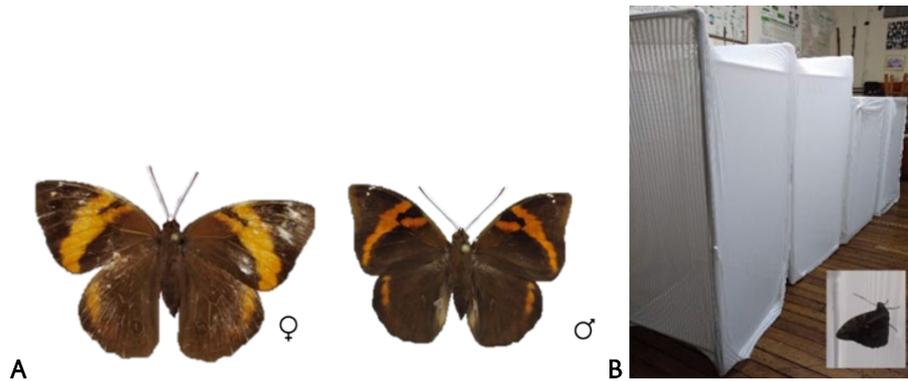


Figura 2.1. A. Características de dimorfismo sexual de adultos del género *Opsiphanes* (Nymphalidae) [♀(hembra) ♂(macho)]. B. Jaulas entomológicas para mantenimiento de adultos. Fotos: J. Pastrana y J. Bustos.

2.1.3. Evaluación del comportamiento de adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio

Para el estudio de comportamiento de los adultos bajo condiciones de laboratorio se realizaron tres experimentos, a continuación, se esquematiza y describe la metodología empleada en cada uno de ellos:

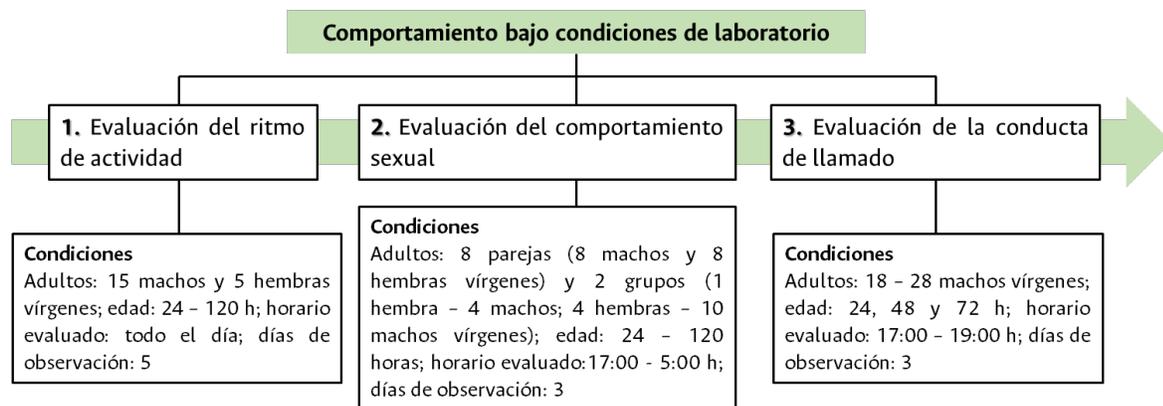


Figura 2.2. Esquema de la metodología empleada para la evaluación del comportamiento de adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio.

Para realizar las diferentes evaluaciones, los adultos eran dispuestos en recipientes plásticos transparentes con papel de toalla en la base, y agua con azúcar como fuente de alimentación. Las observaciones eran realizadas con iluminación natural o empleando luz roja, esto para simular las condiciones más cercanas a las naturales y no causar interferencia en el comportamiento de los insectos. Las condiciones de temperatura y humedad relativa fueron de 13 – 22 °C y 46 – 59 %, respectivamente.

2.1.3.1. Evaluación del ritmo de actividad

Se emplearon 20 adultos vírgenes (15 machos y 5 hembras, por separado), con edades entre 24 y 120 h, que emergieron en el laboratorio, se realizaron observaciones durante todo el día por 5 días, registrando actividades de desplazamiento (caminar y/o volar) y alimentación.^{2,134}

2.1.3.2. Evaluación del comportamiento sexual

Se emplearon 8 parejas de insectos adultos (8 machos y 8 hembras vírgenes) con edad entre 24 y 120 h y 2 grupos de adultos, uno con 1 hembra y 4 machos de campo y el otro con 4 hembras y 10 machos de cría (vírgenes), de 24 a 72 horas de edad. Se seleccionó esa relación entre hembras y machos, teniendo en cuenta el estudio de comportamiento de una especie del mismo género (*O. invirae*), dónde se emplearon grupos de insectos con al menos 3 machos más que hembras, en el que se encontró que los machos se agrupan o vuelan en conjunto antes de iniciar el cortejo y liberación de la feromona.² Las observaciones se realizaron durante 3 días a partir de las 17:00 h hasta las 5:00 h; se seleccionó ese horario, teniendo en cuenta el comportamiento determinado en observaciones previas. Se estudiaron las conductas de cortejo y cópula presentadas por machos y hembras, registrando los horarios, tomando como referencia los reportes para especies del mismo género.¹³⁵

2.1.3.3. Evaluación de la conducta de llamado

Se realizaron observaciones entre las 17:00 y 19:00 h. Los machos en proceso de llamado fueron reconocidos por comportamientos como vibración, movimiento de abdomen y vuelo continuo exponiendo los penachos presentes en las alas posteriores.^{2,136} Se estudiaron machos con diferente edad (24, 48 y 72 h), considerando las variables de inicio, duración y número de llamados.^{137,138} La unidad experimental fue de 1 macho, por edad se evaluaron entre 19 y 28 individuos. Los machos se dispusieron de manera individual en cajas plásticas transparentes empleando como fuente de alimento agua con azúcar impregnada en un algodón.² Los datos se analizaron siguiendo un modelo ANOVA empleando el estadístico F como criterio de rechazo de la hipótesis nula (H_0 :no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos evaluados).

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Desarrollo de adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio

La observación de los adultos de *O. cassina* permitió identificar las diferencias de dimorfismo sexual previamente descritas para el género, pero además se encontraron estructuras asociadas con la producción de señales químicas. Se observó que las hembras presentan un mayor tamaño que los machos (envergadura alar entre 70-75 mm vs 60-70mm) y una coloración menos intensa en la vista dorsal y ventral de las alas. El abdomen del macho es café oscuro, delgado y tiene aberturas de color café más claro en cada sección lateral; en su interior se observan dos placas secretoras de color amarillo oscuro, ubicadas en el cuarto y quinto segmento abdominal, que presentan un aroma dulce perceptible al olfato humano. Por su parte, el abdomen de la hembra es más grande, robusto y de color amarillo verdoso sin ninguna estructura glandular visible. Adicionalmente, en las alas posteriores el macho presenta agrupaciones de vellosidades conocidas como penachos, que son atribuidas a la necesidad de diseminación de feromonas,² y que no se presentan en las alas de las hembras (**Figura 2.3**). Estas características podrían indicar que en esta especie es el macho el que produce y emite los VOCs que regulan el proceso de cortejo y cópula, cómo se ha reportado para otras especies del género *Opsiphanes* y de la familia Nymphalidae.^{2,139}



Figura 2.3. Características de dimorfismo sexual de adultos de *Opsiphanes cassina* emergidos bajo condiciones de laboratorio [♀(hembra) ♂(macho)]. (A la izquierda se compara la vista dorsal y ventral de los adultos; a la derecha se compara el abdomen y las alas posteriores de los adultos, señalando las zonas donde se presentan las estructuras glandulares en machos). Fotos: J. Bustos

Bajo condiciones de laboratorio, la duración del estadio de pupa fue de $12,6 \pm 5,9$ días ($n=130$) y la de adulto de $12,3 \pm 6,7$ y $14,7 \pm 7,8$ días para machos ($n=275$) y hembras ($n=231$), respectivamente; estos valores están dentro de los rangos reportados para el ciclo de vida bajo condiciones de umbráculo en campo.⁴ En cuanto a la emergencia de los adultos de *O. cassina*, esta se dio entre las 14:00 y 17:30 h, observando que emerge un mayor número de machos antes que de hembras (**Figuras 2.4 y 2.5**). Este fenómeno, dónde inicialmente hay una mayor proporción de machos, se conoce como protandria, un comportamiento adaptativo común en lepidópteros que minimiza la muerte pre-reproductiva de las hembras y que está relacionado con un mayor éxito reproductivo, debido a que los machos alcanzan primero la madurez sexual y pueden aprovechar la alta receptividad de las hembras vírgenes.^{140,141}

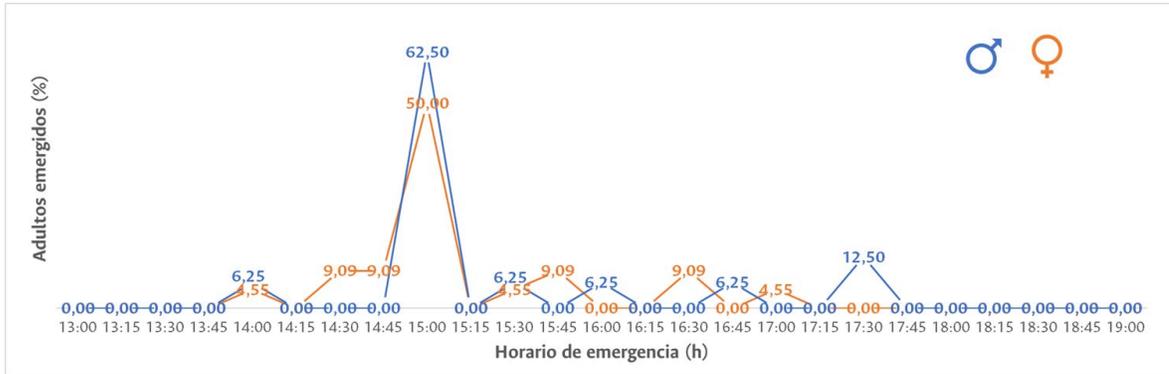


Figura 2.4. Horario de emergencia de adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio [♀(hembras) ♂(machos)] (♂n= 74 y ♀n=56).

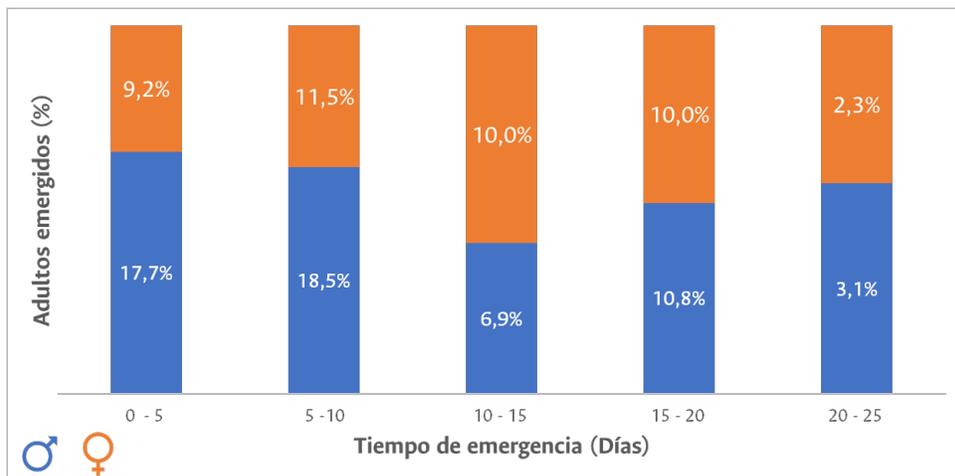


Figura 2.5. Ritmo de emergencia de adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio [♀(hembras) ♂(machos)] (♂n= 74 y ♀n=56).

2.2.2. Comportamiento de adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio

2.2.2.1. Evaluación del ritmo de actividad

Los resultados de las observaciones sobre las actividades de locomoción, búsqueda de alimento y cortejo (vibración y movimiento de abdomen) de adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio se esquematizan en la **Figura 2.6**.

Si bien los adultos permanecieron en reposo durante la mayor parte del día y la noche, se encontró que, en las primeras horas de la mañana, después del amanecer, muchas de las mariposas comenzaban a caminar por las paredes de la jaula y a volar, alcanzando un primer punto máximo de actividad entre las 6:00 y 8:00 h. Durante el día, no se observó mayor movimiento hasta después de las 16:00 h, cuando los adultos se desplazaron en busca de las fuentes de alimento. Posteriormente, en el horario crepuscular (18:00 – 20:00 h) se observó un tercer pico de actividad de vuelo constante, identificando en los machos movimiento de abdomen y vibración, al igual que la liberación de un olor perceptible para el olfato humano, con notas dulces.

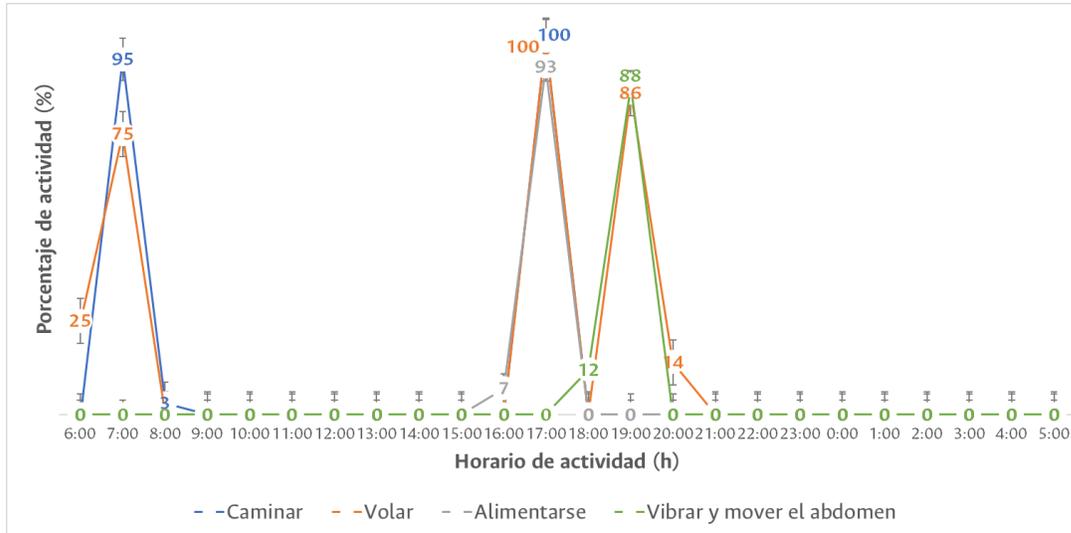


Figura 2.6. Horario de actividad de adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio (se presenta el promedio \pm desviación estándar de las observaciones de 5 días para 20 adultos) (σ n= 15 y ρ n=5) (La vibración y movimiento de abdomen solo se presentó en machos).

Este comportamiento fue asociado con una conducta de cortejo, al observar que las glándulas del macho se llenaban; adicionalmente, en el estudio de las especies *O. invirae* (Hübner, 1818), *O. tamarindi* Felder, 1861, *Caligo memnon* Felder, 1867, *C. eurilochus* Cramer, 1775, del mismo género y/o familia, se describe una conducta similar, en la que luego de que el macho llena sus estructuras glandulares, vibra y mueve el abdomen, atrae a la hembra y realiza la cópula.^{142,143} Adicionalmente, se ha reportado que la mayoría de los adultos de mariposas de la tribu Brassolini (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) son crepusculares y, dependiendo de la especie, el apareamiento y la oviposición ocurren al anochecer, al amanecer o en ambos.^{142,143} Igualmente, para algunas especies del género *Opsiphanes*, se reportó que, debido a las bajas temperaturas durante las horas crepusculares, los machos adultos tiemblan o vibran para elevar la temperatura torácica en preparación para los comportamientos reproductivos, presentando un aumento entre 15,4 y 17,5 °C por encima de la temperatura ambiente.¹³⁵ Así mismo, en estudios realizados en Panamá y Brasil, se estableció que los machos adultos del género *Opsiphanes* usan vuelos rápidos para realizar exhibiciones aéreas y algunas especies forman agregaciones de apareamiento.^{2,135,142,144} Un estudio enfocado al análisis morfológico de las alas de adultos de *Opsiphanes*, indicó que es probable que los machos incurran en un mayor gasto energético que las hembras durante las actividades reproductivas, lo que podría explicar su divergencia en la morfología de las alas. Los machos, además de presentar penachos en las alas posteriores, parecen tener proporcionalmente más músculo de vuelo por unidad de área en las alas delanteras, respecto a las hembras, indicando que los machos podrían emplear una frecuencia de aleteo más alta que las hembras congéneres.¹⁴² Considerando estos reportes, en conjunto con los resultados de las primeras observaciones, se evaluó entre las 17:00 – 05:00 h el comportamiento de las parejas y grupos de machos y hembras.

2.2.2.2. Evaluación del comportamiento sexual

Bajo las condiciones de laboratorio empleadas, no se observaron cópulas ni en las parejas ni en los grupos, sólo algunas conductas de cortejo, que podrían asociarse con una estrategia tipo “patrolling”, donde los machos se acercaban a las hembras, y luego presentaron una secuencia estereotipada de comportamientos, que se repitió sin variación en todas las evaluaciones, incluida la vibración de tórax y abdomen, movimiento de las alas y la exhibición de los penachos hacia la hembra, lo que se esperaba la atrajera para la cópula. Sin embargo, la hembra nunca entró en contacto continuo con el cuerpo o el extremo del abdomen del macho, lo que no permitió que se produjera la cópula (Figura 2.7).

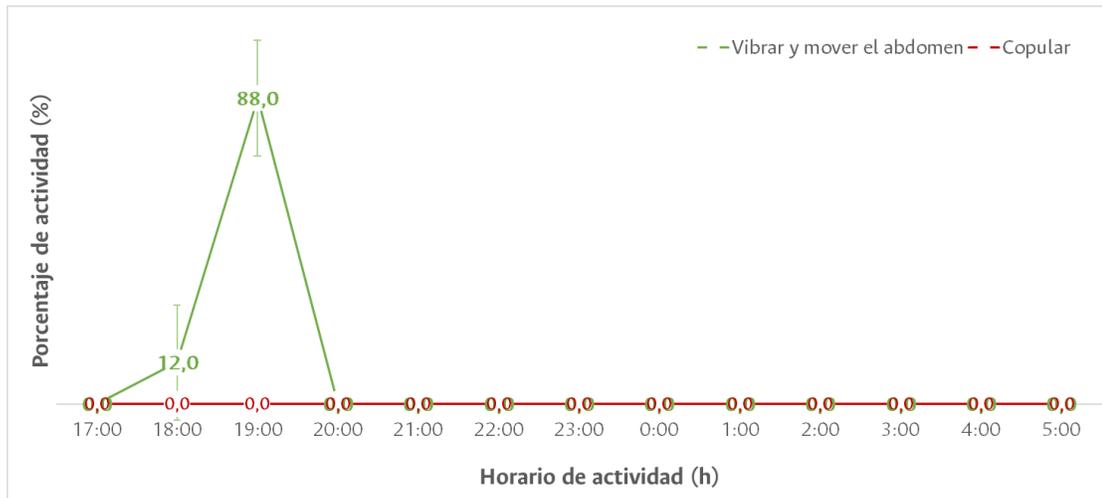


Figura 2.7. Horario de actividad sexual de adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio (se presenta el promedio \pm desviación estándar de las observaciones de 3 días para 8 parejas y 2 grupos a adultos; la vibración y movimiento de abdomen solo se presentó en machos).

Aunque el apareamiento puede ser la actividad más importante del estadio adulto en la mayoría de insectos, ya que brinda la oportunidad de propagar genes a la próxima generación,¹¹⁷ varios estudios reportan la probabilidad de que algunas hembras permanezcan sin aparearse incluso en condiciones de campo.¹⁴⁵ Para lepidópteros, los reportes indican que factores como la densidad de la población, el espacio para realizar vuelos, la proximidad a las plantas hospederas y su posición vertical en las mismas, afectan la respuesta de las hembras a los estímulos visuales y/o químicos producidos por los machos, influyendo directamente en el éxito reproductivo de la especie.^{146,147,148,149} Adicionalmente, el hecho de que no se observaran cópulas bajo condiciones de laboratorio, pudo estar relacionado con el cambio de condiciones climáticas, respecto a los lugares de colecta.^{150,151,152,153,154,155,156} Bogotá presenta una altitud de 2649 msnm, y durante el estudio se registraron temperaturas entre 13 – 22 °C con humedad relativa entre 46 – 59 %; por su parte, Puerto Gaitán presenta una altitud de 149 msnm, temperatura entre 20 – 28 °C y humedad relativa entre 60 – 80 %.¹⁵⁷ La temperatura y la humedad son de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento y desarrollo de los insectos, modificando el tiempo de generación, el tamaño corporal, el voltinismo (número de generaciones de un organismo que aparecen en un año) y las conductas sexuales.^{150,151,152} Así

mismo existe evidencia de que los insectos ajustan sus comportamientos asociados con el vuelo, como la búsqueda de alimento o pareja, en respuesta a los cambios en la presión barométrica.¹⁵⁴ Particularmente en el apareamiento, los cambios en esas condiciones pueden alterar el inicio o la duración de la cópula, e incluso, disminuir el porcentaje de ocurrencia. Como ejemplo, en un estudio realizado sobre la especie *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) donde se evaluó el efecto de la humedad en la detección de la feromona sexual que produce la hembra, se encontró que, al aumentar la humedad, la proporción de machos que tomaron vuelo y alcanzaron la fuente disminuyó, mientras que la proporción que exhibió una interrupción en el vuelo aumentó.¹⁵³ Por su parte, para la especie *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Phycitidae) se observó que a una menor temperatura y humedad relativa disminuyen el número y la duración de apareamientos. A su vez, se observó que el apareamiento comienza antes a temperaturas más bajas que a temperaturas más altas.¹⁵¹ En otro estudio, realizado sobre la especie *Mythimna unipuncta* (= *Pseudaletia unipuncta*) (Haworth, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae), se observó que al aumentar la presión barométrica hubo una disminución significativa en la incidencia de apareamiento.¹⁵⁵ Un comportamiento similar fue reportado para *Mythimna separata* Walker, 1865 (Lepidoptera: Noctuidae), donde se encontró que, a una presión barométrica baja, mejora el rendimiento del vuelo y el rendimiento reproductivo de la especie.¹⁵⁶

Estos reportes muestran que, aunque el insecto emisor puede realizar el cortejo y producir la señal química idónea, variables como la temperatura, la humedad, la presión barométrica, entre otras, afectan considerablemente al insecto receptor, impidiendo que la cópula se lleve a cabo. Debido a ello, se decidió enfocar el estudio de comportamiento en la determinación del horario de llamado por parte de los machos, para posteriormente realizar la extracción de VOCs durante el mismo periodo de tiempo.

2.2.2.3. Conducta de llamado de los machos

El éxito reproductivo podría considerarse una de las principales causas de la evolución de los patrones de comportamiento sexual en los animales, particularmente en la clase Insecta.^{135,158,159,113} Para que estos puedan aparearse y reproducirse, se debe lograr la comunicación a grandes distancias siendo un evento determinante la atracción y ubicación de un compañero sexual, ya que, las inexactitudes en la localización de la pareja implicarían un tiempo de búsqueda prolongado, mayor gasto de energía, mayor riesgo de depredación y reducción de la descendencia viable.^{160,161,162} En la mayoría de especies de lepidópteros, esta situación es resuelta mediante la liberación y detección de feromonas sexuales.^{163,9} En este escenario, es importante considerar que la emisión de la feromona sexual está asociada con otros comportamientos estereotipados en lo que se conoce como “conducta de llamado”, donde el organismo que libera la señal química realiza movimientos o emite sonidos tanto para favorecer la diseminación de los componentes de la feromona, como para favorecer o aumentar la atención del organismo receptor; todo lo anterior en un horario específico.^{164,165,166,167}

El comportamiento de llamado de los machos de *O. cassina* inició desde las 18:00 h y se extendió hasta 18:30 h para los adultos de 24, 48 y 72 h de edad, encontrando que, para los adultos de

24 h, el inicio se da 10 minutos después que para las otras dos edades (**Figura 2.8**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($F_{\text{experimental}} [2,60] < F_{\text{crítico}} [3,13]$) entre las tres edades evaluadas para la variable duración del llamado (**Figura 2.9 A**). Por otro lado, se observó que el llamado no se da de manera continua, sino que el macho vibra, vuela y expone los penachos realizando pausas, encontrando que se da un promedio de 5 llamados. Para la variable número de llamados, tampoco se encontraron diferencias significativas ($F_{\text{experimental}} [1,38] < F_{\text{crítico}} [3,15]$) entre las tres edades evaluadas (**Figura 2.9 B**).

Los resultados obtenidos sugirieron que, la extracción de glándulas sexuales de machos vírgenes de 24, 48 y 72 h de edad podría ser realizada durante el horario crepuscular evaluado.

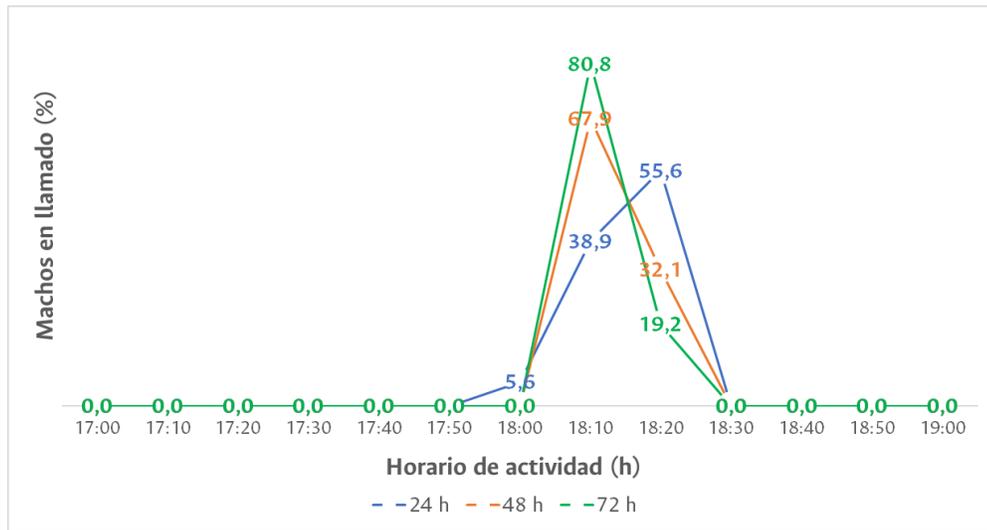


Figura 2.8. Horario de llamado de machos de *Opsiphanes cassina* de diferentes días de edad, bajo condiciones de laboratorio.

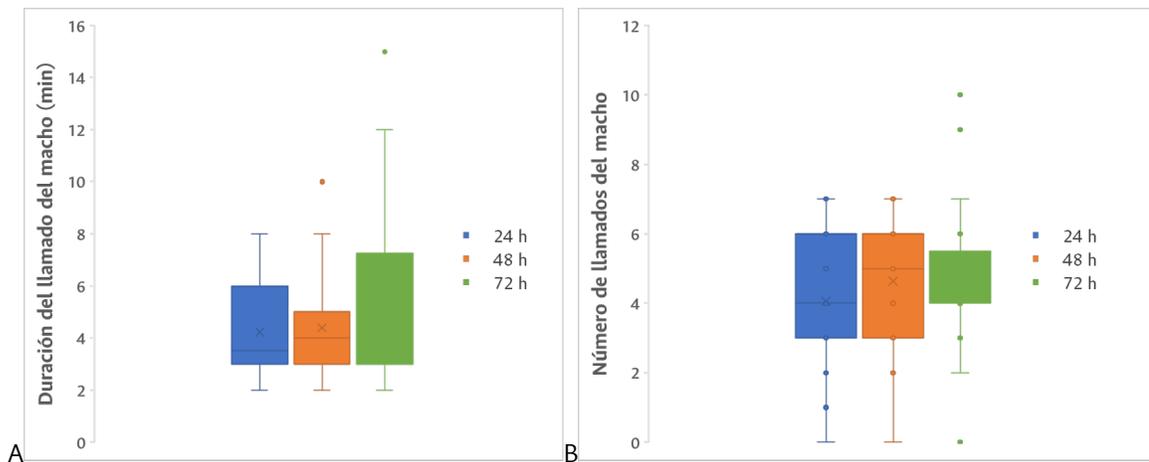


Figura 2.9. Duración del llamado (A) y número de llamados (B) de machos de *Opsiphanes cassina* de diferentes días de edad, bajo condiciones de laboratorio.

2.3. Conclusiones

- El dimorfismo sexual identificado en adultos de *O. cassina* muestra la presencia de estructuras glandulares en el abdomen y alas de los machos, las cuales pueden estar asociadas con la producción de la feromona sexual de esta especie. Esto coincide con lo reportado para otras especies de este género y familia.
- Se identificaron tres picos de actividad locomotora de *O. cassina*, entre los que se destaca la conducta de cortejo que realizan los machos en el periodo crepuscular vibrando, moviendo el abdomen y llenando sus glándulas con una secreción amarilla, que presenta un aroma dulce perceptible al olfato humano. Este comportamiento de cortejo coincide con lo reportado para otras especies del mismo género y/o familia.
- Aunque bajo las condiciones de laboratorio no se observaron cópulas, las características morfológicas y las respuestas conductuales de los adultos de *O. cassina*, permiten sugerir que su comunicación podría ser mediada por compuestos orgánicos volátiles que actuarían como una feromona sexual producida por el macho durante el horario del llamado (18:00 - 20:00 h).

Capítulo 3. Estudio de la feromona sexual macho-específica de *Opsiphanes cassina*

Estudiar por primera vez la feromona de una especie implica enfrentarse a muestras de composición desconocida, sin embargo, se puede tener una idea del tipo de moléculas que la constituyen al considerar la taxonomía del insecto y la composición química de la planta hospedera. Lo anterior es viable pues, se ha establecido que en individuos de un mismo grupo taxonómico (familia, subfamilia, tribu y género) se presenta la biosíntesis de moléculas de naturaleza química similar, indicando la existencia de rutas biosintéticas compartidas,¹⁶⁸ igualmente gracias a la capacidad adaptativa de muchos insectos para secuestrar componentes de las plantas y emplearlos como precursores o constituyentes de sus señales químicas.¹⁶⁹ En este tercer capítulo se presenta la metodología y resultados obtenidos al analizar los VOCs extraídos de machos y hembras adultos de *O. cassina*, con el fin de separar e identificar los posibles candidatos a feromona sexual de esta especie.

3.1. Metodología

3.1.1. Insectos

Para realizar la extracción de los VOCs liberados por adultos de *O. cassina*, se obtuvieron insectos de cultivos comerciales de Puerto Gaitán, Meta (Plantación Sepropal, 4°16'02"N71°58'58"W), del campo experimental Palmar de las Corocoras, Paratebueno, Cundicamarca (4°22'5.5"N73°10'16.9"W), y de cultivos comerciales de Tumaco, Nariño (Plantación Palmas de Tumaco, 1°27'57.1"N28°46'23.2"W), que fueron colectados durante los meses de mayo, agosto, septiembre y octubre de 2022 y fueron trasladados al laboratorio en Bogotá. Las pupas y adultos se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio, como se indica en la sección 2.2.1. del Capítulo 2.

3.1.2. Extracción de VOCs liberados por adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio

La captura de los VOCs liberados por los insectos se realizó bajo condiciones de laboratorio, empleando las técnicas de extracción directa con solvente, *head-space* dinámico (HSD) y *head-space* con microextracción en fase sólida (HS-MEFS). A continuación, se esquematiza la metodología y se describen las condiciones evaluadas en cada caso (Figura 3.1).

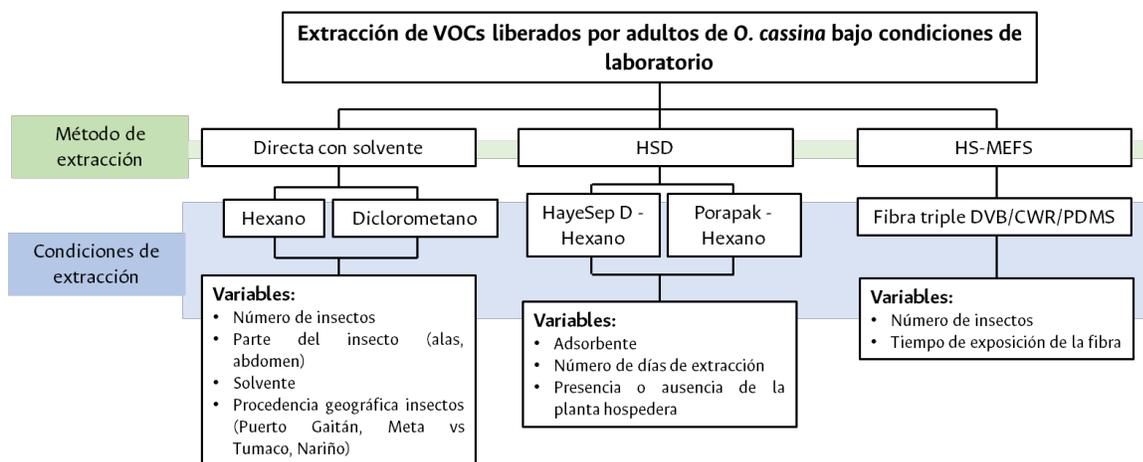


Figura 3.1. Esquema de la metodología empleada para la extracción y detección de VOCs liberados por adultos de *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de laboratorio (HSD: *head-space* dinámico, HS-MEFS: *head-space* estático con microextracción en fase sólida).

3.1.2.1. Extracción directa con solvente

Los extractos cuticulares de alas posteriores y abdomen se obtuvieron de machos y hembras vírgenes de 24 a 72 horas de edad, que emergieron en el laboratorio de Bogotá y provenían de pupas colectadas en Puerto Gaitán, Meta. Las extracciones se realizaron en el horario de cortejo de la especie, que de acuerdo con reportes previos para el género y familia, y confirmado a través del estudio de comportamiento se da en el período crepuscular (18:00 – 20:00 h).² Los adultos se anestesiaron en el congelador durante 10 – 15 minutos; se seleccionó este tiempo para garantizar que el insecto estuviera vivo pero inmóvil. Posteriormente se realizó el desprendimiento de las alas posteriores y el abdomen, partes en las se encuentran las estructuras glandulares en los machos. Las partes se retiraron con tijeras de disección y se sumergieron en hexano o diclorometano (grado HPLC). Las partes se dejaron en el solvente hasta acumular un extracto de varios individuos; posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de una columna de lana de vidrio, se transfirió a un vial de 2 mL y se mantuvo refrigerado (0 – 4 °C) para su posterior análisis cromatográfico.^{2,170} Se obtuvieron extractos con diferente número de adultos con el objetivo de determinar cuántos insectos eran necesarios para obtener una respuesta analítica. Además, se obtuvieron extractos de algunos adultos colectados en campo (Puerto Gaitán, Meta), de edad y estado de apareamiento desconocido, para establecer diferencias respecto a los adultos de cría. Adicionalmente, para establecer si se presentaban diferencias en la composición de la feromona de adultos de *O. cassina* respecto al origen geográfico se obtuvieron extractos de adultos que emergieron en el laboratorio y provenían de pupas colectadas en plantaciones de Tumaco, Nariño y se compararon con los de Puerto Gaitán, Meta. Se eligieron estas ubicaciones geográficas debido a que son las que presentan una mayor incidencia del insecto-plaga y son contrastantes en cuanto a condiciones climáticas y especialmente, respecto a los cultivares de palma de aceite que están sembrados en cada zona.

3.1.2.2. Extracción por head-space dinámico (HSD)

En la extracción por HSD se usaron grupos de 5 adultos vírgenes (machos y hembras por separado, de 24 a 72 h de edad), que emergieron en el laboratorio de Bogotá y provenían de pupas colectadas en Puerto Gaitán, Meta; se empleó como fuente de alimento agua con azúcar impregnada en un algodón. Se estudiaron dos sistemas, uno con los adultos en presencia de la fuente de alimento y otro con los adultos en presencia de la fuente de alimento más la planta hospedera (2 foliolos de palma de aceite *Elaeis guineensis*, cultivar IRHO, hoja 25; los foliolos se reemplazaron a los 9 días por unos nuevos, debido a su avanzado estado de senescencia). Los adultos se colocaron en recipientes de vidrio de 5 L, en un sistema cerrado, bajo un flujo continuo de aire húmedo previamente filtrado con carbón activado. Los insectos permanecieron en el sistema por periodos de 7 y 11 días. Los VOCs liberados por los insectos dentro de la cámara fueron capturados en columnas de vidrio que contenían 50 mg de Hayesep D (DVB) o 50 mg de Porapak (EVB-DVB), como polímeros adsorbentes (Figura 3.2). Todas las muestras fueron tomadas a temperatura ambiente y en cada sistema se realizó una muestra control sin insectos. La activación de los adsorbentes antes de acoplarlos al sistema y la desorción de los compuestos se realizó con hexano (grado HPLC). Las muestras se mantuvieron a baja temperatura en un congelador a 0 °C, para evitar pérdidas de material y garantizar su posterior análisis.^{171,2}

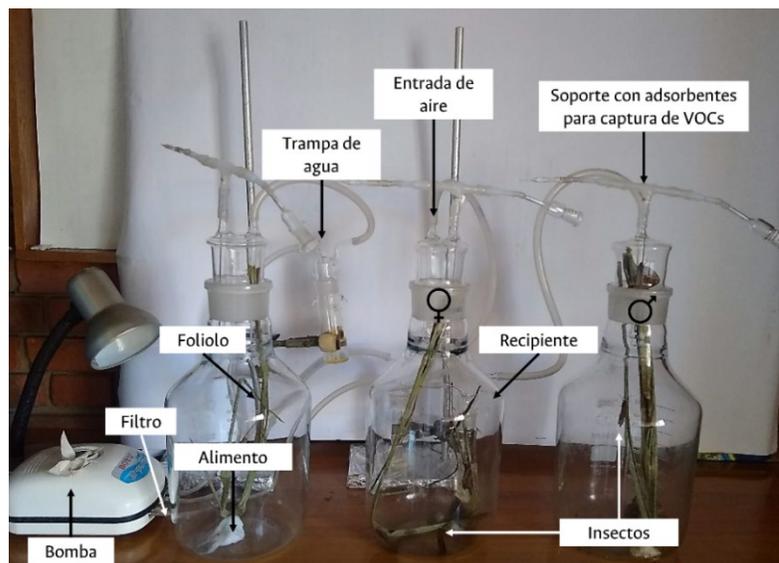


Figura 3.2. Montaje de HSD empleado para la extracción de VOCs liberados por adultos de *Opsiphanes cassina*.

3.1.2.3. Extracción por head-space estático con microextracción en fase sólida (HS-MEFS)

En esta metodología, se emplearon adultos de 24 a 72 h de edad, que emergieron en el laboratorio de Bogotá y provenían de pupas colectadas en Puerto Gaitán, Meta). Los insectos se colocaron en recipientes de vidrio (500 mL), en un sistema cerrado sin flujo continuo de aire y la captura de los VOCs se realizó empleando fibras con triple adsorbente DVB/CWR/PDMS (80/10 μm), para capturar compuestos de diferente polaridad en un mismo ensayo (Figura 2.3).

Antes de ser usadas, las fibras fueron activadas térmicamente durante 30 minutos a 250 °C. El tiempo de equilibrio para la formación del *head-space* fue de 1 hora, y se evaluaron diferentes tiempos de exposición de la fibra (3, 24 y 72 h) empleando 1 o 2 adultos (machos y hembras por separado). Todas las muestras fueron tomadas a temperatura ambiente, usando como fuente de alimento para los adultos agua con azúcar impregnada en un algodón y se realizó una muestra control o blanco con alimento, pero sin insectos. Luego de ser expuestas, las fibras fueron retraídas y removidas de los recipientes de extracción. Para conservar los VOCs, las fibras se almacenaron y transportaron en sus soportes sellados y se mantuvieron a 0 °C hasta su análisis cromatográfico. La desorción de los compuestos capturados se realizó en el puerto de inyección a 250 °C por 5 minutos.¹⁷²

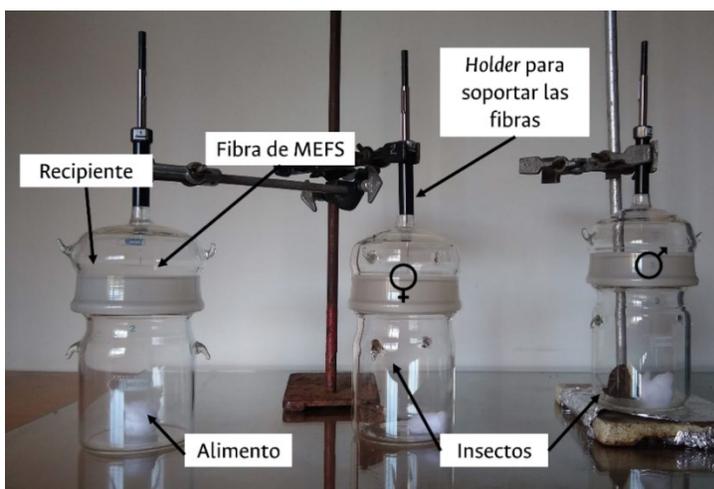


Figura 3.3. Montaje de HS-MEFS empleado para la extracción de VOCs liberados por adultos de *Opsiphanes cassina*.

3.1.3. Análisis CG-FID y CG-EM de los extractos obtenidos de adultos de *O. cassina*

Los extractos obtenidos por las metodologías previamente mencionadas fueron analizados empleando un Cromatógrafo de Gases Agilent 7809B acoplado a un detector de ionización de llama FID (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE. UU) y un CG Agilent 7890B acoplado a un detector EM 5977A (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE. UU). En ambos casos el volumen de inyección fue de 1 μ L y el puerto de inyección se mantuvo a 250 °C en modo de inyección *Split* 1:10. La separación se realizó en una columna capilar HP-5 ((5 % fenil)-metilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EE. UU). El programa de temperatura inició a 50 °C, se mantuvo durante cinco minutos a esta temperatura, continuó con una rampa de 10 °C/min hasta alcanzar los 300 °C, manteniéndose a esta temperatura durante 5 min.² Se empleó como gas de arrastre Helio a un flujo de 1,0 mL/min y la temperatura del detector fue de 300 °C. Para los análisis de espectrometría de masas se empleó como modo de ionización impacto electrónico (IE) a 70 eV y el modo de adquisición fue en barrido completo, con un rango de masas entre 40 - 400 m/z y una velocidad de barrido de 1,5 barridos/s.

Los índices de retención (IR) se calcularon de acuerdo con el método de Kovats a partir de un patrón de mezcla de parafinas ($C_8 - C_{40}$) a una concentración de 25 ppm. En este método, la retención

cromatográfica de los compuestos se determina con relación a la retención de una serie de alcanos lineales, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras.¹⁷³ Teniendo en cuenta que se realizó un análisis con rampa de temperatura, se empleó la siguiente formula:

$$IR = 100_n + 100 \left[\frac{t_r(x) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right] \quad (1)$$

donde $t_r(x)$ es el tiempo de retención del compuesto objeto del cálculo, n el número de átomos de carbono del alcano que eluye inmediatamente antes de x , $t_r(n)$ su tiempo de retención y $t_r(n + 1)$ el tiempo de retención del alcano que eluye inmediatamente después de x . La asignación tentativa de los compuestos se realizó por comparación de índices de retención y los espectros de masas con los de la librería NIST 17, para la identificación inequívoca se emplearon patrones de referencia. Las cantidades relativas de los compuestos se calcularon a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas de iones totales (TIC), de modo que el total de las áreas de los picos de interés fue igual al 100 %.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Extracción e identificación de VOCs liberados por adultos de *O. cassina* bajo condiciones de laboratorio

A partir de varios experimentos y análisis por CG-FID se establecieron las condiciones bajo las cuales se detectaban VOCs macho-específicos con cada una de las metodologías de extracción evaluadas. Para la extracción directa con solventes se encontró que debían usarse grupos mínimo de 13 insectos adultos de cría, que fueran vírgenes y de edad conocida (entre 24 y 72 h). Esto se consideró debido a que, aunque el análisis de las muestras tomadas de adultos de campo mostró un perfil químico similar al de las muestras de adultos de cría (con el mismo número de insectos), las señales presentaron una intensidad mucho menor e incluso en algunos casos no se presentó respuesta (**Figura 3.4**). Este efecto pudo estar relacionado con la edad y estado de apareamiento de los insectos (desconocido para los adultos colectados en campo), pues se ha reportado para varias especies de coleópteros y lepidópteros que estos parámetros fisiológicos modulan la producción de feromonas.^{174,169,175} Por ejemplo, para la especie *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) se estableció que la producción de la feromona sexual depende claramente de la edad de la hembra, encontrando que las hembras jóvenes producen la mayor cantidad de feromona y realizan un mayor número de apareamientos, mientras que las hembras más longevas, que producen menor cantidad de los VOCs, resultan menos atractivas.¹⁶⁹

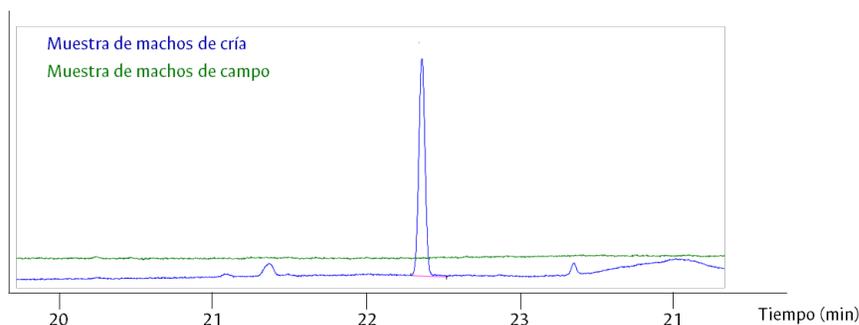


Figura 3.4. Cromatogramas CG-FID de los VOCs detectados por extracción directa con hexano en muestras de abdomen de 13 machos adultos de campo y cría de *Opsiphanes cassina* en una columna HP-5.

En cuanto a las técnicas de *head-space*, para ambas modalidades la extracción se realizó en presencia de alimento. En el caso de la extracción por HS-MEFS se encontró que debía usarse un adulto y exponer la fibra durante al menos 72 h. Por su parte, para la extracción por HSD, al emplear 5 adultos debía realizarse un tiempo de aireación de 11 días; igualmente, al comparar el perfil cromatográfico obtenido con los dos adsorbentes evaluados, se encontró que usando Porapak (EVB-DVB) se detectaba el mismo número de VOCs que con Hayesep D (DVB), pero a una mayor concentración, por lo que decidió emplearse el primero. Este resultado, concuerda con lo reportado en un estudio sobre la influencia de la naturaleza del adsorbente en el muestreo de semioquímicos de insectos por HSD, donde luego de comparar varios tipos de adsorbentes en la captura de VOCs con diferentes funciones químicas (como cetonas, aldehídos, ésteres, alcoholes, alquenos y anillos aromáticos), se encontró que Porapak exhibió el mejor desempeño presentando los mayores porcentajes de recuperación.¹⁷⁶

Comparación de las metodologías de extracción

En las muestras de extracción directa de las secciones glandulares de alas y abdomen, al comparar los resultados obtenidos con los dos solventes empleados (Tabla 3.1), se observa que en las muestras de hexano están presentes los VOCs 2, 4, 5, 6 y 7, encontrando que los compuestos 2 y 5, ambos macho-específicos, solo son detectados en alas. Por su parte, en las muestras de diclorometano, se encuentran los VOCs 3 y 4, únicamente en muestras de machos, tanto en alas como en abdomen, observando que el compuesto 3 sólo es extraído con este solvente. Al comparar el perfil obtenido con los dos solventes empleados, se observa que en las muestras de hexano se detecta un mayor número de compuestos que en las muestras de diclorometano, esto debido a la naturaleza apolar de la mayoría de los VOCs extraídos (Figuras 3.5 y 3.6).

Tabla 3.1. VOCs detectados en muestras de extracción directa con solvente de adultos de *Opsiphanes cassina* por CG-EM, bajo condiciones de laboratorio.

No.	Compuesto	Fuente	IR		Hexano				Diclorometano			
			Exp	Lit/Std	Alas		Abdomen		Alas		Abdomen	
					M	H	M	H	M	H	M	H
1	(E)- β -Ocimeno	EM	1043	1050								
2	(E)- β -Farneseno	EM	1451	1458	X							
3	Vainillina	Std	1404	1399					X		X	
4	(E)-Nerolidol	Std	1563	1575	X		X		X		X	
5	(Z)-7-Heptadeceno	Std	1675	1673	X							
6	Ácido palmítico	EM	1963	1984	X	X	X	X				
7	Ácido oléico	EM	2148	2144	X	X	X	X				

La X indica que el compuesto fue detectado en esa muestra. En Fuente: Std=identificado con base en el índice de retención y el espectro de masas con un patrón de referencia, EM=detectado y propuesto de acuerdo con el índice de retención y el espectro de masas reportado en la literatura; IR=índice de retención, Exp= IR experimental, Lit= IR reportado en Pherobase¹⁵ con la misma columna, Std= IR del patrón; M=machos, H=hembras.

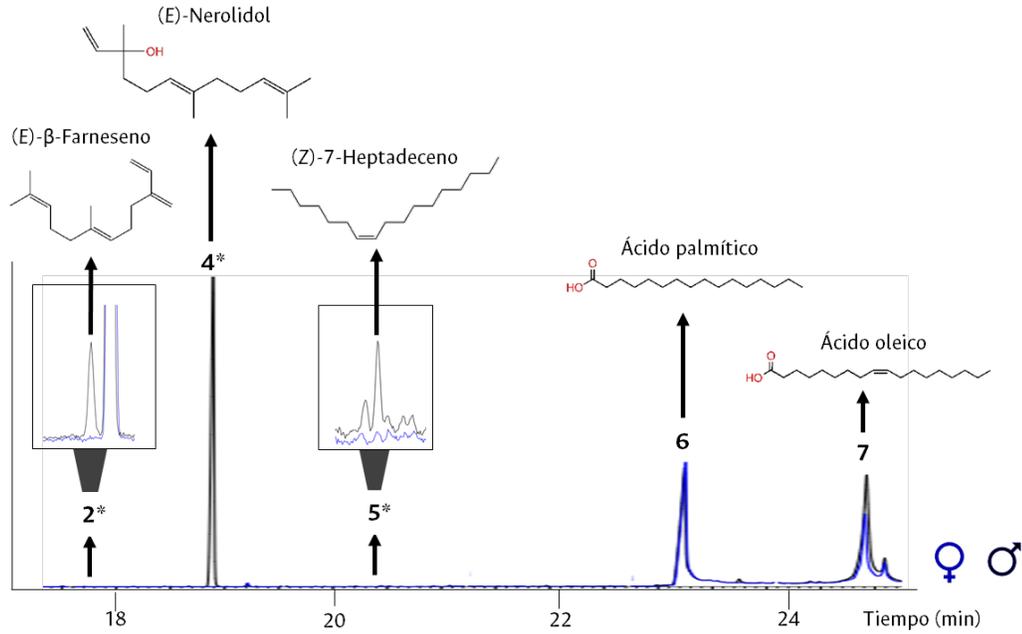


Figura 3.5. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción directa con hexano en muestras de alas de machos (♂) y hembras (♀) adultos de *Opsiphanes cassina* en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.1. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos.

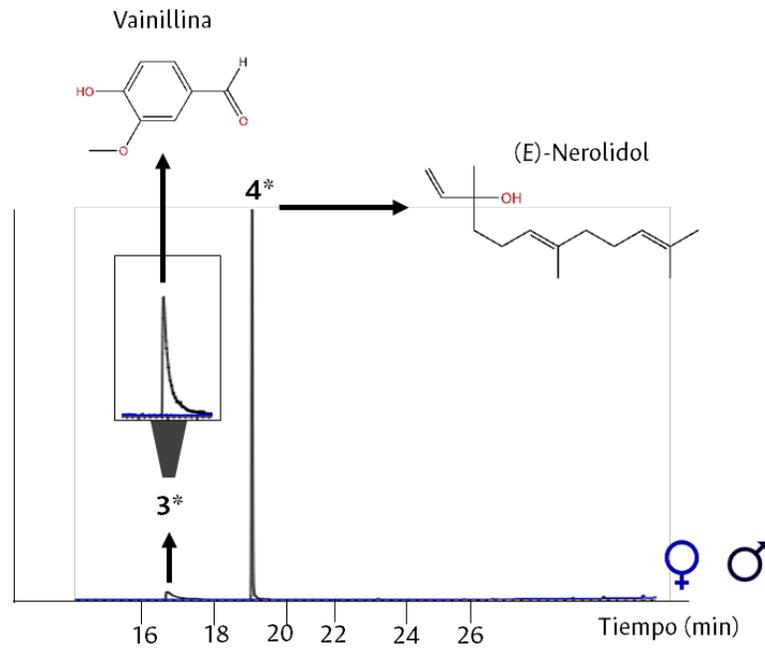


Figura 3.6. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción directa con diclorometano en muestras de alas de machos (♂) y hembras (♀) adultos de *Opsiphanes cassina* en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.1. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos.

Los compuestos **6** y **7**, que fueron detectados tanto en muestras de machos como de hembras, fueron identificados tentativamente como ácido palmítico y ácido oleico, respectivamente. La presencia de estos VOCs en extractos de los adultos de *O. cassina*, podría sustentarse debido a que han sido reportados como feromonas y aleloquímicos para varias especies de lepidópteros, encontrándose en algunos casos de manera simultánea los dos ácidos grasos como semioquímicos de una misma especie. El ácido oleico ha sido identificado como uno de los constituyentes de la feromona sexual producida por hembras de *Telchin licus* Drury, 1773 (= *Castnia licus*) (Lepidoptera: Castniidae).¹⁷⁷ También se ha reportado como cairona en árboles de almendros, pistachos y nueces, ya que atrae y estimula la oviposición del insecto-plaga *Amyelois transitella* Walker 1863 (Lepidoptera: Pyralidae).¹⁷⁸ Por su parte, el ácido palmítico ha sido identificado en extractos de glándulas androconiales de abdomen, alas y penachos de machos de siete especies del género *Amauris* (Lepidoptera: Danaidae), mostrando actividad como feromona sexual.¹⁷⁹ En el caso de la especie *Eldana saccharina* Walker, 1865 (Lepidoptera: Pyralidae), se encontraron ácido palmítico y oleico como constituyentes de la feromona sexual producida por el macho.¹⁷⁷ En otro estudio, se reportó que la polilla parasítica de abejas *Acherontia atropos* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Sphingidae) produce ácido oleico y palmítico para camuflarse y lograr entrar en los panales sin ser detectada por las abejas obreras, mostrando la acción de estos compuestos como alomonas.¹⁸⁰ En el caso de la especie *O. cassina*, al encontrarse presentes tanto en muestras de hembras como de machos, es posible que estos 2 VOCs actúen como aleloquímicos mediando la comunicación con otras especies presentes en el cultivo de palma de aceite.

Al analizar las muestras de extracción por *head-space*, se observa en general, un menor número de VOCs respecto a los obtenidos por extracción directa; en los extractos obtenidos por HSD solo se detectó un VOC, el compuesto **4**, presente exclusivamente en machos (**Tabla 3.2** y **Figura 3.7**).

Tabla 3.2. VOCs detectados en muestras de extracción por HSD de adultos de *Opsiphanes cassina* por CG-EM, bajo condiciones de laboratorio. *

No.	Compuesto	Fuente	IR		Porapak - Hexano	
			Exp	Lit/Std	M	H
1	(E)- β -Ocimeno	EM	1043	1050		
2	(E)- β -Farneseno	EM	1451	1458		
3	Vainillina	Std	1404	1399		
4	(E)-Nerolidol	Std	1563	1575	X	
5	(Z)-7-Heptadeceno	Std	1675	1673		
6	Ácido palmítico	EM	1963	1984		
7	Ácido oléico	EM	2148	2144		

*La X indica que el compuesto fue detectado en esa muestra. En Fuente, Std=identificado con base en el índice de retención y el espectro de masas con un patrón de referencia, EM=detectado y propuesto de acuerdo con el índice de retención y el espectro de masas reportado en la literatura; IR=índice de retención, Exp= IR experimental, Lit= IR reportado en Pherobase¹⁵ con la misma columna, Std= IR del patrón; M=machos, H=hembras.

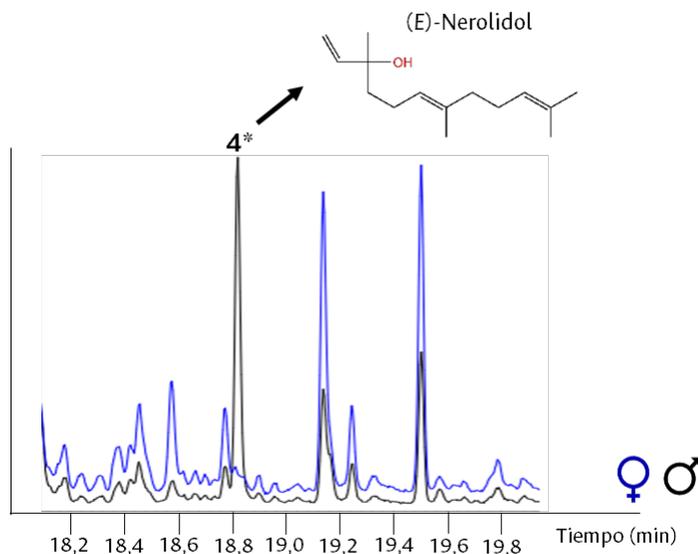


Figura 3.7. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción por HSD con Porapak-Hexano en muestras de machos (♂) y hembras (♀) adultos de *Opsiphanes cassina* en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.2. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos.

Por su parte, en las muestras de HS-MEFS se detectaron los compuestos **1** y **4**, encontrando que el VOC **1** sólo fue extraído por ese método y se encuentra tanto en muestras de machos como de hembras, mientras que el VOC **4**, al igual que en las otras extracciones se detectó como macho-específico (Tabla 3.3 y Figura 3.8).

Tabla 3.3. VOCs detectados en muestras de extracción por HS-MEFS de adultos de *Opsiphanes cassina* por CG-EM, bajo condiciones de laboratorio.

No.	Compuesto	Fuente	IR		DVB/CWR/PDMS	
			Exp	Lit/Std	M	H
1	(E)-β-Ocimeno	EM	1043	1050	X	X
2	(E)-β-Farneseno	EM	1451	1458		
3	Vainillina	Std	1404	1399		
4	(E)-Nerolidol	Std	1563	1575	X	
5	(Z)-7-Heptadeceno	Std	1675	1673		
6	Ácido palmítico	EM	1963	1984		
7	Ácido oléico	EM	2148	2144		

La X indica que el compuesto fue detectado en esa muestra. En Fuente: Std=identificado con base en el índice de retención y el espectro de masas con un patrón de referencia, EM=detectado y propuesto de acuerdo con el índice de retención y el espectro de masas reportado en la literatura; IR=índice de retención, Exp= IR experimental, Lit= IR reportado en Pherobase¹⁵ con la misma columna, Std= IR del patrón; M=machos, H=hembras.

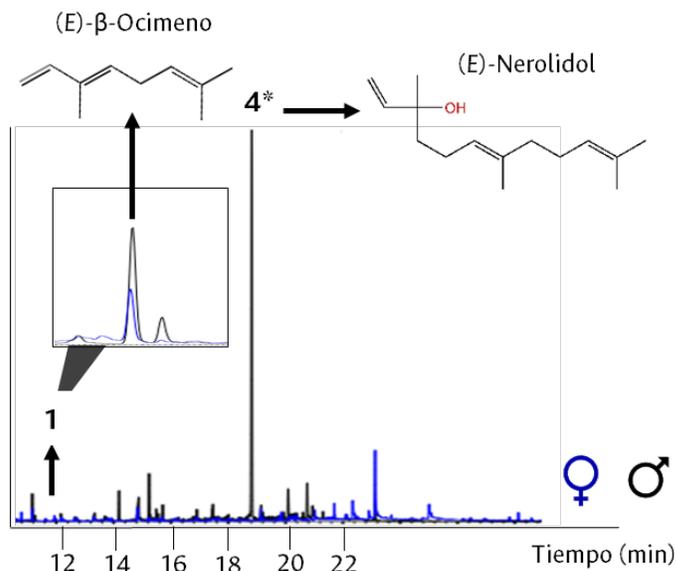


Figura 3.8. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs detectados por extracción por HS-MEFS en muestras de machos (♂) y hembras (♀) adultos de *Opsiphanes cassina* en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.3. El * indica que el compuesto solo se encuentra en muestras de machos.

El VOC 1 fue identificado tentativamente como (E)-β-ocimeno. Este monoterpeneo ha sido reportado ampliamente en la fracción volátil de varias especies de plantas, siendo liberado por las hojas en respuesta a la alimentación de insectos o por las flores para atraer polinizadores.^{181,182} Igualmente, se ha reportado como semioquímico de diferentes insectos, entre ellos llama la atención el estudio realizado sobre la especie *Heliconius melpomene* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae), donde se encontró que las glándulas odoríferas abdominales de los machos contenían (E)-β-ocimeno, indicando que posiblemente actuaba como componente de la feromona sexual. Sin embargo, al realizar estudios comportamentales los autores determinaron que este compuesto realmente actuaba como feromona antiafrodisiaca, ya que es transferido a las hembras durante la cópula, generando que las hembras apareadas no fueran atractivas para el cortejo con otros machos.¹⁸³ Por otro lado, este compuesto fue reportado en muestras de machos y hembras de *Opsiphanes invirae* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae), especie que pertenece al mismo género que *O. cassina* y que también es insecto-plaga de la palma de aceite;² sin embargo, en ese reporte no se estableció ninguna función para este VOC, ya que en evaluaciones de CG-FID-EAG no generó respuesta en antenas de las hembras.²

Al comparar los resultados obtenidos por las tres metodologías de extracción empleadas (Tabla 3.4), se determinó que, de los siete VOCs detectados, cuatro lo fueron solamente en muestras de machos. Igualmente, se observó que, a través de la extracción directa con solvente, se obtuvo no solo el mayor número de compuestos, sino que además fue la única metodología con la que se detectaron todos los VOCs macho-específicos. Esto se debe a que en esta técnica la cantidad que logra extraerse es sustancialmente mayor a la que se obtiene con las técnicas de *head-space*, sin embargo, es importante considerar que la proporción de compuestos en los extractos de glándulas puede ser sustancialmente diferente de su representación relativa en la feromona transportada por el aire, que es la señal química real que el insecto receptor percibe naturalmente,¹⁸⁴ por lo que la información obtenida por HS resulta igualmente importante. En este caso, los resultados de las muestras de HS-MEFS y HSD permitieron confirmar que el VOC 4, es el compuesto macho-específico mayoritario.

Tabla 3.4. VOCs liberados por adultos de *Opsiphanes cassina* extraídos mediante HS-MEFS, HSD y extracción directa con solvente bajo condiciones de laboratorio. *

No.	Compuesto	IR		Metodología de extracción											
				Directa con solvente								HSD		HS-MEFS	
		Exp	Lit/Std	Hexano				Diclorometano				Porapak - Hexano		DVB/CWR /PDMS	
				Alas		Abdomen		Alas		Abdomen					
M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H				
1	(E)- β -Ocimeno	1043	1050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2	(E)- β -Farneseno	1451	1458	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Vainillina	1404	1399	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-
4	(E)-Nerolidol	1563	1575	+++	-	++	-	++++	-	++++	-	+	-	+	-
5	(Z)-7-Heptadeceno	1675	1673	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Ácido palmítico	1963	1984	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Ácido oléico	2148	2144	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

*IR=índice de retención, Exp= IR experimental Lit= IR reportado en Pherobase¹⁵ con la misma columna, Std= IR del patrón; M=machos, H=hembras; Cantidad relativa calculada a partir del área del pico por CG-EM (%): - = No detectado, + < 5 %, ++ entre 5 - 10 %, +++ entre 10 - 15 %, ++++ >15 %.

En cuanto a los VOCs específicos de la especie, fue posible detectar e identificar tres compuestos, que posiblemente hacen parte de la feromona sexual liberada por machos adultos de *O. cassina*: la vainillina (3), el (E)-nerolidol (4) y el (Z)-heptadeceno (5). Adicionalmente, el (E)- β -farneseno (2) también fue detectado como VOC macho-específico, sin embargo, en el presente estudio solo se realizó una identificación tentativa. Los cuatros compuestos mencionados previamente, han sido reportados como de origen natural, en plantas y/o animales. A continuación, se profundizará en el análisis para la identificación de los VOCs 3, 4 y 5.

(E)-Nerolidol (4)

El VOC 4, que corresponde al compuesto mayoritario, se identificó como el sesquiterpeno (E)-nerolidol. En el espectro por IE a 70 eV (Figura 3.9), se alcanza a observar el pico de ion molecular [M]⁺ en m/z 222 que coincide con el peso molecular de este sesquiterpeno. La señal en m/z 204 concuerda con el fragmento [M - HOH]⁺, característico de la pérdida de agua en un alcohol terciario por medio de una trasposición 1,4 de hidrógeno, mientras que el ion fragmento en m/z 189 es el producto de la pérdida de un grupo metilo a partir del ion fragmento m/z 204 [(M - HOH)⁺ - CH₃]⁺. En m/z 69 se observa un pico base característico de la fragmentación de sesquiterpenos, que corresponde el grupo isoprenil [-CH₂CHC(CH₃)₂]⁺. El nerolidol es un sesquiterpeno presente en el aceite esencial de la parte aérea de muchas plantas aromáticas y presenta una amplia gama de actividades biológicas.¹⁸⁵ El isómero *trans* (E) se ha identificado como cairomona en cuatro plantas hospederas (*Lycopersicon esculentum*, *Capiscum annum*, *Datura wrightii*, *Proboscidea parviflora*) de la especie *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae).¹⁸⁶ Por su parte, el isómero *cis* (Z) ha sido identificado como cairomona de plantas de arroz (*Oryza sativa*), actuando como atrayente de dos especies simpátricas que atacan el cultivo *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée, 1854) y *Marasmia patnalis* Bradley, 1981 (Lepidoptera: Pyralidae).¹⁸⁷ En cuanto a reportes como feromona de lepidópteros, se encuentra el estudio de la especie *O. invirae*, que también es insecto-plaga de la palma de aceite. En ese reporte se

encontró que el (E)-nerolidol es uno de los VOCs que constituye la feromona sexual que produce el macho ya que en los ensayos de EAG fue detectado por la antenas de las hembras y en pruebas de campo generó una captura eficiente de adultos en combinación con cebos alimenticios.² Es importante mencionar que el (E)-nerolidol presenta dos estereoisómeros, para determinar cuál de ellos (o sí ambos), es liberado por los machos de esta especie debe realizarse posteriormente un análisis con una columna quiral.¹⁸⁸

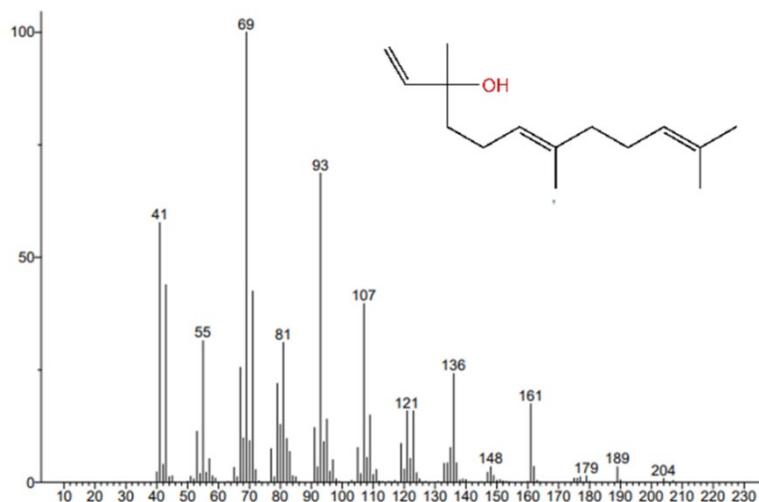


Figura 3.9. Espectro de masas por IE a 70 eV del compuesto macho-específico (E)-nerolidol (4) liberado por *Opsiphanes cassina*.

Respecto a cómo el insecto produce el (E)-nerolidol al considerar las rutas biosintéticas que se han reportado para los lepidópteros no sería posible proponer la biosíntesis endógena, sino que se sugiere que el insecto debe tomar de la planta hospedera el compuesto o un precursor presente en ella. Existen importantes discusiones en torno a la posibilidad de que los insectos pueden usar compuestos obtenidos directamente de la planta huésped como fuente de feromonas. En una revisión reciente, se reporta que hay tres formas en que la dieta puede contribuir a las diferencias cuantitativas y/o cualitativas en una señal química.¹⁸⁹ En primer lugar, la producción de feromonas puede verse influenciada por la calidad de la dieta y la acumulación de macro o micro nutrientes.^{190,191} En estos casos, los individuos que consumen una dieta de alta calidad generalmente aumentan la producción de feromonas, lo que genera una señal más llamativa y/o atractiva.¹⁹² En segundo lugar, los componentes de la feromona que no se pueden sintetizar completamente por vía endógena, se obtendrán de fuentes dietéticas y luego serán transformadas o incorporadas directamente a la feromona.¹⁹³ Estos componentes se denominan precursores, y la producción de una feromona dependerá principalmente, si no totalmente, de la dieta (es decir, sin la obtención dietética del precursor de feromonas, la producción de sus sustituyentes será limitada o no estará disponible).¹⁹⁴ Por último, la dieta puede influir más directamente en el perfil de la feromona o la mezcla distintiva, determinando los VOCs presentes y sus relaciones relativas, lo que puede tener consecuencias para los sistemas de reconocimiento que se basan en el emparejamiento de fenotipos o los mecanismos de autorreferencia.¹⁹⁵ Es importante considerar, además, que las señales químicas producidas por las plantas, que tienen un efecto sobre el comportamiento de los insectos, se basan en el mismo principio que las feromonas. Los insectos responden a una mezcla específica de

concentraciones y proporciones definidas, las cuales evolucionan con el desarrollo de la planta y la periodicidad diaria. Esto implica que, por ejemplo, los VOCs (o proporción) que produce la planta huésped en la etapa de germinación son distintos a los producidos en la etapa de floración. En este sentido, las diferentes fases de desarrollo de la planta pueden actuar de forma distinta sobre el comportamiento de los insectos, regulando funciones como la ubicación del huésped, el apareamiento y la oviposición.¹⁹⁶ Adicionalmente, otros factores ambientales que pueden influir en las señales químicas incluyen la temperatura, la humedad y la presión barométrica al igual que las influencias específicas de la población, como la densidad.^{197,198,199}

Al realizar la comparación de los perfiles cromatográficos de los VOCs liberados por los adultos en presencia y ausencia de hojas de la planta hospedera, se encontró que el (E)-nerolidol, no se detectó en la muestra con foliolos de la palma de aceite, sino que solo estaba presente en la de los machos o está en cantidades por debajo del límite de detección analítico empleado (**Figura 3.10**). Si bien estos resultados sugieren que el insecto no obtiene directamente el compuesto de la planta hospedera, es posible que tome un precursor para sintetizar la señal química.

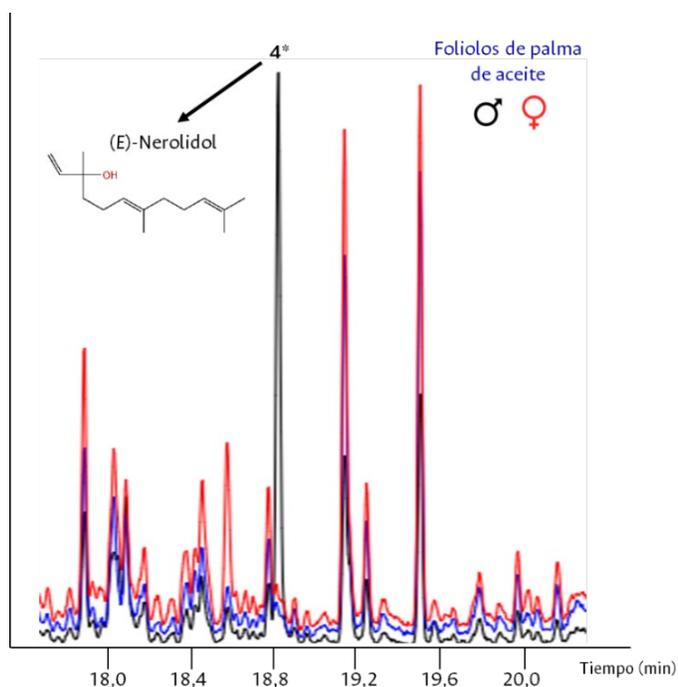


Figura 3.10. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs liberados por machos (♂) y hembras (♀) adultos de cría de *Opsiphanes cassina* en presencia de foliolos de palma de aceite, en una columna HP-5. Los números corresponden con los de la Tabla 3.4.

Este fenómeno, donde se presume que el insecto usa como precursores de su feromona algunos de los componentes producidos por la planta hospedera, ha sido observado en varias especies de lepidópteros, entre ellas, en otra plaga de palmas, la especie *Paysandisia archon* (Burmeister, 1880) (Lepidoptera, Castniidae). Este insecto pertenece a una familia que presenta algunos aspectos ecológicos que llaman la atención, pues aunque se encuentra filogenéticamente asignado como polilla, presenta hábitos y características similares a las mariposas, entre ellos el hecho de que los machos sean los responsables de realizar el llamado para atraer a las hembras, combinando comportamientos de cortejo con la liberación de feromonas.^{200,201} El

estudio sobre la feromona de *P. archon*, llevó a la identificación de tres VOCs macho-específicos el (Z,E)-farnesal, el isómero E,E correspondiente y el (E,Z)-2,13-octadecadienol, los cuales provocaron respuestas significativas de GC-EAD en antenas de hembras.²⁰¹ Los farnesales se encontraron únicamente en las alas anteriores y posteriores de los machos y solo generaron respuesta en antenas de hembras. Por su parte, el dienol fue detectado en secciones glandulares presentes en las patas de los machos, pero desencadenó respuestas significativas tanto en antenas de hembras como de machos.²⁰¹ En este caso, tampoco fue posible proponer la biosíntesis total de los farnesales por parte del insecto, por lo que también se sugiere que existe una fuerte influencia de la planta hospedera sobre la señalización química de la especie. Al revisar los reportes sobre los VOCs presentes en hojas de especies de palmas (familia Aracaceae), se encuentran monoterpenos como α - y β -pineno, 3-careno, limoneno, linalool, β -ocimeno y terpinoleno, al igual que los sesquiterpenos α -farneseno y farnesol.²⁰² Teniendo en cuenta lo anterior, sería posible sugerir que los insectos durante el estadio larval toman y almacenan algunos de estos compuestos y posteriormente los adultos los usan como precursores para la producción de algunos de los VOCs que median su conducta sexual.¹⁹³ Es importante notar que especies de familias filogenéticamente distantes (Nymphalidae y Castniidae) al estar asociadas a plantas hospederas de la misma familia, presentan características estructurales similares en algunos de los componentes de sus semioquímicos.

Vainillina (3)

El VOC 3 fue identificado como el aldehído fenólico vainillina. En el espectro de masas por IE a 70 eV (**Figura 3.11**) se observa el pico de ion molecular m/z 152, que coincide con el peso molecular. A su vez los picos en m/z 151 y m/z 123 coinciden con la pérdida de H y CO, respectivamente, las cuales son características para aldehídos. La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) no solo es una molécula importante en el sector de sabores y aromas, sino que además es de interés debido a su relación biogenética con la ruta de los fenilpropanoides en plantas y con otras moléculas de importancia fisiológica en la naturaleza.²⁰³ Adicionalmente, se le ha reportado actividad como atrayente para insectos de los órdenes Coleoptera, Heteroptera, Hymenoptera y Lepidoptera. Aunque la estructura de este compuesto no coincide con las rutas de biosíntesis reportadas para VOCs producidos por lepidópteros, ha sido reportado como feromona para algunas especies de la familia Pyralidae (Lepidoptera), entre ellas *Tirathaba mundella* Walker, 1864, insecto que también es plaga de la palma de aceite. La vainillina junto con el (3S,6S)-2,2,6-trimetil-6-viniltetrahidro-piran-3-ol fueron detectados en muestras de extracción directa de alas de machos, y al ser evaluados en campo generaron una atracción significativa de hembras.²⁰⁴

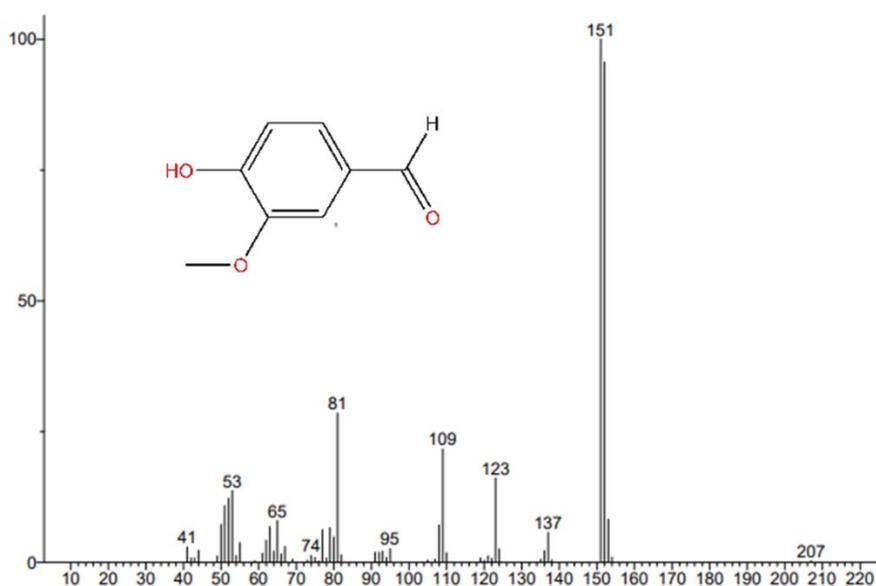


Figura 3.11. Espectro de masas por IE a 70 eV del compuesto macho-específico vainillina (**3**) liberado por *Opsiphanes cassina*.

(Z)-7-Heptadeceno (**5**)

El VOC **5** fue identificado como el hidrocarburo monoinsaturado (Z)-7-heptadeceno. En el espectro de masas por IE a 70 eV (**Figura 3.12**), se presenta el pico de ion molecular en m/z 238, e igualmente se observan picos separados por 14 unidades de masa que representan la pérdida de (CH₂)_n (por ejemplo, m/z 97 → m/z 83 → m/z 69 → m/z 55), característicos de cadenas de hidrocarburos monoinsaturados con más de 15 unidades de carbono. Este tipo de compuestos ha sido reportado como feromona tipo I en lepidópteros y se propone que se producen por biosíntesis de ácidos grasos saturados a partir de la Acetil coenzima A, seguida de modificación de cadena mediante desaturación.^{122,123,124} El (Z)-7-Heptadeceno ha sido reportado como parte del perfil volátil de algunas especies de algas marinas y como feromona de algunas especies de ácaros.^{205,206} Adicionalmente, fue reportado como VOC macho-específico en el estudio de la feromona sexual de *O. invirae*, especie que, como se mencionó anteriormente, también es plaga de la palma de aceite y al realizar la evaluación por EAG, el compuesto generó respuesta positiva en las antenas de las hembras y en prueba de campo altas capturas de adultos en combinación con cebos alimenticios.²

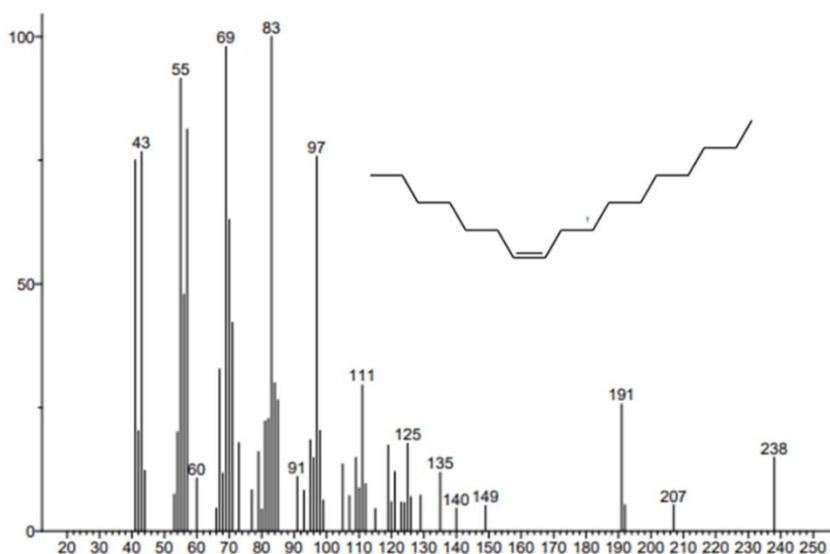


Figura 3.12. Espectro de masas por IE a 70 eV del compuesto macho-específico (Z)-7-heptadeceno (5) liberado por *Opsiphanes cassina*.

Por su parte, en cuanto a reportes para el (E)- β -farneseno (2), este sesquiterpeno ha sido identificado en secreciones de larvas de lepidópteros de la familia Papilionidae, actuando como mecanismo de defensa contra depredadores.²⁰⁷ También ha sido reportado como cairomona de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Tortricidae), encontrando en ensayos de túnel de viento que mejora la respuesta de los machos hacia la feromona producida por la hembra.²⁰⁸ Adicionalmente, este VOC también fue identificado como constituyente de la feromona sexual macho-específica de *O. invirae*, junto al (E)-Nerolidol y al (Z)-7-Heptadeceno.²

Se ha reportado que la proporción de los componentes en las feromonas de los insectos puede variar drásticamente dentro de poblaciones de la misma especie, especialmente en aquellas con amplios rangos de distribución. Esta disimilitud geográfica puede tener una base genética o deberse procesos de selección natural o sexual; sin embargo, la base evolutiva de tal divergencia aún no está clara.^{209,210} Debido a que tanto la composición química de la mezcla de feromonas como la proporción de los componentes es crucial para la respuesta del insecto receptor, y que muchos lepidópteros-plaga presentan una amplia distribución, es importante evaluar el factor geográfico.^{211,212,213} Como ejemplo, en un estudio realizado sobre el insecto-plaga del cultivo de la granada *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Pyralidae) en Irán, se observó que la feromona sexual producida por la hembra presenta variación en la proporción de los 3 componentes que la constituyen ((Z,E)-9,11,13-tetradecatrienal, (Z,E)-9,11-tetradecadienal y (Z)-9-tetradecenal), en poblaciones de adultos de 10 ciudades de diferentes provincias. Las proporciones encontradas fueron 10: 2,5: 2,1 (trienal: dienal: monoenal) en Kuhdasht, 10: 1,3: 0,7 en Tarom, 10: 1,3: 0,5 en Bajestan, 10: 1,2: 1 en Sorkheh, 10: 1,1: 0,9 en Ferdows, 10:0,9:1 en Neyriz, 10:0,9:0,9 en Khash y Meybod, 10:0,9:1,4 en Saveh, 10:0,5:1 en Behshahr, y 10:0,45:0,43 en Shahrreza.²¹⁴ En el mismo estudio se evaluó la respuesta de los adultos en un túnel de viento, observando que los machos preferían a las hembras de la misma área respecto a hembras de otras

regiones geográficas,²¹⁴ indicando que para esta especie existe una variación intraespecífica en la feromona tanto en el emisor como en el receptor de la señal.

En el caso de *O. cassina*, este insecto-plaga se encuentra tanto en la zona Oriental (departamento del Meta) como en la zona Sur Occidental (departamento de Nariño) de cultivos de palma de aceite en Colombia; estas locaciones además de presentar diferencias en las condiciones ambientales, presentan diferentes variedades de siembra. En el caso de la zona Oriental, la mayoría de cultivos corresponden a siembras de *Elaeis guineensis*, mientras que en la zona Sur Occidental se presentan principalmente híbridos interespecíficos OxG. Para realizar una aproximación al efecto que puede tener la ubicación geográfica en el perfil de los VOCs emitidos por adultos de *O. cassina*, se compararon los perfiles cromatográficos de muestras de extracción directa obtenidas de adultos de ambas zonas palmeras. En este ensayo, en las muestras de hexano, para ambas poblaciones solo se detectó como VOC macho-específico el (E)-nerolidol, encontrando que se presenta en mayor concentración en muestras de machos de zona Oriental, respecto a los de la zona Sur Occidental (**Figura 3.13**). Por su parte, al comparar las muestras de diclorometano, se detectó tanto (E)-nerolidol como vainillina (**Figura 3.13**), encontrando que en la población de zona Oriental hay una mayor proporción^{2*} de (E)-nerolidol (89,8 %), mientras que en la población de zona Sur Occidental, el VOC que se encuentra en mayor proporción es la vainillina (61,1 %). Estos resultados sugieren que existe una variación geográfica en la proporción de componentes de la feromona sexual emitida por machos adultos de *O. cassina*.

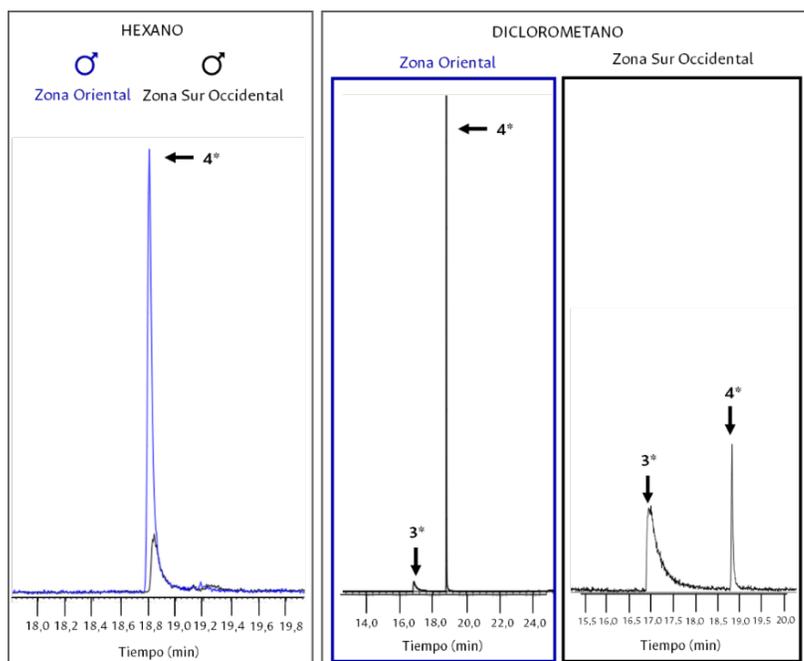


Figura 3.13. Cromatogramas de iones totales (TIC) de los VOCs presentes en muestras de extracción directa de alas con hexano y diclorometano de machos de *Opsiphanes cassina* de dos poblaciones geográficas diferentes en una columna HP-5.

^{2*} Las proporciones de los compuestos se calcularon a partir de las áreas de los picos de los cromatogramas de iones totales (TIC), de modo que el total de las áreas de los picos de interés fue igual al 100 %.

Entre los mayores desafíos de las ciencias naturales modernas, se encuentra la integración de enfoques multidisciplinarios para comprender la complejidad organizativa y funcional de los sistemas biológicos en diferentes jerarquías, desde los mecanismos moleculares subcelulares (microscópicos) hasta las interacciones funcionales de las comunidades ecológicas (macroscópicas).²¹⁵ La interacción planta-insecto es un buen modelo para este propósito, ya que dispone de una enorme cantidad de información y estudios a nivel molecular y ecosistémico. Entre ellos, las investigaciones sobre las señales químicas de los insectos que se alimentan de plantas son de especial interés porque muchos herbívoros utilizan metabolitos secundarios (aleloquímicos) que las plantas producen como defensas antiherbívoros, para regular comportamientos tan importantes como el apareamiento.²¹⁶ Esta capacidad de los insectos para secuestrar las defensas de las plantas para su propio beneficio, es uno de los ejemplos más interesantes de interacciones tróficas en la naturaleza, que demuestran como la adaptabilidad desencadena un desarrollo coevolutivo.²¹⁷ En este escenario, no se puede olvidar que la señalización sexual en estos artrópodos exhibe a su vez, una alta plasticidad fenotípica, lo que hace que los comportamientos mediados por semioquímicos sean también altamente susceptibles a cambios a las condiciones del entorno, incluyendo factores ambientales bióticos y/o abióticos, o a cambios en la ubicación geográfica o la densidad poblacional, que pueden inducir variaciones interespecíficas.^{210,218} Pese a ello, y aun cuando exista una fuerte influencia de variables exógenas, la composición de la mezcla que constituye una feromona es específica de la especie en una población dada, lo que la convierte en una fuerza importante en el aislamiento reproductivo y la especiación. Por esto, la identificación de las estructuras químicas y la composición de las mezclas de feromonas es la base para comprender la comunicación química y su papel en la evolución de la ecología.²¹⁹

3.3. Conclusiones

- Por primera vez se identificaron los compuestos orgánicos volátiles vainillina, (E)-nerolidol y (Z)-7-heptadeceno en macho adultos de *O. cassina*, insecto-plaga del cultivo de palma de aceite. Estos VOCs podrían mediar la comunicación química de los adultos y actuar como semioquímicos de la especie, específicamente como componentes de su feromona sexual.
- A partir de la evaluación de tres metodologías de extracción, se estableció que la extracción directa con solvente permitió detectar los tres VOCs macho-específicos identificados.
- A través de las tres metodologías de extracción evaluadas fue posible confirmar que el (E)-Nerolidol es el compuesto mayoritario liberado por los machos de *O. cassina*.
- Los tres VOCs macho-específicos fueron identificados en extractos obtenidos en el horario crepuscular, lo que podría indicar que la liberación de la feromona se da como parte de la conducta de llamado de los machos.
- Se estableció que la ubicación geográfica de los cultivos de palma de aceite de donde provienen los insectos, podría influir en la proporción de los VOCs liberados por los machos adultos de *O. cassina*.

Capítulo 4. Evaluación de la respuesta de adultos de *Opsiphanes cassina* frente a los VOCs macho-específicos identificados

La detección de compuestos químicos presentes en el ambiente y el posterior procesamiento de la información subyacente, es probablemente la forma más antigua que tiene un ser vivo para percibir el mundo exterior y establecer con otros organismos diferentes niveles de interacción.²²⁰ En el caso de la comunicación intraespecífica en insectos, la efectividad con la que un estímulo olfativo transmite información entre dos individuos, dependerá, entre varios factores, de que exista un receptor capaz de detectar y diferenciar la señal recibida y de que posteriormente se desencadene una respuesta, fisiológica y/o conductual, en el organismo.²²¹

En este capítulo se presentan los resultados de la evaluación preliminar de la respuesta de los adultos de *O. cassina* frente a los tres VOCs identificados como macho-específicos de la especie en el capítulo 3, bajo condiciones de laboratorio. Primero se presenta la evaluación electrofisiológica y luego, las respuestas de comportamiento a través del empleo de túnel de viento.

4.1. Metodología

4.1.1. Insectos

Para evaluar la respuesta de los adultos de *O. cassina* se obtuvieron insectos de cultivos comerciales de Puerto Gaitán, Meta (Plantación Sepropal, 4°16'02"N71°58'58"W) y del campo experimental Palmar de las Corocoras, Paratebuena, Cundicamarca (4°22'5.5"N73°10'16.9"W), que fueron colectados durante el mes de noviembre de 2022 y fueron trasladados al laboratorio en Bogotá. Las pupas y adultos se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio, como se indica en la sección 2.2.1. del Capítulo 2.

4.1.2. Evaluación de la respuesta de adultos de *O. cassina*

La evaluación de la respuesta electrofisiológica y conductual de los adultos de *O. cassina* frente a los diferentes estímulos olfativos fue realizada en el Laboratorio de Entomología del Centro de Investigación Tibaitatá de Agrosavia – Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. A continuación, se describe la metodología empleada para cada caso.

4.1.2.1. Evaluación de la respuesta electrofisiológica de adultos de *O. cassina*

Para la evaluación de la respuesta de hembras y machos adultos de *O. cassina* (de 9 a 10 días de edad), las antenas se extirparon cuidadosamente de la cabeza de los insectos con ayuda de microtijeras y se observaron en el estereoscopio. Para realizar las medidas de EAG, se empleó un electroanténografo marca Syntech y un electrodo tipo tenedor de plata donde la base de la antena se conectó al electrodo de referencia, mientras que la punta, de la que se cortaron algunos segmentos distales para lograr un mejor contacto, se conectó al electrodo de trabajo y se usó un gel eléctricamente conductor (Sigma Gel, Parker Laboratories, Fairfield, NJ, Estados Unidos) para cubrir los extremos en cada electrodo.² Para evaluar la respuesta de las antenas, se impregnaron rectángulos de papel de filtro (0,5 x 2,0 cm) con 10 uL de los tratamientos definidos en la **Tabla 4.1** y posteriormente se insertados en una pipeta Pasteur de vidrio. Esta pipeta se conectó al sistema generador de pulsos (StimulusController, Tipo CS-55, Syntech), donde el pulso “puff” que enviaba el estímulo era mantenido durante 0,5 s, con una corriente principal de aire humidificado continua (600 mL/min), usando un generador de flujo de aire controlado eléctricamente (CS-05, Syntech, Alemania). La señal EAG registrada con los electrodos era amplificada con un preamplificador de alta impedancia de entrada (Syntech, Hilversum, Países Bajos) y luego era analizada un sistema de procesamiento de señal basado en PC (IDAC-2, Syntech, Alemania) y un software de visualización (GC-EAD 2014 v1.2.5, Syntech, Alemania) (**Figura 4.1**).²²² Para determinar por cuánto tiempo era posible emplear la antena viva, se evaluó el cambio en la despolarización de las antenas a intervalos de 5 min durante 20 min, usando como estímulo el componente macho-específico identificado como mayoritario (nerolidol).²²³ Posteriormente, los estímulos se evaluaron sobre antenas de ambos sexos de *O. cassina* donde cada antena probada recibió estímulos de todos los tratamientos secuencialmente, dejando al menos 30 segundos entre estimulaciones sucesivas. Los datos se analizaron siguiendo un modelo ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey empleando el estadístico T como criterio de rechazo de la hipótesis nula (H_0 :no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos evaluados).

Tabla 4.1. Estímulos olfativos evaluados sobre adultos de *Opsiphanes cassina* por EAG.

Estímulo	Concentración
Hexano y diclorometano (controles -)	-
Extracto de alas de machos en hexano	15 adultos / 50 μ L
Extracto de abdomen de machos en hexano	15 adultos / 50 μ L
Extracto de alas de machos en diclorometano	15 adultos / 50 μ L
Extracto de abdomen de machos en diclorometano	15 adultos / 50 μ L
Nerolidol (Mezcla isómeros E:Z relación 1:1)	1 μ g/ μ L
(Z)-7-Heptadeceno	1 μ g/ μ L
Vainillina	1 μ g/ μ L

Como se observa, se seleccionaron como estímulos olfativos para los ensayos por EAG, además de los compuestos individuales, las muestras obtenidas a través de la metodología de extracción directa con solvente, a partir de las cuales se detectaron e identificaron los tres VOCs macho-específicos.

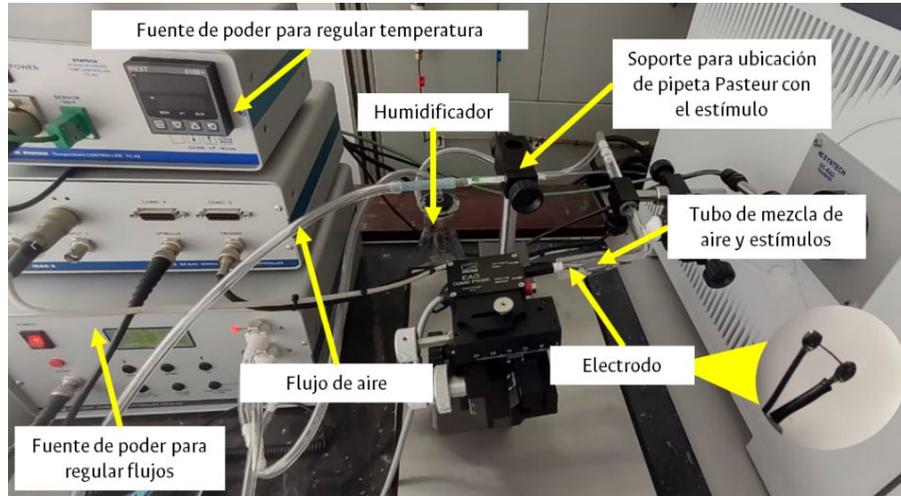


Figura 4.1. Montaje del sistema de electroantenografía empleado para la evaluación de la respuesta electrofisiológica de adultos de *Opsiphanes cassina*.

4.1.2.2. Evaluación de la respuesta comportamental de adultos de *O. cassina*

Las respuestas comportamentales de los adultos de *O. cassina* frente a los diferentes estímulos olfativos fueron evaluadas empleando un túnel de viento FDR 55 Fischbach Luft- und Ventilatorentechnik GmbH (Neunkirchen, Alemania). El equipo consistía en un túnel de acrílico inoloro (200 cm de largo × 65 cm de ancho × 65 cm de alto) acoplado a un sistema de filtros, ventilación y extracción. El flujo de aire era producido por una bomba de succión y purificado a través de un filtro de carbón activado. La velocidad del flujo de aire fue fijada a través de un anemómetro, y el aire de salida era expulsado hacia el exterior. La cámara de vuelo estaba separada de la cámara de barlovento por una malla de alambre fino con una malla de alambre adicional en el otro extremo. Los estímulos olfativos fueron colocados dentro del túnel de viento frente al extremo de entrada de aire, mientras que, los insectos receptores eran colocados al final del túnel (Figura 4.2).

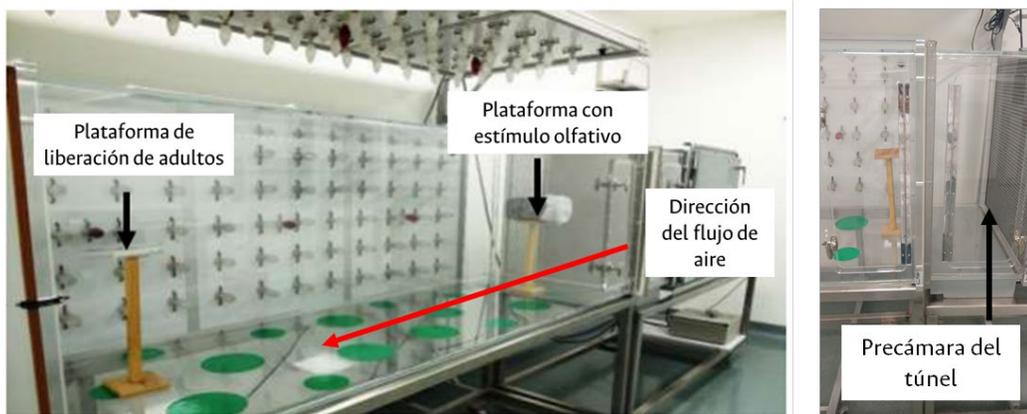


Figura 4.2. Montaje túnel de viento empleado para la evaluación de la respuesta comportamental de adultos de *Opsiphanes cassina*.

Cuando se emplearon machos como estímulo (control positivo), estos eran colocados en la precámara del túnel. Los ensayos fueron realizados en condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C), humedad relativa (68 ± 5 %), fotoperiodo (12h luz: 12h oscuridad) y flujo de aire ($50 - 55$ cm/s). Los insectos a evaluar se mantuvieron en un cuarto libre de olor bajo las condiciones previamente descritas, usando como fuente de alimento agua con azúcar. Dos horas antes de cada bioensayo fueron colocados en cajas plásticas y se privaron de alimentación. Los bioensayos fueron realizados durante las 2-5 primeras horas de la escotofase. Se empleó una luz roja atenuada para la observación de los experimentos, con el fin de no interferir con el comportamiento de los insectos. Para colocar la fuente de olor en cada ensayo, se utilizó un cuadrado de papel filtro ($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$) donde se colocaba la alícuota de las soluciones de los compuestos a evaluar. Fueron evaluados los tres VOCs identificados como macho-específicos (nerolidol, vainillina y (Z)-7-heptadeceno) a diferentes dosis (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2. Estímulos olfativos evaluados sobre adultos de *Opsiphanes cassina* en túnel de viento.

Estímulo	Dosis
Hexano (Control -)	-
Diclorometano (Control -)	-
Machos (Control +)	-
Nerolidol (Mezcla de isómeros E:Z relación 1:1) (solución $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en hexano)	10 μg
	100 μg
	1000 μg
	100 μL (puro)
(Z)-7-Heptadeceno (solución $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en hexano)	10 μg
	100 μg
	1000 μg
Vainillina (solución $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en diclorometano)	10 μg
	100 μg
	1000 μg

Antes de iniciar el ensayo, los papeles impregnados con las soluciones de los compuestos se dejaron evaporar por 10 segundos. En cada evaluación los insectos eran observados por un tiempo máximo de 15 min. Los adultos receptores tenían edades entre 1 y 11 días. Las observaciones se categorizaron en cuatro respuestas de comportamiento descritas a continuación y esquematizadas en la **Figura 4.3**.^{224,225}

- I. No moverse de la zona de salida.
- II. Despegar de la zona de salida aterrizando a más de 30 cm del estímulo olfativo.
- III. Realizar desplazamiento orientado hacia el estímulo olfativo aterrizando dentro de un radio de 30 cm a de la fuente.
- IV. Realizar desplazamiento orientado hacia el estímulo olfativo aterrizando en la fuente.

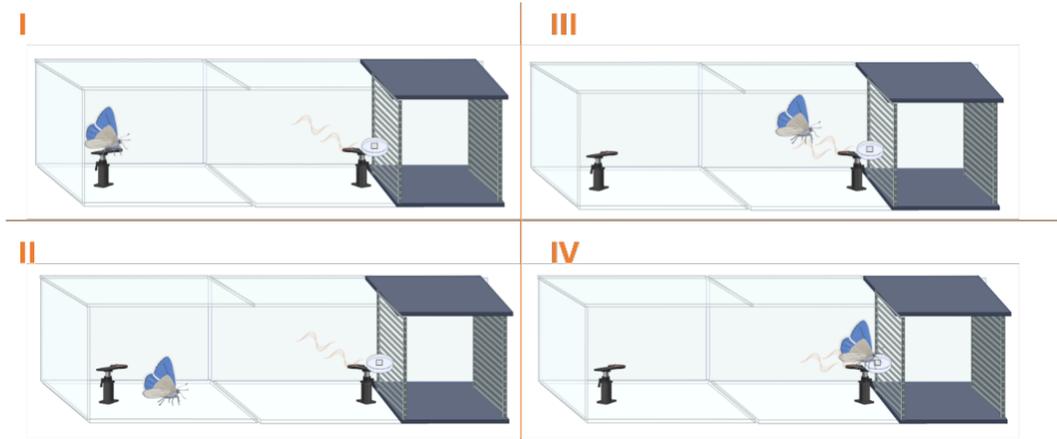


Figura 4.3. Esquema de las respuestas de comportamiento consideradas en la evaluación en túnel de viento.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Evaluación de la respuesta electrofisiológica de adultos de *O. cassina*

Las observaciones de las antenas de adultos de *O. cassina* en el estereoscopio, mostraron una morfología clavada o tipo maza, es decir, que los segmentos distales del flagelo, son mucho más gruesos que los segmentos más basales y al igual que para muchas especies de la familia Nymphalidae,²²⁶ no hay dimorfismo sexual (Figura 4.4).

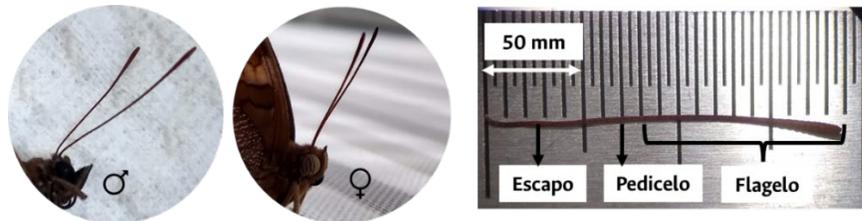


Figura 4.4. Morfología de antenas de adultos de *Opsiphanes cassina*. Fotos: J. Bustos.

Como se mencionó en el Capítulo 1, sección 1.2.1.2., el potencial negativo de las reacciones eléctricas de las dendritas en las células olfativas corresponde a la despolarización de la membrana del receptor. Se ha encontrado que la amplitud de la respuesta registrada en EAG, que se correlaciona con la frecuencia de los impulsos nerviosos generados, aumenta con concentraciones crecientes de un estímulo químico, y es sensible durante un periodo de tiempo, hasta que se alcanza un nivel de saturación.²²⁷ Para determinar por cuánto tiempo era posible emplear las antenas de *O. cassina*, se evaluó la respuesta frente al VOC mayoritario, debido a que ensayos preliminares fue el que generó una mayor despolarización en las antenas de las hembras (Figura 4.5). Luego de evaluar la respuesta de las antenas durante 20 min (Figura 4.6), se determinó que estas podrían ser empleadas hasta por 10 min luego de ser cortadas del insecto, ya que, para las cuatro antenas evaluadas, no hubo diferencias significativas entre las respuestas registradas a los 0, 5 y 10 min (Figura 4.7).

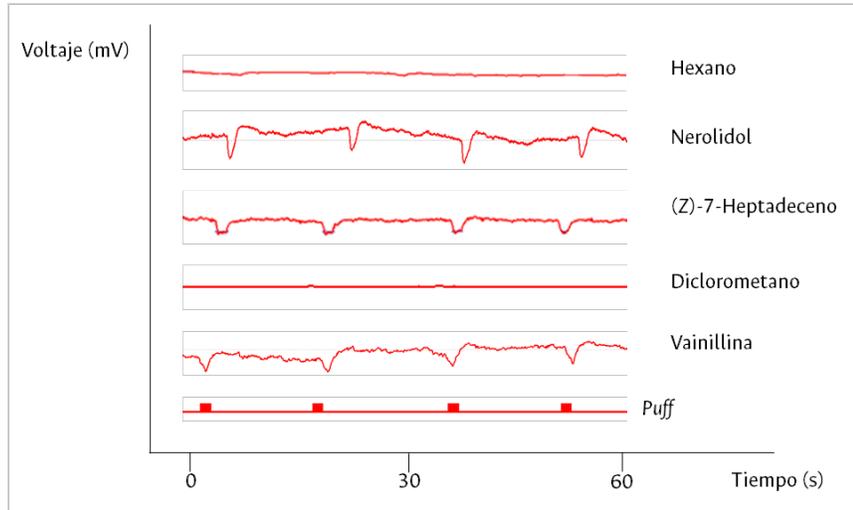


Figura 4.5. Respuestas EAG de la antena de una hembra de *Opsiphanes cassina* obtenida al evaluar mediante puffs los VOCs macho-específicos.

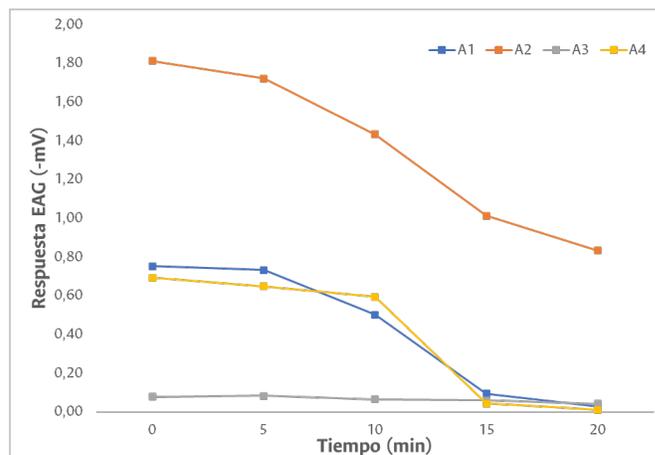


Figura 4.6. Tiempo de respuesta EAG de antenas de hembras de *Opsiphanes cassina* al VOC macho-específico mayoritario (A=antena, n=4).

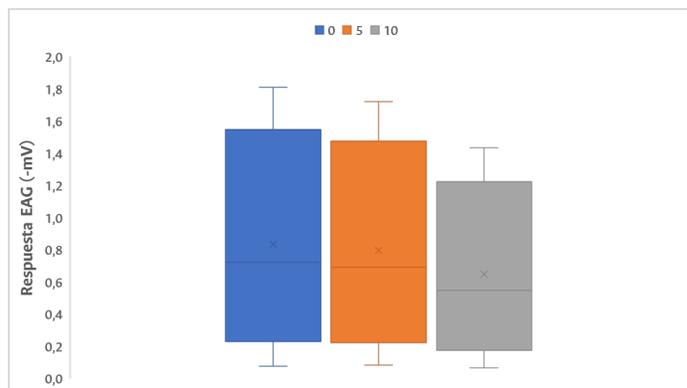


Figura 4.7. Respuestas EAG a 0, 5 y 10 minutos de las antenas de hembras de *O. cassina* frente al VOC macho-específico mayoritario. Se realizó un análisis ANOVA, concluyendo que no hay diferencias significativas entre las medias de las respuestas EAG para los tres tiempos evaluados con una confianza del 95 % ($p < 0,05$), ($F_{\text{experimental}} [0,088] < F_{\text{crítico}} [4,256]$).

Un estímulo de olor provoca una desviación negativa del potencial transepitelial, o potencial receptor, que aumenta relativamente rápido y disminuye más lentamente después del final del estímulo. La especificidad de una célula olfativa a los componentes de feromonas y compuestos relacionados puede verse afectada por varios factores en el proceso de transducción, incluidos diferentes tipos de aperturas de canales iónicos producidos por diferentes cambios conformacionales de la molécula receptora cuando interactúa con varios estímulos químicos. Cada célula sensorial en una sensilia posee su propia especificidad química para los componentes de las feromonas y cada una se puede distinguir por el tamaño del impulso nervioso que genera.²²⁷

En el caso de *O. cassina*, al evaluar los diferentes estímulos olfativos, se encontró que las antenas de los machos no presentaban respuesta frente a los tratamientos evaluados, mientras que las antenas de las hembras fueron estimuladas tanto por los extractos cuticulares como por los compuestos individuales macho-específicos (**Figura 4.8**), lo que sugiere que el nerolidol, la vainillina y el (Z)-7-heptadeceno podría actuar como semioquímicos detectados por las hembras. Sin embargo, se debe mencionar que se presentó una alta desviación en los datos obtenidos, y no hubo diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y los controles evaluados con una confianza del 95 %, por lo que se requiere realizar más experimentos de EAG con un mayor número de réplicas. En el **Anexo 3** se presentan las comparaciones de los valores F y T, del ANOVA y la prueba de Tukey, para cada caso.

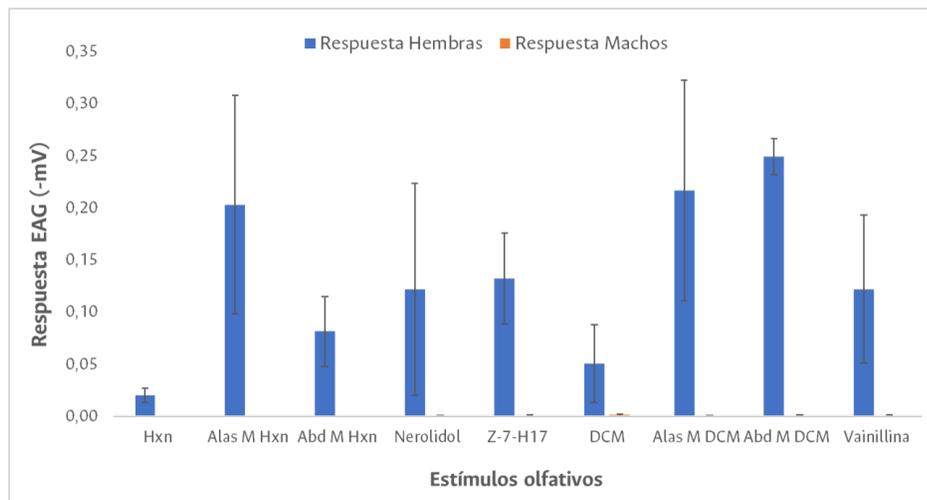


Figura 4.8. Respuestas EAG de las antenas de hembras y machos de *Opsiphanes cassina* frente a extractos cuticulares de machos y compuestos individuales macho-específicos (se presenta el promedio \pm desviación estándar de la respuesta de 3 antenas para cada sexo).

Es importante considerar que, la respuesta electrofisiológica es independiente de otros factores ambientales y neurales que afectan las respuestas conductuales, por lo que, para una dosis dada de un VOC particular que es detectado por el insecto, la antena generará una respuesta. Por el contrario, el hecho de que un compuesto provoque una respuesta por EAG de un insecto no implica que provoque una respuesta conductual particular.²²⁸ Esto se debe, a que el comportamiento es muy susceptible a los cambios en las condiciones ambientales y poblacionales.^{146,147,148,149,150,151,152}

4.2.2. Evaluación de la respuesta comportamental de adultos de *O. cassina*

Los resultados de la evaluación comportamental de adultos de *O. cassina* para el nerolidol, VOC macho-específico mayoritario, se muestran en la **Figura 4.9**, donde se presenta el porcentaje de adultos que respondió de acuerdo a las cuatro categorías comportamentales establecidas. Allí es posible apreciar que, bajo las condiciones evaluadas, no hubo una respuesta que indicara que las hembras fueran atraídas hacia los estímulos evaluados a las concentraciones probadas, ni tampoco hacia a los machos en llamado; en su lugar, se observó que los insectos permanecían en la zona de salida, o si despegaban de la zona de salida, aterrizaban a más de 30 cm del estímulo olfativo. Este mismo comportamiento fue observado para los otros dos VOCs macho-específicos (Ver **Anexo 4**).

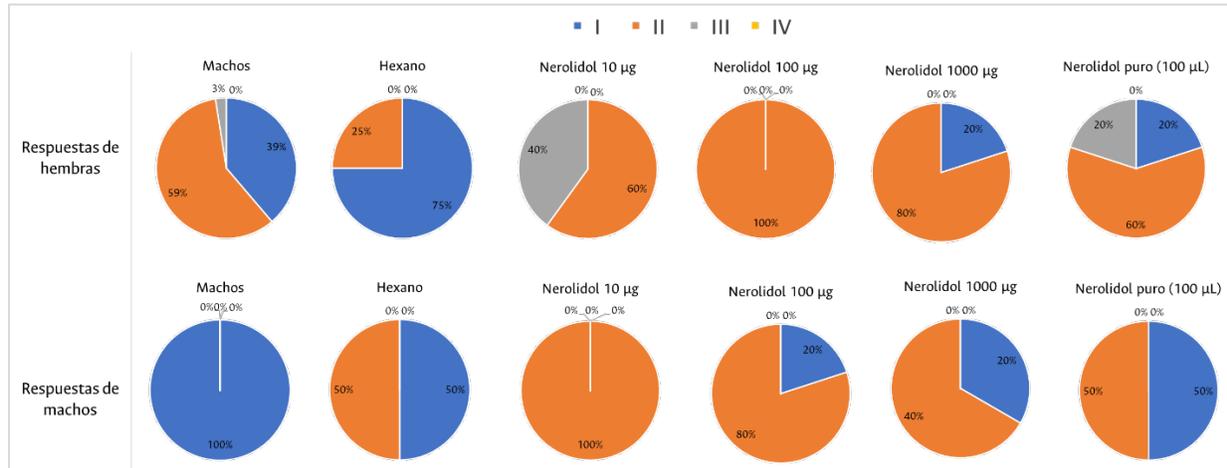


Figura 4.9. Respuesta comportamental de adultos de *Opsiphanes cassina* en bioensayo de túnel de viento, frente al VOC macho-específico mayoritario a diferentes dosis bajo condiciones de laboratorio.

Los resultados obtenidos pueden explicarse ya que, en las mariposas, cuando los machos encuentran una pareja potencial, el resultado no es siempre la ocurrencia de la cópula, sino que depende de la predilección (receptividad y elección) de las hembras. Las feromonas producidas por un macho proporcionan señales que contienen una gran cantidad de información mediante la cual las hembras pueden determinar su edad, salud y estado de madurez sexual y, por lo tanto, su atractivo; de esta manera, se puede elegir entre un grupo de pretendientes disponibles. Así, para un cortejo exitoso, la hembra debe responder positivamente al ramillete de señales químicas liberadas por el macho cuando se realiza el llamado.¹¹⁷ Igualmente, aunque los resultados no mostraron diferencias al cambiar la concentración, esta variable también tiene un efecto importante, ya que se requiere que el estímulo esté por encima del umbral requerido para que sea detectado por las atentas del insecto receptor y así este pueda orientarse hacia él;²²⁹ aunque la respuesta puede aumentar directamente con la concentración, llegará un punto dónde ocurra la saturación de los receptores olfativos y no habrá una respuesta orientada.^{230,231} Adicionalmente, como se mencionó en el Capítulo 2, sección 2.2.2., la capacidad del insecto para detectar las fuentes de alimento o las feromonas producidas por su pareja sexual, está fuertemente influenciada por el cambio en las condiciones ambientales. En este caso, aunque la temperatura y la humedad relativa fueron ajustadas a las condiciones ambientales naturales donde habita el insecto, la presión barométrica continuaba siendo considerablemente diferente. Por otro lado, se debe considerar que la conducta sexual en lepidópteros generalmente muestra un marcado ritmo

circadiano que es modulado por el fotoperiodo,²³² encontrando que cambios en este factor influyen en la conducta de llamado del insecto emisor, en la producción de las feromonas y/o en la respuesta del insecto receptor al estímulo.²³³ En el caso de insectos de hábito crepuscular como *O. cassina*, se debe considerar que si bien los niveles de luz ambiental durante ese periodo son al menos dos órdenes de magnitud más bajos que durante el día, hay un efecto de la luz disponible cuando se hacen exhibiciones de cortejo durante el llamado.¹¹⁷ En la evaluación de túnel de viento no fue posible simular esta condición, lo que también pudo tener efecto en la respuesta observada.

4.3. Conclusiones

- Se estableció que los VOCs vainillina, nerolidol y (Z)-7-heptadeceno, identificados previamente como macho-específicos de *O. cassina*, generan una respuesta electrofisiológica sobre las antenas de hembras adultas de la especie.

- Los resultados de la evaluación comportamental en túnel de viento indicaron que, bajo las condiciones de laboratorio empleadas, las hembras no son estimuladas por el llamado de los machos ni por los compuestos identificados como macho-específicos.

Capítulo 5. Conclusiones generales

- Por primera vez se realizó el estudio de la conducta sexual y la caracterización de los VOCs liberados por adultos de *Opsiphanes cassina*. Se identificaron tres compuestos macho-específicos: (E)-nerolidol, vainillina y (Z)-7-heptadeceno, como parte del comportamiento de llamado a las hembras durante el periodo crepuscular.
- La evaluación de los tres VOCs macho-específicos identificados, indicó que estos compuestos generan una respuesta electrofisiológica en las antenas de hembras de *Opsiphanes cassina*, lo que sugiere su función en la modulación del comportamiento sexual de la especie.
- Los semioquímicos identificados en este estudio podrían implementarse como estrategia para el monitoreo y control de *O. cassina* en cultivos de palma de aceite.

Perspectivas

- Realizar el estudio de comportamiento de la especie *Opsiphanes cassina* bajo condiciones de campo.
- Determinar cuál de los enantiómeros del (E)-nerolidol (o sí ambos), es liberado por los machos de esta especie y evaluar su efecto en la respuesta de los adultos.
- Confirmar que el cuarto compuesto macho-específico corresponde al (E)- β -Farneseno.
- Determinar la proporción en la que se encuentran los VOCs macho-específicos en la señal química liberada *Opsiphanes cassina*.
- Evaluar la respuesta de los insectos adultos de *Opsiphanes cassina* frente a los VOCs identificados bajo condiciones de campo con el objetivo de establecer su papel como componentes de la feromona macho-específica de la especie.
- Definir las condiciones requeridas para que los VOCs identificados en esta investigación puedan ser empleados en trampas para el monitoreo y control de *Opsiphanes cassina* en cultivos comerciales de palma de aceite.

Participación en congresos

- **Bustos-Cortés J.;** Chegwin-Angarita C.; Morales-Rodríguez A.; Aldana-De la Torre R.; Romero-Frías A. “Feromonas y hongos entomopatógenos para el manejo de *Opsiphanes cassina* (Lepidoptera: Nymphalidae) en palma de aceite”. 2° Simposio Universitario de Investigación en Química SUQUI. Universidad Antonio Nariño, Bogotá D.C., Colombia, 6 – 9 de junio de 2021. Virtual. Presentación oral.
- **Bustos-Cortés J.;** Chegwin-Angarita C.; Morales-Rodríguez A.; Aldana-De la Torre R.; Romero-Frías A. “Comunicación química entre el insecto-plaga *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae) y la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq., 1897)”. XX Conferencia Internacional sobre Palma de Aceite. Cartagena, Colombia, 26 – 30 de septiembre de 2022. Póster.
- **Bustos-Cortés J.;** Chegwin-Angarita C.; Morales-Rodríguez A.; Aldana-De la Torre R.; Romero-Frías A. “Identificación de semioquímicos para el manejo integrado del defoliador de la palma de aceite *Opsiphanes cassina* Felder, 1862 (Lepidoptera: Nymphalidae)”. 35° Congreso Latinoamericano de Química – 61° Congreso Brasileño de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 14 – 18 de noviembre de 2022. Póster.

Anexo 1. Permiso de colecta de insectos



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 resolutoria 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.

Que la Ley 29 de 1990, dicta disposiciones para el fomento de la investigación científica y el desarrollo tecnológico y dispone que corresponde al Estado promover y orientar el adelanto científico.

"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 resolutive 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 proveído, 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 1º del artículo 3º 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 2º del artículo 10º 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.

Que a su vez, el numeral 1º del artículo 14 del referido Decreto Ley asigna como función de la Subdirección de Instrumentos, Permisos y Trámites Ambientales de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales - ANLA, la de evaluar las solicitudes de permisos y

¹ Por medio del cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible"

"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, direccionando las mareas en las áreas afectadas.

Igualmente, se llevarán a cabo captura manual de insectos (cualquier estado), usando jarras y trampas de luz. Los individuos vivos se conservarán en jaulas y serán trasladados a los laboratorios de CENIPALMA con el fin de ser determinados y estudiar sus hábitos y ciclo de vida.

CONTROL NATURAL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES

"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 órdenes 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 asociados con el sistema vascular de las plantas afectadas.
- Adicionalmente, para los protozoarios flagelados se toman muestras de raíces y de tejidos firmes 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 estipite con lesiones en palmas enfermas.

Las muestras serán transportadas refrigeradas a los laboratorios de CENPALMA 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 barrenado - sacabocados y cada muestra será de 1kg por palma afectada.

Las muestras serán transportadas refrigeradas a los laboratorios de CENPALMA 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
Orden Erysiphales	Tejido vegetal afectado por microorganismos	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Orden Taphrinales	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 Phylachorales	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 Sphaeropsidiales	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
Género Streptomyces	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 Tylenchida	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 Polytriales	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 Mollusca	Tejido vegetal afectado por microorganismos y tejidos ejemplos 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 Oomycetes	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
Elaeis guineensis	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Elaeis guineensis x Elaeis oleifera	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras por planta, 2 veces al mes
Elaeis oleifera	Muestras vegetales, ejemplo, tallo, hoja, raíz.	Todas	6 muestras de tejido vegetal por palma, dos veces al mes
Especies cultivables tales como cacao (Theobroma cacao), coco (Coco sp.) o mango (Mangifera indica).	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
Orden Piperales	Esquejes, flores y frutos.	Todas	6 muestras por planta, una vez al mes
Orden Boraginiales	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 Larriales	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 CENIPALMA 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)
Bolivar: San Pablo, Similí, San Juan de Nepomuceno, Zambrano, El Peñón, Ragidor, Morales, Zambrano	Barrancabermeja: Campo Terrestre Experimental Palmar 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: Aguafín Codazzi, Becerril, Bosconia, Chenchagua, Curumani, Gamara, La Paz, Palitas, Pelaya, Tamalameque	Zona Bananera: Campo Experimental Palmar de la Sierra	Terrestre	
Cesar: Aguachica, La Gloria, San Alberto, San Martín, La Paz, Río de Oro, El Copey	Barrancabermeja: Campo experimental Palmar de la Vizcaina	Terrestre	
Magdalena: Algarrobo, Aracataca, Ariguaní, El Retén, Pivijay, Pueblo Viejo, Sabanas del Ángel, Zona Bananera	Zona Bananera: Campo Experimental Palmar de la Sierra	Terrestre	
Norte de Santander: La Esperanza	Barrancabermeja: Campo experimental Palmar de la Vizcaina	Terrestre	
Santander: Barrancabermeja, Lebrija, El Carmen, Puerto Wilches, Río Negro, Sabana de Tomas, San Vicente del Chicuri, Simacota	Barrancabermeja: Campo experimental Palmar de la Vizcaina	Terrestre	
Cundinamarca: Paratebuena	Paratebuena: Campo Experimental Palmar de las Corcoras	Terrestre	
Casanare: Maní, Tauramena, Villanueva	Paratebuena: Campo Experimental Palmar de las Corcoras	Terrestre	
Meta: Acacias, Barranca de Upiá, Cabuyero, Castilla La Nueva, Comanal	Paratebuena: Campo Experimental Palmar 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	Temestre	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
Gricy Andrea Serna Villa	CC 48.572.256	Ingeniería Agronómica	X	
Carlos Mauricio Arango Uribe	CC 75.100.011	Ingeniería Agronómica		X
Carlos Enrique Barrica Trilleria	CC 1.110.463.33	Ingeniería Agronómica		X
William Fabian Bolívar	CC 1.089.725.486	Ingeniero Agrónomo		X
Natalia Julieth Castillo Villamaga	CC 1.113.637.847	Ingeniero Agrónomo		X
Jesica Arvey Matabachoy	CC 18.147.685	Ingeniería Agronómica		X
Hector Camilo Medina Cárdenas	CC 1.090.470.989	Ingeniería Agronómica		X
Yuri Adriana Mestizo Garzón	CC 1.089.717.832	Ingeniería Agronómica		X
Luis Guillermo Montes Bizarzo	CC 80.819.682	Ingeniería Agronómica		X
Fabian Alexander Moreno Gaviria	CC 94.464.332	Ingeniería Agronómica		X
Rosa Cecilia Aidana de la Torre	CC 31.952.702	Biología		X
Carmenza Montoya Jaramillo	CC 86.725.139	Biología		X
Kelly Anía	CC 52.844.347	Biología		X
Mariana Herrera Corzo	CC 1.026.243.738	Biología		X
María Camila Rodríguez Cruz	CC 1.023.928.781	Microbiología		X
Catalina Chávez Saena	CC 1.032.439.886	Microbiología		X
Sandra Julieth Castillo Corredor	CC 53.090.820	Ingeniería Agronómica		X
Carlos Andrés Sendoya Corrales	CC 1.113.629.884	Ingeniería Agronómica		X
Diana Carolina Vélez Fernández	CC 1.085.547.359	Microbiología		X

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

- a) Depositar dentro del término de vigencia del permiso los especímenes en una colección nacional registrada ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt", de conformidad con lo dispuesto por la normatividad que regula la materia, y enviar copia de las constancias de depósito a la autoridad ambiental competente;

"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 Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible, en lo relacionado con la tasa compensatoria por caza de fauna silvestre y se dictan otras disposiciones"

⁴ "Por la cual se establece la tarifa mínima de la tasa compensatoria por caza de fauna silvestre y se dictan otras disposiciones"

⁵ "Por la cual se establecen las especies de la fauna silvestre incluidas dentro de las categorías del coeficiente de valoración y el valor correspondiente a las especies establecidas en el numeral 3 de que trata el artículo 2.2.8.10.2.7 del Capítulo 10 del Título 9 de la Parte 2 del Libro 2 del Decreto 1076 de 2015, en el cual se reglamenta el artículo 42 de la Ley 99 de 1993 en lo referente a la tasa compensatoria por caza de fauna silvestre."

"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 normatividad 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 Chocó - 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 Guavio - CORPOGUAVIO; a la Corporación Autónoma de Chivor - CORPOCHIVOR; a la Corporación Autónoma Regional de Nariño - CORPONARIÑO; a la Corporación Autónoma Regional de la Frontera Nororiental - CORPONOR; a la Corporación Autónoma Regional del Tolima - CORTOLIMA; a la Corporación Autónoma Regional de la AMAZONIA - CRA; a la Corporación Autónoma Regional del Cauca - CRC; a la Corporación Autónoma Regional del Sur de Bolívar - CBS;

"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 CÚMPLASE

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



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

Ejecutores
BIBIANA CAROLINA GONZALEZ
PEREZ
Abogada



Revisor / L. O. der
CARMEN LEZETH BOLIVAR
MELENDEZ
Abogado/Contratista



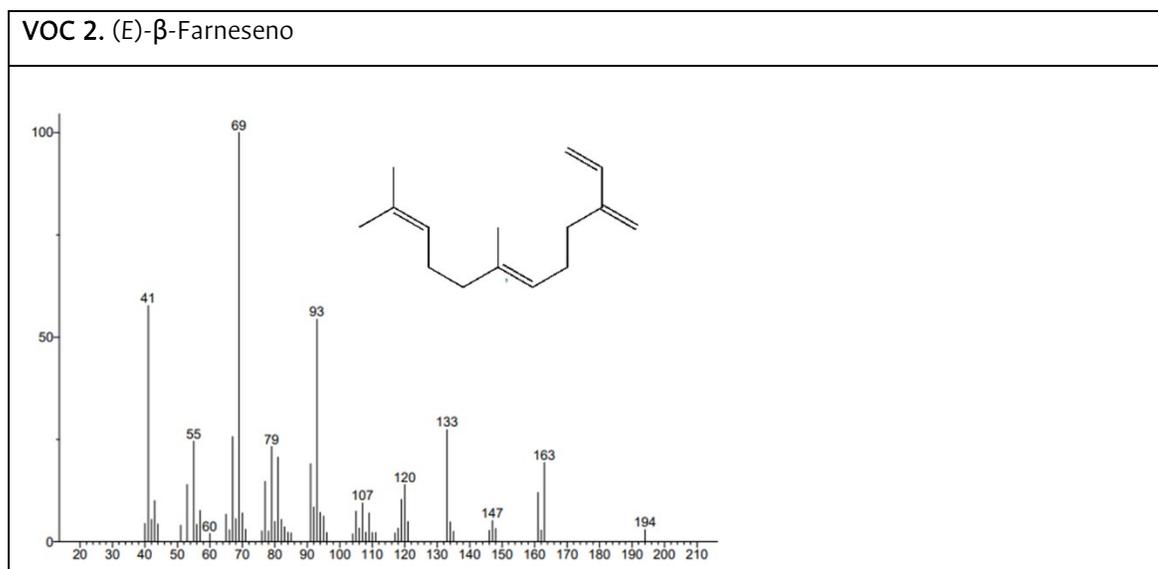
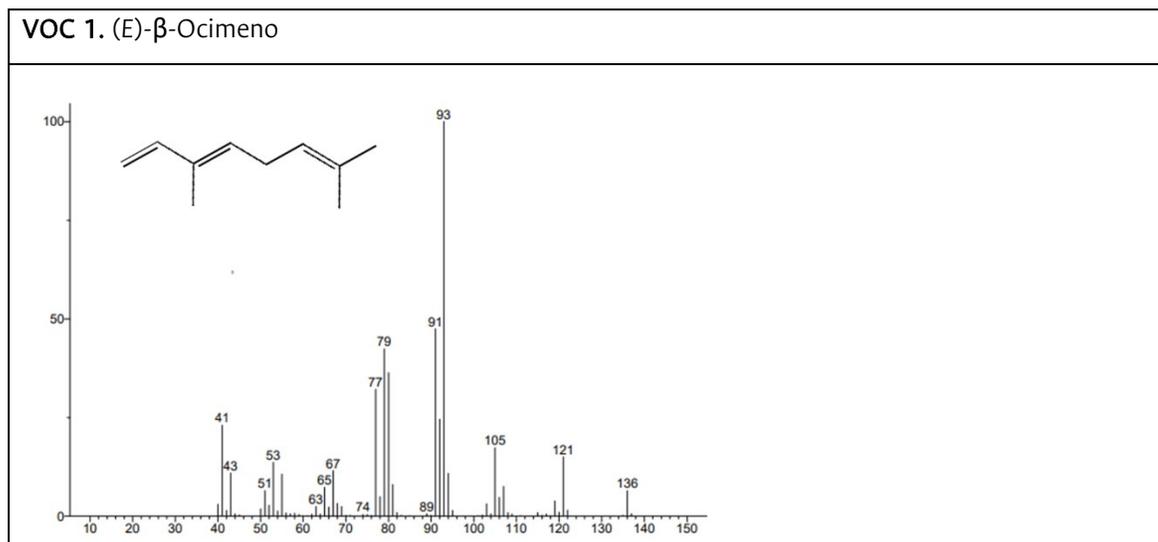
Expediente No. RC009-00-2018
Concepto Técnico N° 7294 del 28 de noviembre de 2018
Fecha: 11 de diciembre de 2018

Proceso No.: 201810309
Archivado en: RC009-00-2018
Fecha de Ingreso: 11/12/2018

Nota: Este es un documento electrónico generado desde los Sistemas de Información de la ANLA. El original reposa en los archivos digitales de la Entidad.

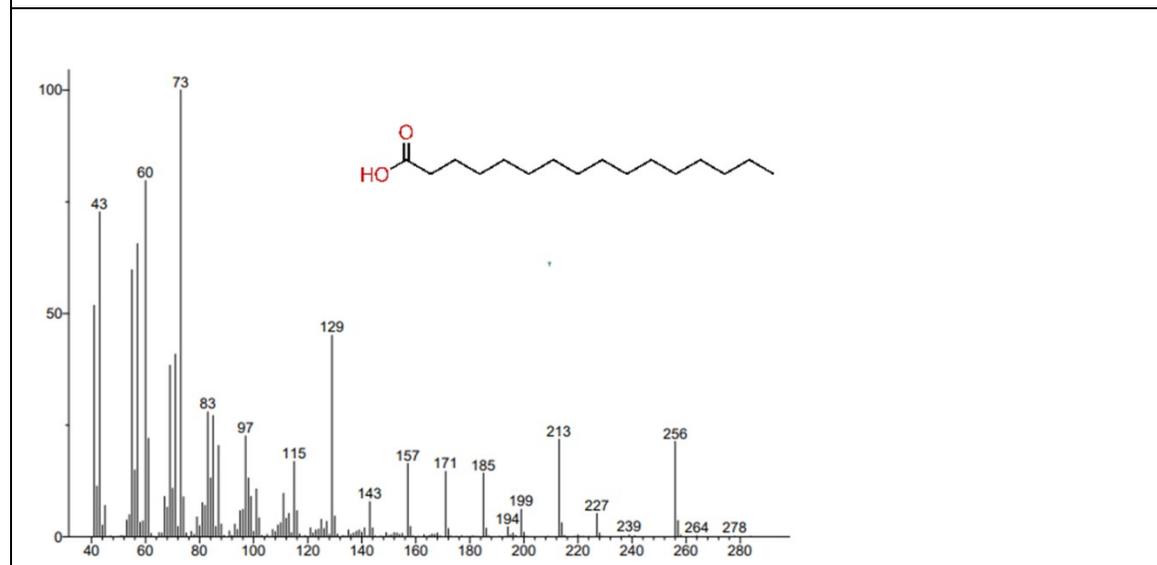
Anexo 2. Espectros de masas de VOCs identificados tentativamente

Estructura química y espectro de masas por IE a 70 eV

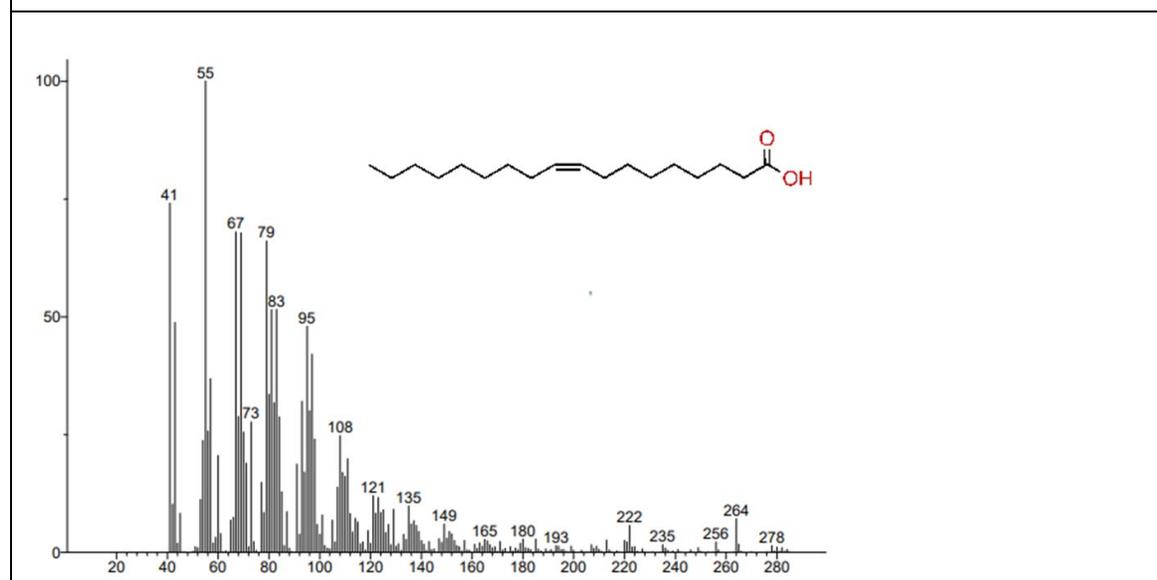


Estructura química y espectro de masas por IE a 70 eV

VOC 6. Ácido palmítico



VOC 7. Ácido oleico

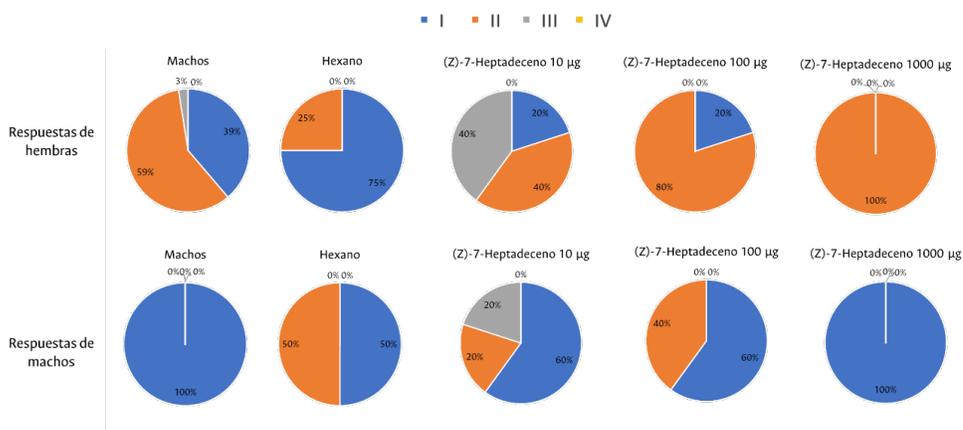


Anexo 3: Análisis estadístico respuestas EAG

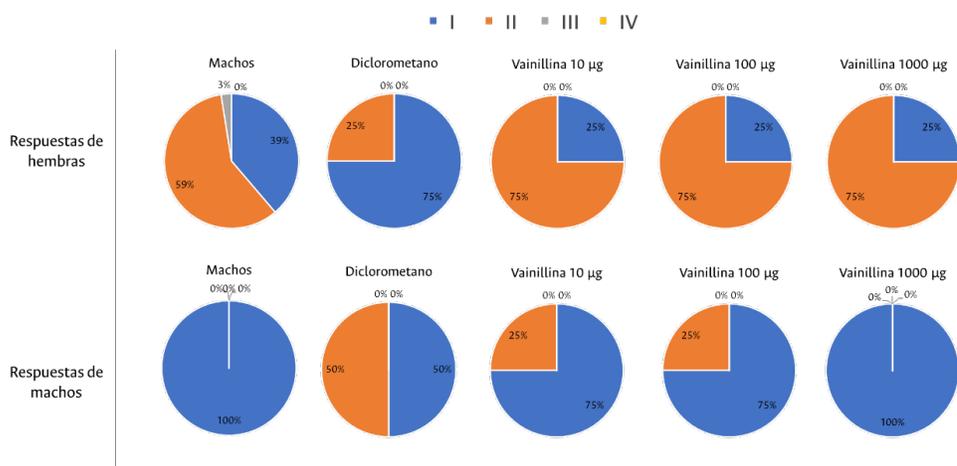
MUESTRAS EN HEXANO						
Respuesta de hembras			Respuesta de machos			
ANOVA			ANOVA			
		F _{exp} < F crítico			F _{exp} < F crítico	
F experimental	1,58	No existe diferencia	F experimental	0,80	No existe diferencia	
F crítico	3,47	significativa entre las medias	F crítico	3,48	significativa entre las medias	
Test de Tukey			Test de Tukey			
T calculado para n=10, m=3 con $\alpha=0,05$	0,208		T calculado para n=10, m=3 con $\alpha=0,05$	0,001		
Comparación de medias respecto al control			Comparación de medias respecto al control			
		Hxn			Hxn	
T exp < T calculado	Hxn	0,000	T exp < T calculado	Hxn	0,0000	
No existe diferencia	Alas M Hxn	0,183	No existe diferencia	Alas M Hxn	0,0000	< 0,001
significativa entre las medias	Abd M Hxn	0,061	significativa entre las medias	Abd M Hxn	0,0000	< 0,001
	Nerolidol	0,102		Nerolidol	0,0003	< 0,001
	Z-7-H17	0,112		Z-7-H17	0,0007	< 0,001
MUESTRAS EN DICLOROMETANO						
Respuesta de hembras			Respuesta de machos			
ANOVA			ANOVA			
		F _{exp} < F crítico			F _{exp} < F crítico	
F experimental	1,58	No existe diferencia	F experimental	1,58	No existe diferencia	
F crítico	3,47	significativa entre las medias	F crítico	3,47	significativa entre las medias	
Test de Tukey			Test de Tukey			
T calculado para n=8, m=3 con $\alpha=0,05$	0,208		T calculado para n=8, m=3 con $\alpha=0,05$	0,003		
Comparación de medias respecto al control			Comparación de medias respecto al control			
		DCM			DCM	
T exp < T calculado	DCM	0,000	T exp < T calculado	DCM	0,0000	
No existe diferencia	Alas M DCM	0,166	No existe diferencia	Alas M DCM	0,0007	< 0,003
significativa entre las medias	Abd M DCM	0,198	significativa entre las medias	Abd M DCM	0,0003	< 0,003
	Vainillina	0,071		Vainillina	0,0003	< 0,003

Anexo 4 Respuesta comportamental de adultos de *O. cassina* en bioensayo de túnel de viento

Respuesta frente al (Z)-7-heptadeceno



Respuesta frente a la vainillina



Referencias

- (1) Sierra Márquez, J.; Sierra Márquez, L.; Olivero-Verbel, J. Potencial Económico de La Palma Aceitera (*Elaeis Guineensis* Jacq). *Agron. Mesoam.* **2017**, 28 (2), 523. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i2.25927>.
- (2) das Chagas, K. ESTUDO DO FEROMÔNIO DE OPSIPHANES INVIRAE (HUBNER, 1818) (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia- Renorbio, 2018.
- (3) Mexzón, R. G.; Chinchilla, C. M. *Opsiphanes Cassina* Felder (Lepidoptera: Nymphalidae), Defoliator of the Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacquin) in Central America. *ASD Oil Palm Pap.* **2011**, 36, 14–33.
- (4) Matabanchoy, J. A.; Raigoza, D.; Bustillo, A. E. (PDF) *Biología de Opsiphanes Cassina Defoliador Palma de Aceite En Colombia*; 2018.
- (5) Eduardo Camperos Reyes, J.; Ignacio Barrera, E.; Hernandez, J. S.; Arias Gómez, H.; Mosquera Montoya, M. *Propuesta Metodológica Para Estimar La Defoliación En La Palma de Aceite*; 2020.
- (6) Aldana de La Torre, R. C.; Aldana de La Torre, J. A. *Reconocimiento y Manejo de Insectos Defoliadores y Asociados a La Pestalotiopsis*; Centro de Investigación en Palma de Aceite, C., Ed.; Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma, 2011.
- (7) Rodríguez, G.; Silva, R.; Cásares, R.; Barrios, R.; Díaz, A.; Fariñas, J. *Tecnología Agronómica de La Palma Aceitera (*Elaeis Guineensis* Jacq.) y Manejo Integrado de Su Defoliador Opsiphanes Cassina Felder (Lepidoptera: Brassolidae) En Plantaciones Comerciales Del Estado Monagas, Venezuela.* *Rev. Científica UDO Agrícola* **2012**, 3, 584–598.
- (8) Guo, J. M.; Liu, X. L.; Liu, S. R.; Wei, Z. Q.; Han, W. K.; Guo, Y.; Dong, S. L. Functional Characterization of Sex Pheromone Receptors in the Fall Armyworm (*Spodoptera Frugiperda*). *Insects* **2020**, 11 (3). <https://doi.org/10.3390/insects11030193>.
- (9) Wyatt, T. D. Pheromones. *Current Biology*. Cell Press August 7, 2017, pp R739–R743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.039>.
- (10) Schulz, S. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*; 2004; Vol. 239.
- (11) Salas, J. Captura de Tuta Absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) En Trampas Cebadas Con Su Feromona Sexual. *Rev. Colomb. Entomol.* **2004**, 30 (1).

- (12) Dou, X.; Liu, S.; Soroker, V.; Harari, A.; Jurenka, R. Pheromone Gland Transcriptome of the Pink Bollworm Moth, *Pectinophora Gossypiella*: Comparison between a Laboratory and Field Population. *PLoS One* **2019**, *14* (7), e0220187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220187>.
- (13) Felipe Bosa, O.; Pablo Osorio, M.; Alba Marina Cotes, P.; Bengtsson, M.; Witzgall, P.; Fukumoto, T. Control of *Tecia Solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) through Its Pheromone for Mating Disruption. *Rev. Colomb. Entomol.* **2008**, *34* (1), 68–75.
- (14) Cotes Prado, A. M.; Moreno-Velandia, C. A.; Zapata, Y.; Beltrán-Acosta, C.; Kobayashi, S.; Uribe Gutiérrez, L. A.; Elad, Y.; Bettiol, W.; Jijakli, H.; Wisniewski, M.; Caro-Quintero, A.; González Almario, C.; Balbín-Suárez, A.; Berg, G.; Smalla, K.; Grijalba, E.; Hurst, M.; Ibarra, J.; Jurat-Fuentes, J. L.; Jackson, T.; Espinel Correal, C.; Torres Torres, L. A.; Villamizar Rivero, L. F.; Bustillo Pardey, A. E.; Zuluaga Mogollón, M. V.; Cuartas, P.; Gómez Valderrama, J. A.; Barrera Cubillos, G. P.; López-Ferber, M.; Borrero-Echeverry, F.; Barreto-Triana, N.; Aragón-Rodríguez, S. M.; Rivera-Trujillo, H. F.; Oehlschlager, C.; Kondo, T.; Rincón, D. F.; Pérez Álvarez, R.; Vásquez Ordóñez, A. A.; González, G. *Control Biológico de Fitopatógenos, Insectos y Ácaros: Agentes de Control Biológico (Volumen 1 y 2)*, 1st ed.; Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), 2018. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.investigacion.7402537>.
- (15) Pherobase :: Family Index - Nymphalidae <https://www.pherobase.com/database/family/family-Nymphalidae.php> (accessed Oct 25, 2021).
- (16) Hedenström, E.; Wallin, E. A.; Andersson, J.; Bång, J.; Wang, H.-L.; Löfstedt, C.; Brattström, O.; Baquet, P. Stereoisomeric Analysis of 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-ol and the Corresponding Ketone in Wing Extracts from African *Bicyclus* Butterfly Species. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0539-5>.
- (17) Wang, H.-L.; Brattström, O.; Brakefield, P. M.; Francke, W.; Löfstedt, C. Identification and Biosynthesis of Novel Male Specific Esters in the Wings of the Tropical Butterfly, *Bicyclus Martius* Sanaos. *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40* (6), 549–559. <https://doi.org/10.1007/S10886-014-0452-Y>.
- (18) Liénard, M. A.; Wang, H. L.; Lassance, J. M.; Löfstedt, C. Sex Pheromone Biosynthetic Pathways Are Conserved between Moths and the Butterfly *Bicyclus Anynana*. *Nat. Commun.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4957>.
- (19) Schulz, S.; Steffensky, M.; Roisin, Y. Identification and Synthesis of Elymniafuran, a New Monoterpene from the Butterfly *Elymnia thryallis*. *Liebigs Ann.* **1996**, *94* (6), 941–946. <https://doi.org/10.1002/jlac.199619960612>.
- (20) Hayashi, N.; Kawaguchi, H.; Nishi, A.; Komae, H. γ -Decalactone, an Odoriferous Compound from the Male Butterfly, *Lethe marginalis* Motschulsky. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **1987**, *42* (7–8),

- 1001–1002. <https://doi.org/10.1515/ZNC-1987-7-846>.
- (21) Stenberg, J. A. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. *Trends Plant Sci.* **2017**, 22 (9), 759–769. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010>.
- (22) Prokopy, R.; Kogan, M. Integrated Pest Management. In *Encyclopedia of Insects*; Academic Press, 2009; pp 523–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00148-X>.
- (23) Bergström, G. Chemical Ecology = Chemistry + Ecology! In *Pure and Applied Chemistry*; 2007; Vol. 79, pp 2305–2323. <https://doi.org/10.1351/pac200779122305>.
- (24) Smart, L. E.; Aradottir, G. I.; Bruce, T. J. A. Role of Semiochemicals in Integrated Pest Management. In *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*; Academic Press, 2014; pp 93–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00007-5>.
- (25) Brunetti, A. E.; Carnevale Neto, F.; Vera, M. C.; Taboada, C.; Pavarini, D. P.; Bauermeister, A.; Lopes, N. P. An Integrative Omics Perspective for the Analysis of Chemical Signals in Ecological Interactions. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry March 7, 2018, pp 1574–1591. <https://doi.org/10.1039/c7cs00368d>.
- (26) Dicke, M.; Sabelis, M. W. Infochemical Terminology: Based on Cost-Benefit Analysis Rather than Origin of Compounds? *Funct. Ecol.* **1988**, 2 (2), 131. <https://doi.org/10.2307/2389687>.
- (27) Meiners, T. Chemical Ecology and Evolution of Plant-Insect Interactions: A Multitrophic Perspective. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier April 1, 2015, pp 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.003>.
- (28) Liebig, J. Chemical Ecology: A New Royal Scent in a Small Insect Society. *Curr. Biol.* **2020**, 30 (6), R280–R282. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.014>.
- (29) DOUGHERTY, M. J.; GUERIN, P. M.; WARD, R. D. Identification of Oviposition Attractants for the Sandfly *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Volatiles of Faeces from Vertebrates. *Physiol. Entomol.* **1995**, 20 (1), 23–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00797.x>.
- (30) Mostafa, S.; Wang, Y.; Zeng, W.; Jin, B. Plant Responses to Herbivory, Wounding, and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute June 24, 2022, p 7031. <https://doi.org/10.3390/ijms23137031>.
- (31) Khan, Z. R.; James, D. G.; Midega, C. A. O.; Pickett, J. A. Chemical Ecology and Conservation Biological Control. *Biol. Control* **2008**, 45 (2), 210–224. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2007.11.009>.
- (32) Bezerra, R. H. S.; Sousa-Souto, L.; Santana, A. E. G.; Ambrogi, B. G. Indirect Plant Defenses: Volatile Organic Compounds and Extrafloral Nectar. *Arthropod-Plant Interactions*. Springer May 17, 2021, pp 467–489. <https://doi.org/10.1007/s11829-021-09837-1>.
- (33) Zhou (周绍群), S.; Jander, G. Molecular Ecology of Plant Volatiles in Interactions with Insect

- Herbivores. *J. Exp. Bot.* **2022**, 73 (2), 449–462. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAB413>.
- (34) Veyrat, N.; Robert, C. A. M.; Turlings, T. C. J.; Erb, M. Herbivore Intoxication as a Potential Primary Function of an Inducible Volatile Plant Signal. *J. Ecol.* **2016**, 104 (2), 591–600. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12526>.
- (35) Bonaventure, G.; VanDoorn, A.; Baldwin, I. T. Herbivore-Associated Elicitors: FAC Signaling and Metabolism. *Trends in Plant Science.* 2011, pp 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.01.006>.
- (36) Ingber, D. A.; Christensen, S. A.; Alborn, H. T.; Hiltbold, I. Detecting the Conspecific: Herbivory-Induced Olfactory Cues in the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Metab.* 2021, Vol. 11, Page 583 **2021**, 11 (9), 583. <https://doi.org/10.3390/METABO11090583>.
- (37) M. A. Ramos-López. Activity of the Main Fatty Acid Components of the Hexane Leaf Extract of *Ricinus Communis* against *Spodoptera Frugiperda*. *AFRICAN J. Biotechnol.* **2012**, 11 (18), 4274–4278. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3727>.
- (38) YOUSEF, H.; EL-LAKWAH, S. F.; EL SAYED, Y. A. INSECTICIDAL ACTIVITY OF LINOLEIC ACID AGAINST *SPODOPTERA LITTORALIS* (BOISD.). *Egypt. J. Agric. Res.* **2013**, 91 (2), 573–580. <https://doi.org/10.21608/ejar.2013.163516>.
- (39) Sousa, T. C. da S.; Leite, N. A.; Sant’Ana, J. Responses of *Trichogramma Pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to Rice and Corn Plants, Fed and Oviposited by *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* **2021**, 50 (5), 697–705. <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00876-0>.
- (40) Krieger, J.; Breer, H. Olfactory Reception in Invertebrates. *Science* (80-.). **1999**, 286 (5440), 720–723. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.720>.
- (41) Wyatt, T. D. Pheromones and Animal Behaviour Communication by Smell and Taste. **2003**.
- (42) Karlson, P.; Lüscher, M. ‘Pheromones’: A New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nat.* 1959 1834653 **1959**, 183 (4653), 55–56. <https://doi.org/10.1038/183055a0>.
- (43) Rizvi, S. A. H.; George, J.; Reddy, G. V. P.; Zeng, X.; Guerrero, A. Latest Developments in Insect Sex Pheromone Research and Its Application in Agricultural Pest Management. *Insects.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute May 23, 2021, p 484. <https://doi.org/10.3390/insects12060484>.
- (44) Bergmann, J.; Fuentes-Contreras, E.; Zaviezo, T. Feromonas y Su Uso En El Manejo de Plagas. In *Bases Ecológicas para el Manejo de Plagas*; 2021; pp 53–79.
- (45) Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *J. Chem. Ecol.* **2010**, 36 (1), 80–100. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9737-y>.
- (46) Miller, J. R.; Gut, L. J. Mating Disruption for the 21st Century: Matching Technology with

- Mechanism. *Environmental Entomology*. Oxford Academic June 1, 2015, pp 427–453. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv052>.
- (47) Hummel, H. E.; Langner, S. S.; Eisinger, M. T. Pheromone Dispensers, Including Organic Polymer Fibers, Described in the Crop Protection Literature: Comparison of Their Innovation Potential. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2013**, 78 (2), 233–252.
- (48) Medina, V. V.; Solorzano, D. P.; Ávila, C. S.; Frías, A. R. Evaluation of a Synthetic Pheromone Dispensers to Control the Potato Moth, *Tecia Solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int. J. Appl. Chem.* **2019**, 6 (1), 28–36. <https://doi.org/10.14445/23939133/ijac-v6i1p105>.
- (49) Caparros Megido, R.; Haubruge, E.; Verheggen, F. J. Pheromone-Based Management Strategies to Control the Tomato Leafminer, *Tuta Absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). A Review. *Biotechnol. Agron. Société Environ. = Biotechnol. Agron. Soc. Environ. [=BASE]* **2013**, 17 (3), 475–482.
- (50) International Pheromone Systems. Rubber Septum - International Pheromone Systems <https://www.internationalpheromones.com/product/rubber-septum/> (accessed Dec 29, 2022).
- (51) Kovanci, O. B.; Schal, C.; Walgenbach, J. F.; Kennedy, G. G. Effects of Pheromone Loading, Dispenser Age, and Trap Height on Pheromone Trap Catches of the Oriental Fruit Moth in Apple Orchards. *Phytoparasitica* **2006**, 34 (3), 252–260. <https://doi.org/10.1007/BF02980952>.
- (52) Zhang, A.; Leskey, T. C.; Bergh, J. C.; Walgenbach, J. F. Sex Pheromone Dispenser Type and Trap Design Affect Capture of Dogwood Borer. *J. Chem. Ecol.* **2013**, 39 (3), 390–397. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0251-x>.
- (53) Zhang, J.; Huang, Y.; Pu, R.; Gonzalez-Moreno, P.; Yuan, L.; Wu, K.; Huang, W. Monitoring Plant Diseases and Pests through Remote Sensing Technology: A Review. *Computers and Electronics in Agriculture*. Elsevier October 1, 2019, p 104943. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.104943>.
- (54) Reddy, G. V. P.; Guerrero, A. *New Pheromones and Insect Control Strategies*; Academic Press, 2010; Vol. 83. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)83020-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)83020-1).
- (55) Flores, M. F.; Bergmann, J.; Ballesteros, C.; Arraztio, D.; Curkovic, T. Development of Monitoring and Mating Disruption against the Chilean Leafroller *Proeulia Auraria* (Lepidoptera: Tortricidae) in Orchards. *Insects* **2021**, 12 (7), 625. <https://doi.org/10.3390/insects12070625>.
- (56) Bento, J. M. S.; Vilela, E. F.; Parra, J. R. P.; Leal, W. S. Monitoring of Citrus Fruit Borer with Sexual Pheromone: Behavioural Basis for Use of This New Approach. *Laranja* **2001**, 22 (2), 351–366.
- (57) Leal, W. S.; Bento, J. M. S.; Murata, Y.; Ono, M.; Parra, J. R. P.; Vilela, E. F. Identification, Synthesis, and Field Evaluation of the Sex Pheromone of the Citrus Fruit Borer: *Ecdytoplopha Aurantiana*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27 (10), 2041–2051. <https://doi.org/10.1023/A:1012242904220/METRICS>.
- (58) Bento, J. M. S.; Parra, J. R. P.; de Miranda, S. H. G.; Adami, A. C. O.; Vilela, E. F.; Leal, W. S. How

- Much Is a Pheromone Worth? [Version 1; Referees: 2 Approved]. *F1000Research* **2016**, 5. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.9195.1>.
- (59) Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. *J. Chem. Ecol.* **2010**, 36 (1), 80–100. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9737-y>.
- (60) Cardé, R. T.; Bau, J.; Elkinton, J. S. Comparison of Attraction and Trapping Capabilities of Bucket- and Delta-Style Traps with Different Pheromone Emission Rates for Gypsy Moths (Lepidoptera: Erebidae): Implications for Understanding Range of Attraction and Utility in Surveillance. *Environ. Entomol.* **2018**, 47 (1), 107–113. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx185>.
- (61) Williams, D. T.; Jonusas, G. The Influence of Tree Species and Edge Effects on Pheromone Trap Catches of Oak Processionary Moth *Thaumetopoea Processionea* (L.) in the U.K. *Agric. For. Entomol.* **2019**, 21 (1), 28–37. <https://doi.org/10.1111/afe.12300>.
- (62) Cruz-Esteban, S.; Valencia-Botín, A. J.; Virgen, A.; Santiesteban, A.; Mérida-Torres, N. M.; Rojas, J. C. Performance and Efficiency of Trap Designs Baited with Sex Pheromone for Monitoring *Spodoptera Frugiperda* Males in Corn Crops. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **2022**, 42 (1), 715–722. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00595-4>.
- (63) Reddy, G. V. P.; Guerrero, A. *New Pheromones and Insect Control Strategies*; 2010; Vol. 83. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)83020-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)83020-1).
- (64) Jabamo, T.; Ayalew, G.; Gofishu, M.; Wakgari, M. Integrated Effect of Insecticide and Sex Pheromone on the Tomato Leafminer, *Tuta Absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *SSRN Electron. J.* **2022**. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4225281>.
- (65) Akutse, K. S.; Subramanian, S.; Khamis, F. M.; Ekesi, S.; Mohamed, S. A. Entomopathogenic Fungus Isolates for Adult *Tuta Absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) Management and Their Compatibility with *Tuta* Pheromone. *J. Appl. Entomol.* **2020**, 144 (9), 777–787. <https://doi.org/10.1111/jen.12812>.
- (66) Leal, W. S. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **2013**, 58 (1), 373–391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>.
- (67) Klassen, D.; Lennox, M. D.; Dumont, M. J.; Chouinard, G.; Tavares, J. R. Dispensers for Pheromonal Pest Control. *Journal of Environmental Management*. Academic Press January 1, 2023, p 116590. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116590>.
- (68) Haviland, D. R.; Rijal, J. P.; Rill, S. M.; Higbee, B. S.; Burks, C. S.; Gordon, C. A. Management of Navel Orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae) Using Four Commercial Mating Disruption Systems in California Almonds. *J. Econ. Entomol.* **2021**, 114 (1), 238–247. <https://doi.org/10.1093/JEE/TOAA297>.

- (69) Khan, Z.; Midega, C. A. O.; Hooper, A.; Pickett, J. Push-Pull: Chemical Ecology-Based Integrated Pest Management Technology. *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42* (7), 689–697. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0730-y>.
- (70) Cenipalma. *Guía Para La Elaboración y Ubicación de Trampas Para La Captura de Rhynchophorus Palmarum L.*; Cenipalma, 2017.
- (71) Medina, V. V. Señales Químicas Entre El Escarabajo-Plaga *Strategus Aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) y La Palma de Aceite (*Elaeis Guineensis* Jacq.), Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Tesis de Maestría en Ciencias-Química, 2021.
- (72) McNeil, J. N. Behavioral Ecology of Pheromone-Mediated Communication in Moths and Its Importance in the Use of Pheromone Traps. *Annu. Rev. Entomol.* **1991**, *36* (1), 407–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002203>.
- (73) Björn G. Johansson; Therésa M. Jones. The Role of Chemical Communication in Mate Choice. *Biol. Rev.* **2007**, *82* (2), 265–289.
- (74) Romero Frías, 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, Tesis de Doctorado en Ciencias-Química, 2015.
- (75) Carey, A. F.; Carlson, J. R. Insect Olfaction from Model Systems to Disease Control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (32), 12987–12995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103472108>.
- (76) Conchou, L.; Lucas, P.; Meslin, C.; Proffit, M.; Staudt, M.; Renou, M. Insect Odorscapes: From Plant Volatiles to Natural Olfactory Scenes. *Front. Physiol.* **2019**, *10* (JUL), 972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>.
- (77) Haverkamp, A.; Hansson, B. S.; Knaden, M. Combinatorial Codes and Labeled Lines: How Insects Use Olfactory Cues to Find and Judge Food, Mates, and Oviposition Sites in Complex Environments. *Front. Physiol.* **2018**, *9* (FEB). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00049>.
- (78) Brito, N. F.; Moreira, M. F.; Melo, A. C. A. A Look inside Odorant-Binding Proteins in Insect Chemoreception. *J. Insect Physiol.* **2016**, *95*, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.09.008>.
- (79) Syntech. *Electroantennography: A Practical Introduction*, 1st ed.; Ockenfels SYNTECH, Ed.; SYNTECH: Kirchzarten, 2004.
- (80) Park, K. C.; Ochieng, S. A.; Zhu, J.; Baker, T. C. Odor Discrimination Using Insect Electroantennogram Responses from an Insect Antennal Array. *Chem. Senses* **2002**, *27* (4), 343–352. <https://doi.org/10.1093/chemse/27.4.343>.
- (81) Ando, T.; Yamakawa, R. Analyses of Lepidopteran Sex Pheromones by Mass Spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (7), 990–1002. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.03.010>.

- (82) Olsson, S. B.; Hansson, B. S. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 1068, 157–177. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-619-1_11.
- (83) Legros, S.; Mialet-Serra, I.; Caliman, J. P.; Siregar, F. A.; Clement-Vidal, A.; Fabre, D.; Dingkuhn, M. Phenology, Growth and Physiological Adjustments of Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) to Sink Limitation Induced by Fruit Pruning. *Ann. Bot.* **2009**, 104 (6), 1183–1194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp216>.
- (84) Combres, J. C.; Pallas, B.; Rouan, L.; Mialet-Serra, I.; Caliman, J. P.; Braconnier, S.; Soulié, J. C.; Dingkuhn, M. Simulation of Inflorescence Dynamics in Oil Palm and Estimation of Environment-Sensitive Phenological Phases: A Model Based Analysis. *Funct. Plant Biol.* **2013**, 40 (3), 263–279. <https://doi.org/10.1071/FP12133>.
- (85) Legros, S.; Mialet-Serra, I.; Caliman, J. P.; Siregar, F. A.; Clément-Vidal, A.; Dingkuhn, M. Phenology and Growth Adjustments of Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) to Photoperiod and Climate Variability. *Ann. Bot.* **2009**, 104 (6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp214>.
- (86) McMorro, J. Linear Regression Modelling for the Estimation of Oil Palm Age from Landsat TM. *Int. J. Remote Sens.* **2001**, 22 (12), 2243–2264. <https://doi.org/10.1080/01431160117188>.
- (87) Mauricio Romero, H.; Diana Carolina Forero, C.; Hormaza, P.; Rueda Williamson, C. Estadios Fenológicos de Crecimiento de Palma de Aceite Africana (*Elaeis Guineensis*). *Palmas* **2012**, 33 (1), 23–35.
- (88) Hernawati, R.; Wikantika, K.; Darmawan, S. Modeling of Oil Palm Phenology Based on Remote Sensing Data: Opportunities and Challenges. *J. Appl. Remote Sens.* **2022**, 16 (02), 021501. <https://doi.org/10.1117/1.jrs.16.021501>.
- (89) Forero Hernández, D. C.; Martínez Paola, A. H. *Generalidades Sobre La Morfología y Fenología de La Palma de Aceite*; 2012.
- (90) Penagos, U.; Blanca, Y.; Cortés, G.; Camilo, A.; Lizarazo, L.; Cortés Gómez, C. A.; Penagos Ulloa, B. Y.; Lizarazo Leguizamón, G.; Toca Garzón, J. R. *Corte y Recolección de Racimos de Palma de Aceite*; 2017.
- (91) Mendoza-García, M.; Oliveros-Contreras, D.; Guzmán-Duque, A. P. La Eficiencia de Las Empresas Del Sector Palmicultor En Colombia. *Rev. Esc. Adm. Negocios* **2020**, 88 (88), 33–48. <https://doi.org/10.21158/01208160.n88.2020.2695>.
- (92) Absalome, M. A.; Massara, C. C.; Alexandre, A. A.; Gervais, K.; Chantal, G. G. A.; Ferdinand, D.; Rhedoor, A. J.; Coulibaly, I.; George, T. G.; Brigitte, T.; Marion, M.; Jean-Paul, C. Biochemical Properties, Nutritional Values, Health Benefits and Sustainability of Palm Oil. *Biochimie* **2020**, 178, 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.019>.

- (93) Goh, K. J.; Wong, C. K.; Ng, P. H. C. *Oil Palm*, 2nd ed.; Elsevier Inc., 2016; Vol. 3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00176-3>.
- (94) Producción Agrícola Mundial, Aceite de Palma - Producción por País <http://www.produccionagricolamundial.com/cultivos/aceitedepalma.aspx> (accessed Oct 13, 2022).
- (95) Pertuz Martínez, A. P.; Santamaría Escobar, Á. E. LA PALMICULTURA COLOMBIANA: SOSTENIBILIDAD ECONÓMICA, SOCIAL Y AMBIENTAL. *Tendencias (Revista la Fac. Ciencias Económicas y Adm. Univ. Nariño)* **2014**, 15 (1), 173. <https://doi.org/10.22267/rtend.141501.55>.
- (96) Fedepalma. *Balance Económico Del Sector Palmero Colombiano En El Primer Trimestre de 2022*; 2022.
- (97) Fedepalma. La Palma de Aceite En Colombia | Fedepalma. *Fedepalma* **2016**, 2018.
- (98) Mosquera, M.; Lopez, D.; Ruiz, E.; Castro, L. Mano de Obra En Cultivos de Palma Aceitera de Colombia: Participación En El Costo de Producción y Demanda. *Rev. Palmas* **2019**, 40 (1), 46–53.
- (99) Woittiez, L. S.; van Wijk, M. T.; Slingerland, M.; van Noordwijk, M.; Giller, K. E. Brechas de Rendimiento En El Cultivo de Palma de Aceite: Una Revisión Cuantitativa de Factores Determinantes | Revista Palmas. *Rev. Palmas* **2018**, 39 (1), 16–68.
- (100) Díshington, J. M. La Palmicultura Colombiana de Cara Al 2020. *Rev. Palmas* **2000**, 21 (especial), 9–17.
- (101) Rodríguez, G.; Silva, R.; Cásares, R.; Barrios, R.; Díaz, A.; Fariñas, J. Tecnología Agronómica de La Palma Aceitera (*Elaeis Guineensis* Jacq.) y Manejo Integrado de Su Defoliador *Opsiphanes Cassina* Felder (Lepidoptera:Brassolidae) En Plantaciones Comerciales Del Estado Monagas, Venezuela. *Rev. Científica UDO Agrícola* **2012**, 12 (3), 584–598.
- (102) Darus, A.; Wahid, M. B. MIP Intensivo Para El Manejo de Plagas En Palma de Aceite*. *Rev. palmas* **2001**, 22 (4), 19–35.
- (103) Ortiz, Y. La Palma de Aceite Como Ejemplo Para La Agroindustria En Colombia, FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, Tesis de pregrado en Economía, 2019.
- (104) Cardenas, P. S. *Asistencia Tecnica Dirigida En Instalacion y Manejo Integrado de Plagas En Palma Aceitera*; 2012.
- (105) Dishington, J. M.; Ignacio, J.; Scovino, S.; Becerra, J.; Coordinador, -Encinales; De Manejo, N.; Leidy, F.; Morales, C.; Analista De Manejo, I.; Colaboradores, F.; Bustillo, A. E.; Greicy, P.; Sarria Villa, A.; Aldana De La, R.; Carlos, T.; Uribe, M. A.; Moreno Muñoz, Y.; Fotografía, E. M.; Fredy, D.; Ballesteros, J. E. *GUÍA DE BOLSILLO Para El Reconocimiento y Manejo de Las Principales Enfermedades e Insectos Plaga En El Cultivo de La Palma de Aceite*, 1st ed.; Fedepalma: Bogotá, 2016.
- (106) Henson, I. E. La Poda En Palma de Aceite y Relación Entre El Área Foliar y El Rendimiento . Una Breve Revisión de Experimentos Previos *. *PALMAS* **2002**, 23 (1), 9–14.

- (107) Rojas, B. A. PRINCIPALES INSECTOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE PALMA DE ACEITE EN EL DEPARTAMENTO DEL META, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Tesis de pregrado en Agronomía, 2019.
- (108) Aldana Jorge; Aldana Rosa; Calvache Hugo; Franco Pedro. *Manual de Plagas de La Palma de Aceite En Colombia*; Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma, 2010.
- (109) Ribeiro, R. C.; Pikart, T. G.; Fouad, H. A.; Parreira, M. C.; Zanuncio, J. C.; Soares, M. A.; Castro, V. R. *Trichospilus Diatraeae (Hymenoptera: Eulophidae): Development and Reproduction in Lepidoptera Palm Oil Pests. Brazilian J. Biol.* **2019**, 79 (3), 377–382. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.173211>.
- (110) Daza, C. CORRELACIÓN DE LARVAS DE *Opsiphanes Cassina*, EN HOJA 9 Y 17 DE PALMA DE ACEITE, Universidad Nacional de Colombia, Tesis de Especialización en Cultivos perennes industriales, 2010.
- (111) Suckling, D. M.; Conlong, D. E.; Carpenter, J. E.; Bloem, K. A.; Rendon, P.; Vreysen, M. J. B. Global Range Expansion of Pest Lepidoptera Requires Socially Acceptable Solutions. *Biol. Invasions* **2017**, 19 (4), 1107–1119. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1325-9>.
- (112) Britton, D. What are the differences between butterflies and moths? - Australian Museum <https://australian.museum/learn/animals/insects/what-are-the-differences-between-butterflies-and-moths/> (accessed Dec 30, 2022).
- (113) Rutowski, R. L. Mate Choice and Lepidopteran Mating Behavior. *Florida Entomol.* **1982**, 65 (1), 72. <https://doi.org/10.2307/3494146>.
- (114) Vane-Wright, R. I.; Boppre, M. Visual and Chemical Signalling in Butterflies: Functional and Phylogenetic Perspectives. *Philos. Trans. - R. Soc. London, B* **1993**, 340 (1292), 197–205. <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0058>.
- (115) Birch, M. C.; Poppy, G. M.; Baker, T. C. Scents and Eversible Scent Structures of Male Moths. *Annu. Rev. Entomol. Vol.* 35 **1990**, 25–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.000325>.
- (116) Greenfield, M. . *Signalers and Receiver: Mechanisms and Evolution of Arthropod Communication*; 2002; Vol. 419.
- (117) Cannon, R. J. C. *Courtship and Mating in Butterflies*; The University of Chicago Press, 2020.
- (118) Wickman, P. C. The Influence of Temperature on the Territorial and Mate Locating Behaviour of the Small Heath Butterfly, *Coenonympha Pamphilus* (L.) (Lepidoptera: Satyridae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1985**, 16 (3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/BF00310985>.
- (119) Carol L. Boggs, Ward B. Watt, Paul R. Ehrlich, P. R. E. *Butterflies: Ecology and Evolution Taking Flight*; 2003; Vol. 41. <https://doi.org/10.5860/choice.41-2175>.

- (120) Sarto Monteys, V. I.; Quero, C.; Santa-Cruz, M. C.; Rosell, G.; Guerrero, A. Sexual Communication in Day-Flying Lepidoptera with Special Reference to Castniids or “Butterfly-Moths.” *Bull. Entomol. Res.* **2016**, 106 (4), 421–431. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000158>.
- (121) Kristensen, N. P. *Lepidoptera, Moths and Butterflies: Volume 2: Morphology, Physiology, and Development*; De Gruyter, 2012. <https://doi.org/10.1515/9783110893724>.
- (122) Foster, S. P.; Anderson, K. G. Differential Pheromone Sampling of the Gland of Female *Heliothis Virescens* Moths Reveals Glandular Differences in Composition and Quantity. *J. Chem. Ecol.* **2018**, 44 (5), 452–462. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0954-0>.
- (123) Comprehensive Natural Products Chemistry. *Choice Rev. Online* **1999**, 37 (02), 37-0939–0939. <https://doi.org/10.5860/choice.37-0939>.
- (124) 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 (6), 481–514. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00016-8).
- (125) Pliske, T. E.; Eisner, T. Sex Pheromone of the Queen Butterfly: Biology. *Science (80-.)*. **1969**, 164 (3884), 1170–1172. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.164.3884.1170>.
- (126) Nishida, R.; Schulz, S.; Kim, C. S.; Fukami, H.; Kuwahara, Y.; Honda, K.; Hayashi, N. Male Sex Pheromone of a Giant Danaine Butterfly, *Idea Leuconoe*. *J. Chem. Ecol.* 1996 225 **1996**, 22 (5), 949–972. <https://doi.org/10.1007/BF02029947>.
- (127) Andersson, J.; Borg-Karlson, A.-K.; Vongvanich, N.; Wiklund, C. Male Sex Pheromone Release and Female Mate Choice in a Butterfly. *J. Exp. Biol.* **2007**, 210 (6), 964–970. <https://doi.org/10.1242/JEB.02726>.
- (128) Taylor, L. R.; Vane-Wright, R. I.; Ackery, P. R. The Biology of Butterflies. *J. Anim. Ecol.* **1986**, 55 (2), 752. <https://doi.org/10.2307/4754>.
- (129) Burdfield-Steel, E.; Pakkanen, H.; Rojas, B.; Galarza, J. A.; Mappes, J. De Novo Synthesis of Chemical Defenses in an Aposematic Moth. *J. Insect Sci.* **2018**, 18 (2). <https://doi.org/10.1093/JISESA/IEY020>.
- (130) Trigo, J. R. The Chemistry of Antipredator Defense by Secondary Compounds in Neotropical Lepidoptera: Facts, Perspectives and Caveats. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11 (6), 551–561. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000600002>.
- (131) Trigo, J. R. The Chemistry of Antipredator Defense by Secondary Compounds in Neotropical Lepidoptera: Facts, Perspectives and Caveats. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11 (6), 551–561. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000600002>.
- (132) Larsen, E.; Calabrese, J. M.; Rhainds, M.; Fagan, W. F. How Protandry and Protogyny Affect Female Mating Failure: A Spatial Population Model. *Entomol. Exp. Appl.* **2013**, 146 (1), 130–140.

- <https://doi.org/10.1111/eea.12003>.
- (133) Allen, C. E.; Zwaan, B. J.; Brakefield, P. M. Evolution of Sexual Dimorphism in the Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **2011**, *56*, 445–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144828>.
- (134) Bento, J. M. S.; Parra, J. R. P.; Vilela, E. F.; Walder, J. M.; Leal, W. S. Sexual Behavior and Diel Activity of Citrus Fruit Borer: *Ecdyolopha Aurantiana*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27* (10), 2053–2065. <https://doi.org/10.1023/A:1012294921058>.
- (135) Srygley, R. B. Shivering and Its Cost during Reproductive Behaviour in Neotropical Owl Butterflies, *Caligo* and *Opsiphanes* (Nymphalidae: Brassoliniæ). *Anim. Behav.* **1994**, *47* (1), 23–32. <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1004>.
- (136) Srygley, R. B.; Penz, C. M. Lekking in Neotropical Owl Butterflies, *Caligo Illioneus* and *C. Oileus* (Lepidoptera: Brassoliniæ). *J. Insect Behav.* **1999**, *12* (1), 81–103. <https://doi.org/10.1023/A:1020981215501>.
- (137) Felton, A.; Alford, R. A.; Felton, A. M.; Schwarzkopf, L. Multiple Mate Choice Criteria and the Importance of Age for Male Mating Success in the Microhylid Frog, *Cophixalus Ornatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2006**, *59* (6), 786–795. <https://doi.org/10.1007/s00265-005-0124-6>.
- (138) Sandoval, Y. Comportamiento Sexual y Éxito Reproductivo Del Barrenador de La Caña *Diatraea Saccharalis* (Fabricius 1794) (Lepidoptera: Crambidae) En Laboratorio, 2020.
- (139) Vanjari, S.; Mann, F.; Merrill, R. M.; Schulz, S.; Jiggins, C. D. Male Sex Pheromone Components in the Butterfly *Heliconius Melpomene*. *bioRxiv* **2015**, 033506. <https://doi.org/10.1101/033506>.
- (140) Fagerström, T.; Wiklund, C. Why Do Males Emerge before Females? Protandry as a Mating Strategy in Male and Female Butterflies. *Oecologia* **1982**, *52* (2), 164–166. <https://doi.org/10.1007/BF00363830>.
- (141) ZONNEVELD, C. Polyandry and Protandry in Butterflies. *Bull. Math. Biol.* **1992**, *54* (6), 957–976. [https://doi.org/10.1016/s0092-8240\(05\)80090-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8240(05)80090-4).
- (142) Penz, C. M.; Williams, S. F. Wing Morphology and Body Design in *Opsiphanes* and *Caligo* Butterflies Match the Demands of Male Mating Displays (Lepidoptera: Nymphalidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2020**, *113* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1093/AESA/SAZ073>.
- (143) Benson, W. W.; Marini-filho, O. J.; Carvalho, R. M. De. Territoriality by the Dawn's Early Light: The Neotropical Owl Butter Y. *October* **1997**, 1995 (June 1994), 14–20.
- (144) Crees, L. D.; Devries, P.; Penz, C. M. Do Hind Wing Eyespots of *Caligo* Butterflies Function in Both Mating Behavior and Antipredator Defense? (Lepidoptera, Nymphalidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2021**, *114* (3), 329–337. <https://doi.org/10.1093/aesa/saaa050>.
- (145) Rhainds, M. Female Mating Failures in Insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2010, pp

- 211–226. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01032.x>.
- (146) Shapiro, A. M. The Role of Sexual Behavior in Density-Related Dispersal of Pierid Butterflies. *Am. Nat.* **1970**, 104 (938), 367–372. <https://doi.org/10.1086/282670>.
- (147) Solensky, M. J. The Effect of Behavior and Ecology on Male Mating Success in Overwintering Monarch Butterflies (*Danaus Plexippus*). *J. Insect Behav.* **2004**, 17 (6), 723–743. <https://doi.org/10.1023/B:JOIR.0000048985.58159.0d>.
- (148) Cameron, P. J.; Wallace, A. R.; Madhusudhan, V. V.; Wigley, P. J.; Qureshi, M. S.; Walker, G. P. Mating Frequency in Dispersing Potato Tuber Moth, *Phthorimaea Operculella*, and Its Influence on the Design of Refugia to Manage Resistance in Bt Transgenic Crops. *Entomol. Exp. Appl.* **2005**, 115 (2), 323–332. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00256.x>.
- (149) Kvedaras, O. L.; Gregg, P. C.; Del Socorro, A. P. Techniques Used to Determine the Mating Behaviour of *Helicoverpa Armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Relation to Host Plants. *Aust. J. Entomol.* **2000**, 39 (3), 188–194. <https://doi.org/10.1046/j.1440-6055.2000.00156.x>.
- (150) Zeng, B.; Zhu, W.; Fu, Y.; Zhou Id, S. Influence of High-Temperature Exposure on the Mating, Oviposition and Thermotaxis of *Bactrocera Cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae). **2018**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204065>.
- (151) Mbata, G. N. Combined Effect of Temperature and Relative Humidity on Mating Activities and Commencement of Oviposition in *Plodia Interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Phycitidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* **1986**, 7 (05), 623–628. <https://doi.org/10.1017/S1742758400011553>.
- (152) Wu, S.; Refinetti, R.; Kok, L. T.; Youngman, R. R.; Reddy, G. V. P.; Xue, F.-S. Photoperiod and Temperature Effects on the Adult Ecllosion and Mating Rhythms in *Pseudopidorus Fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae). *Environ. Entomol.* **2014**, 43 (6), 1650–1655. <https://doi.org/10.1603/EN14164>.
- (153) Royer, L.; McNeil, J. N. Effect of Relative Humidity Conditions on Responsiveness of European Corn Borer (*Ostrinia Nubilalis*) Males to Female Sex Pheromone in a Wind Tunnel. *J. Chem. Ecol.* **1993**, 19 (1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/BF00987471>.
- (154) WELLINGTON, W. G. The Effects of Variations in Atmospheric Pressure upon Insects. *Can. J. Res.* **1946**, 24 (Sect D), 51–70. <https://doi.org/10.1139/cjr46d-006>.
- (155) Pellegrino, A. C.; Gomes, M. F.; Peñ Aflor, V.; Nardi, C.; Bezner-Kerr, W.; Guglielmo, C. G.; Simō Es Bento, J. M.; Mcneil, J. N. Weather Forecasting by Insects: Modified Sexual Behaviour in Response to Atmospheric Pressure Changes. **2013**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075004>.
- (156) Miao, J.; Guo, P.; Li, H.; Wei, C.; Liu, Q.; Gong, Z.; Duan, Y.; Li, T.; Jiang, Y.; Feng, H.; Wu, Y. Low Barometric Pressure Enhances Tethered-Flight Performance and Reproductive of the Oriental

- Armyworm, *Mythimna Separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **2021**, 114 (2), 620–626. <https://doi.org/10.1093/JEE/TOAA291>.
- (157) Climate-Data.org. Clima Puerto Gaitán: Temperatura, Climograma y Tabla climática para Puerto Gaitán <https://es.climate-data.org/america-del-sur/colombia/meta/puerto-gaitan-49962/> (accessed Aug 30, 2021).
- (158) Baker, R. R. Insect Territoriality. *Annu. Rev. Entomol. Vol. 28* **1983**, 65–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.000433>.
- (159) Stepien, T. L.; Zmurchok, C.; Hengenius, J. B.; Rivera, R. M. C.; D’Orsogna, M. R.; Lindsay, A. E. Moth Mating: Modeling Female Pheromone Calling and Male Navigational Strategies to Optimize Reproductive Success. *Appl. Sci.* **2020**, 10 (18), 6543. <https://doi.org/10.3390/APP10186543>.
- (160) *Advances in Insect Chemical Ecology*; Carde, R. T., Millar, J. G., Eds.; Cambridge University Press, 2004. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511542664>.
- (161) Cardé, R. T.; Baker, T. C. Sexual Communication with Pheromones. In *Chemical Ecology of Insects*; Springer, Boston, MA, 1984; pp 355–383. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3368-3_13.
- (162) Saveer, A. M.; Becher, P. G.; Birgersson, G.; Hansson, B. S.; Witzgall, P.; Bengtsson, M. Mate Recognition and Reproductive Isolation in the Sibling Species *Spodoptera Littoralis* and *Spodoptera Litura*. *Front. Ecol. Evol.* **2014**, 2 (MAY), 18. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2014.00018/BIBTEX>.
- (163) Guo, J. M.; Liu, X. L.; Liu, S. R.; Wei, Z. Q.; Han, W. K.; Guo, Y.; Dong, S. L. Functional Characterization of Sex Pheromone Receptors in the Fall Armyworm (*Spodoptera Frugiperda*). *Insects* **2020**, 11 (3). <https://doi.org/10.3390/insects11030193>.
- (164) Fitzpatrick, S. M.; McNeil, J. N. MALE SCENT IN LEPIDOPTERAN COMMUNICATION: THE ROLE OF MALE PHEROMONE IN MATING BEHAVIOUR OF PSEUDALETIA UNIPUNCTA (HAW.) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). *Mem. Entomol. Soc. Canada* **1988**, 120 (S146), 131–151. <https://doi.org/10.4039/ENTM120146131-1>.
- (165) Lee, M. S.; Albajes, R.; Eizaguirre, M. Mating Behaviour of Female *Tuta Absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Polyandry Increases Reproductive Output. *J. Pest Sci.* 2014 873 **2014**, 87 (3), 429–439. <https://doi.org/10.1007/S10340-014-0576-4>.
- (166) McNeil, J. N. Behavioral Ecology of Pheromone-Mediated Communication in Moths and Its Importance in the Use of Pheromone Traps. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002203> **2003**, 36 (1), 407–430. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.EN.36.010191.002203>.
- (167) Dion, E.; Monteiro, A.; Nieberding, C. M. The Role of Learning on Insect and Spider Sexual

- Behaviors, Sexual Trait Evolution, and Speciation. *Front. Ecol. Evol.* **2019**, 6 (JAN), 225. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2018.00225/BIBTEX>.
- (168) Symonds, M. R. E.; Elgar, M. A. The Evolution of Pheromone Diversity. *Trends in Ecology and Evolution*. April 2008, pp 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.11.009>.
- (169) Domínguez, A.; López, S.; Bernabé, A.; Guerrero, Á.; Quero, C. Influence of Age, Host Plant and Mating Status in Pheromone Production and New Insights on Perception Plasticity in *Tuta Absoluta*. *Insects* 2019, Vol. 10, Page 256 **2019**, 10 (8), 256. <https://doi.org/10.3390/INSECTS10080256>.
- (170) Nieberding, C. M.; de Vos, H.; Schneider, M. V.; Lassance, J. M.; Estramil, N.; Andersson, J.; Bång, J.; Hedenström, E.; Löfstedt, C.; Brakefield, P. M. The Male Sex Pheromone of the Butterfly *Bicyclus Anynana*: Towards an Evolutionary Analysis. *PLoS One* **2008**, 3 (7), e2751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002751>.
- (171) Yan, Q.; Fujino, A.; Naka, H.; Dong, S. L.; Ando, T. Chemical Analysis of the Female Sex Pheromone in *Palpita nigropunctalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Asia. Pac. Entomol.* **2018**, 21 (4), 1283–1288. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.10.001>.
- (172) Choi, K. S.; Lee, J. M.; Park, J. H.; Cho, J. R.; Song, J. H.; Kim, D. S.; Boo, K. S. Sex Pheromone Composition of the Cotton Caterpillar, *Palpita indica* (Lepidoptera: Pyralidae), in Korea. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2009**, 12 (4), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.07.003>.
- (173) van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1963**, 11 (C), 463–471. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x).
- (174) Kartika, T.; Shimizu, N.; Himmi, S. K.; Guswenrivo, I.; Tarmadi, D.; Yusuf, S.; Yoshimura, T. Influence of Age and Mating Status on Pheromone Production in a Powderpost Beetle *Lyctus Africanus* (Coleoptera: Lyctinae). *Insects* 2021, Vol. 12, Page 8 **2020**, 12 (1), 8. <https://doi.org/10.3390/INSECTS12010008>.
- (175) TURGEON, J. J.; McNEIL, J. N.; ROELOFSt, W. L. Responsiveness of *Pseudaletia Unipuncta* Males to the Female Sex Pheromone. *Physiol. Entomol.* **1983**, 8 (3), 339–344. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3032.1983.TB00366.X>.
- (176) Rodriguez, S. A.; Paliza, M. L.; Nazareno, M. A. Influence of Adsorbent Nature on the Dynamic Headspace Study of Insect Semiochemicals. *Aust. J. Chem.* **2017**, 70 (8), 902–907. <https://doi.org/10.1071/CH17064>.
- (177) Rebouças, L. M. C.; Caraciolo, M. do S. B.; Sant’Ana, A. E. G.; Pickett, J. A.; Wadhams, L. J.; Pow, E. M. Composição Química Da Glândula Abdominal Da Fêmea Da Mariposa *Castnia Licus* (Drury) (Lepidoptera:Castniidae): Possíveis Feromônios e Precusores. *Quim. Nova* **1999**, 22 (5), 645–

648. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000500003>.
- (178) Phelan, P. L.; Roelofs, C. J.; Youngman, R. R.; Baker, T. C. Characterization of Chemicals Mediating Ovipositional Host-Plant Finding By Amyeloides Transitella Females. *J. Chem. Ecol.* 1991 173 **1991**, 17 (3), 599–613. <https://doi.org/10.1007/BF00982129>.
- (179) Pherobase. Semiochemicals of Genus Amauris <https://www.pherobase.com/database/genus/genus-Amauris.php> (accessed Apr 4, 2022).
- (180) Moritz, R. F. A.; Kirchner, W. H.; Crewe, R. M. Chemical Camouflage of the Death's Head Hawkmoth (*Acherontia Atropos* L.) in Honeybee Colonies. *Naturwissenschaften* 1991 784 **1991**, 78 (4), 179–182. <https://doi.org/10.1007/BF01136209>.
- (181) Paré, P. W.; Tumlinson, J. H. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. *Plant Physiology*. Oxford Academic October 1, 1999, pp 325–331. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.325>.
- (182) Andersson, S.; Nilsson, L. A. A.; Groth, I.; Bergström, G. Floral Scents in Butterfly-Pollinated Plants: Possible Convergence in Chemical Composition. *Bot. J. Linn. Soc.* **2002**, 140 (2), 129–153. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.00068.x>.
- (183) Schulz, S.; Estrada, C.; Yildizhan, S.; Boppré, M.; Gilbert, L. E. An Antiaphrodisiac in Heliconius Melpomene Butterflies. *J. Chem. Ecol.* **2008**, 34 (1), 82–93. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9393-z>.
- (184) Böröczky, K. Pheromone Communication in Moths: Evolution, Behavior, and Application. *Am. Entomol.* **2017**, 63 (4), 260–261. <https://doi.org/10.1093/ae/tmx069>.
- (185) Chan, W. K.; Tan, L. T. H.; Chan, K. G.; Lee, L. H.; Goh, B. H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules* **2016**, 21 (5), 529. <https://doi.org/10.3390/molecules21050529>.
- (186) Fraser, A. M.; Mechaber, W. L.; Hildebrand, J. G. Electroantennographic and Behavioral Responses of the Sphinx Moth *Manduca sexta* to Host Plant Headpace Volatiles. *J. Chem. Ecol.* 2003 298 **2003**, 29 (8), 1813–1833. <https://doi.org/10.1023/A:1024898127549>.
- (187) Ramachandran, R.; Khan, Z. R.; Caballero, P.; Juliano, B. O. Olfactory Sensitivity of Two Sympatric Species of Rice Leaf Folders (Lepidoptera: Pyralidae) to Plant Volatiles. *J. Chem. Ecol.* 1990 169 **1990**, 16 (9), 2647–2666. <https://doi.org/10.1007/BF00988076>.
- (188) Tabacchi, R.; Saturnin, C.; Porret, C. L.; Biedermann, M.; Sponsler, S.; Bitzer, L. A Guide to the Analysis of Chiral Compounds by GC. *Restek Cor* **2010**, 1–23.
- (189) Raoul, S.; Dall, X.; Nelson, X. J.; Wyatt, T. D.; Elgar, M. A.; Henneken, J.; Goodger, J. Q. D.; Jones, T. M. Diet-Mediated Pheromones and Signature Mixtures Can Enforce Signal Reliability. *Front. Ecol. Evol.* | www.frontiersin.org **2017**, 1, 145. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00145>.

- (190) South, S. H.; House, C. M.; Moore, A. J.; Simpson, S. J.; Hunt, J. Male Cockroaches Prefer a High Carbohydrate Diet That Makes Them More Attractive to Females: Implications for the Study of Condition Dependence. *Evolution* (N. Y). **2011**, 65 (6), 1594–1606. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01233.x>.
- (191) Kopena, R.; Martín, J.; López, P.; Herczeg, G. Vitamin E Supplementation Increases the Attractiveness of Males' Scent for Female European Green Lizards. *PLoS One* **2011**, 6 (4), e19410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019410>.
- (192) Liedo, P.; Orozco, D.; Cruz-López, L.; Quintero, J. L.; Becerra-Pérez, C.; del Refugio Hernández, M.; Oropeza, A.; Toledo, J. Effect of Post-Teneral Diets on the Performance of Sterile *Anastrepha Ludens* and *Anastrepha Obliqua* Fruit Flies. *J. Appl. Entomol.* **2013**, 137 (SUPPL.1), 49–60. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01568.x>.
- (193) Blaul, B.; Steinbauer, R.; Merkl, P.; Merkl, R.; Tschochner, H.; Ruther, J. Oleic Acid Is a Precursor of Linoleic Acid and the Male Sex Pheromone in *Nasonia Vitripennis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2014**, 51 (1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.007>.
- (194) Eisner, T.; Meinwald, J. Alkaloid-Derived Pheromones and Sexual Selection in Lepidoptera. In *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*; Elsevier Inc., 2003; pp 341–368. <https://doi.org/10.1016/B978-012107151-6/50014-1>.
- (195) Buczkowski, G.; Kumar, R.; Suib, S. L.; Silverman, J. Diet-Related Modification of Cuticular Hydrocarbon Profiles of the Argentine Ant, *Linepithema Humile*, Diminishes Intercolony Aggression. *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31 (4), 829–843. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-3547-7>.
- (196) Frérot, B.; Leppik, E.; Groot, A. T.; Unbehend, M.; Holopainen, J. K. Chemical Signatures in Plant–Insect Interactions. *Adv. Bot. Res.* **2017**, 81, 139–177. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.10.003>.
- (197) Ono, T. Effect of Rearing Temperature on Pheromone Component Ratio in Potato Tuberworm Moth, *Phthorimaea Operculella*, (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Chem. Ecol.* **1993**, 19 (1), 71–81. <https://doi.org/10.1007/BF00987472>.
- (198) Hock, V.; Chouinard, G.; Lucas, É.; Cormier, D.; Leskey, T.; Wright, S.; Zhang, A.; Pichette, A. Establishing Abiotic and Biotic Factors Necessary for Reliable Male Pheromone Production and Attraction to Pheromones by Female Plum Curculios *Conotrachelus Nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Can. Entomol.* **2014**, 146 (5), 528–547. <https://doi.org/10.4039/tce.2014.1>.
- (199) Anderbrant, O.; Schlyter, F.; Birgersson, G.; Birgersson, G. Intraspecific Competition Affecting Parents and Offspring in the Bark Beetle *Ips Typographus*. *Oikos* **1985**, 45 (1), 89. <https://doi.org/10.2307/3565226>.
- (200) MILLER, J. Y. THE TAXONOMY, PHYLOGENY, AND ZOOGEOGRAPHY OF THE NEOTROPICAL MOTH

- SUBFAMILY CASTNIINAE (LEPIDOPTERA: CASTNIOIDEA: CASTNIIDAE) (CLADISTICS); 1986.
- (201) i Monteys, V.; Acín, P.; Rosell, G.; Quero, C.; Jiménez, M. A.; Guerrero, A. Moths Behaving like Butterflies. Evolutionary Loss of Long Range Attractant Pheromones in Castniid Moths: A Paysandisia Archon Model. *PLoS One* **2012**, 7 (1), e29282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029282>.
- (202) Agostini-Costa, T. da S. Bioactive Compounds and Health Benefits of Some Palm Species Traditionally Used in Africa and the Americas – A Review. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, 224, 202–229. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.05.035>.
- (203) Walton, N. J.; Mayer, M. J.; Narbad, A. Vanillin. *Phytochemistry*. Pergamon July 1, 2003, pp 505–515. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3).
- (204) Sasaerila, Y.; Gries, R.; Gries, G.; Khaskin, G.; King, S.; Takács, S.; Hardi. Sex Pheromone Components of Male Tirathaba Mundella (Lepidoptera: Pyralidae). *Chemoecology* **2003**, 13 (2), 89–93. <https://doi.org/10.1007/s00049-003-0233-5>.
- (205) Sugisawa, H.; Nakamura, K.; Tamura, H. The Aroma Profile of the Volatiles in Marine Green Algae (Ulva Pertusa). *Food Rev. Int.* **1990**, 6 (4), 573–589. <https://doi.org/10.1080/87559129009540893>.
- (206) SAKATA, T.; TAGAMI, K.; KUWAHARA, Y. Chemical Ecology of Oribatid Mites. I. Oil Gland Components of Hydronthrus Crispus Aoki. *J. Acarol. Soc. Japan* **1995**, 4 (2), 69–75. <https://doi.org/10.2300/acari.4.69>.
- (207) Eisner, T.; Pliske, T. E.; Ikeda, M.; Owen, D. F.; Vázquez, L.; Pérez, H.; Franclemont, J. G.; Meinwald, J. Defense Mechanisms of Arthropods. XXVII. Osmeterial Secretions of Papilionid Caterpillars (Baronia, Papilio, Eurytides)1. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1970**, 63 (3), 914–915. <https://doi.org/10.1093/aesa/63.3.914>.
- (208) Schmera, D.; Guerin, P. M. Plant Volatile Compounds Shorten Reaction Time and Enhance Attraction of the Codling Moth (Cydia Pomonella) to Codlemone. *Pest Manag. Sci.* **2012**, 68 (3), 454–461. <https://doi.org/10.1002/ps.2292>.
- (209) Ring T. Cardé, J. G. M. *Advances in Insect Chemical Ecology*; 2004. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511542664>.
- (210) De Pasqual, C.; Groot, A. T.; Mappes, J.; Burdfield-Steel, E. Evolutionary Importance of Intraspecific Variation in Sex Pheromones. *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Current Trends September 1, 2021, pp 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.05.005>.
- (211) McElfresh, J. S.; Millar, J. G. Geographic Variation in the Pheromone System of the Saturniid Moth Hemileuca Eglanterina. *Ecology* **2001**, 82 (12), 3505–3518. <https://doi.org/10.2307/2680168>.
- (212) Palacio Cortés, A. M.; Zarbin, P. H. G.; Takiya, D. M.; Bento, J. M. S.; Guidolin, A. S.; Consoli, F. L.

- Geographic Variation of Sex Pheromone and Mitochondrial DNA in *Diatraea Saccharalis* (Fab., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). *J. Insect Physiol.* **2010**, 56 (11), 1624–1630. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.005>.
- (213) Cruz-Esteban, S.; Rojas, J. C.; Sánchez-Guillén, D.; Cruz-López, L.; Malo, E. A. Geographic Variation in Pheromone Component Ratio and Antennal Responses, but Not in Attraction, to Sex Pheromones among Fall Armyworm Populations Infesting Corn in Mexico. *J. Pest Sci.* (2004). **2018**, 91 (3), 973–983. <https://doi.org/10.1007/S10340-018-0967-Z/FIGURES/2>.
- (214) Noorbakhsh, S.; Saber, M.; Farazmand, H.; Heidary Alizadeh, B. Intraspecific Geographic Variation in Sex Pheromone of the Carob Moth, *Ectomyelois Ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Crop Prot.* **2021**, 10(4), 771–786.
- (215) Barah, P.; Bones, A. M. Multidimensional Approaches for Studying Plant Defence against Insects: From Ecology to Omics and Synthetic Biology. *J. Exp. Bot.* **2015**, 66 (2), 479–493. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU489>.
- (216) Zvereva, E. L.; Kozlov, M. V. The Costs and Effectiveness of Chemical Defenses in Herbivorous Insects: A Meta-Analysis. *Ecol. Monogr.* **2016**, 86 (1), 107–124. <https://doi.org/10.1890/15-0911.1>.
- (217) Beran, F.; Petschenka, G. Sequestration of Plant Defense Compounds by Insects: From Mechanisms to Insect-Plant Coevolution. *Annual Review of Entomology*. 2022, pp 163–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-062821-062319>.
- (218) Groot, A. T.; Inglis, O.; Bowdridge, S.; Santangelo, R. G.; Blanco, C.; López, J. D.; Vargas, A. T.; Gould, F.; Schal, C. Geographic and Temporal Variation in Moth Chemical Communication. *Evolution* (N. Y.). **2009**, 63 (8), 1987–2003. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00702.x>.
- (219) Nojima, S.; Classen, A.; Groot, A. T.; Schal, C. Qualitative and Quantitative Analysis of Chemicals Emitted from the Pheromone Gland of Individual *Heliothis Subflexa* Females. *PLoS One* **2018**, 13 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202035>.
- (220) Hansson, B.; Wicher, D. Chemical Ecology in Insects. In *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*; Academic Press, 2016; pp 29–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801694-7.00002-0>.
- (221) Allison, J. D.; Cardé, R. T. Male Pheromone Blend Preference Function Measured in Choice and No-Choice Wind Tunnel Trials with Almond Moths, *Cadra Cautella*. *Anim. Behav.* **2008**, 75 (1), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.04.033>.
- (222) Malo, E. A.; Renou, M.; Guerrero, A. Analytical Studies of *Spodoptera Littoralis* Sex Pheromone Components by Electroantennography and Coupled Gas Chromatography-Electroantennographic Detection. *Talanta* **2000**, 52 (3), 525–532.

- [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00401-X).
- (223) Malo, E. A.; Renou, M.; Guerrero, A. Analytical Studies of *Spodoptera Littoralis* Sex Pheromone Components by Electroantennography and Coupled Gas Chromatography-Electroantennographic Detection. *Talanta* **2000**, 52 (3), 525–532. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00401-X).
- (224) Eiras, Á. E. Calling Behaviour and Evaluation of Sex Pheromone Glands Extract of *Neoleucinodes Elegantis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae) in Wind Tunnel. *An. da Soc. Entomológica do Bras.* **2000**, 29 (3), 453–460. <https://doi.org/10.1590/s0301-80592000000300007>.
- (225) Fouad, H. A.; Faroni, L. R. D. A.; Vilela, E. F.; de Lima, E. R. Flight Responses of *Sitotroga Cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) to Corn Kernel Volatiles in a Wind Tunnel. *Arthropod. Plant. Interact.* **2013**, 7 (6), 651–658. <https://doi.org/10.1007/S11829-013-9275-Y/TABLES/2>.
- (226) Carlsson, M. A.; Schäpers, A.; Nässel, D. R.; Janz, N. Organization of the Olfactory System of Nymphalidae Butterflies. *Chem. Senses* **2013**, 38 (4), 355–367. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt008>.
- (227) Roelofs, W. L. *Electroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures for Pheromones*; Springer, New York, NY, 1984; pp 131–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7_5.
- (228) Cork, A.; Beevor, P. S.; Gough, A. J. E.; Hall, D. R. Gas Chromatography Linked to Electroantennography: A Versatile Technique for Identifying Insect Semiochemicals. In *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*; Springer, New York, NY, 1990; pp 271–279. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8062-7_26.
- (229) Cardé, R. T. Navigation along Windborne Plumes of Pheromone and Resource-Linked Odors. *Annual Review of Entomology*. 2021, pp 317–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024932>.
- (230) Conchou, L.; Lucas, P.; Deisig, N.; Demondion, E.; Ren, M. Effects of Multi-Component Backgrounds of Volatile Plant Compounds on Moth Pheromone Perception. *Insects* **2021**, 12 (5), 409. <https://doi.org/10.3390/insects12050409>.
- (231) Renou, M.; Anton, S. Insect Olfactory Communication in a Complex and Changing World. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier December 1, 2020, pp 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.04.004>.
- (232) Kamimura, M.; Tatsuki, S. Effects of Photoperiodic Changes on Calling Behavior and Pheromone Production in the Oriental Tobacco Budworm Moth, *Helicoverpa Assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.* **1994**, 40 (8), 731–734. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90101-5).

-
- (233) Gemeno, C.; Haynes, K. F. Impact of Photoperiod on the Sexual Behavior of the Black Cutworm Moth (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* **2001**, *30* (2), 189-195. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-30.2.189>.