

**RESPUESTAS COMPORTAMENTALES Y ELECTROFISIOLÓGICAS DE HEMBRAS DE *Trichoplusia ni* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A VOLÁTILES DE PLANTAS HOSPEDERAS**

Antonio Espinoza-Roblero, Armando Virgen, Leopoldo Cruz-López, Edi A. Malo & Julio C. Rojas. Grupo de Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas, Departamento de Agricultura, Sociedad y Ambiente, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR); Carretera Antigua Aeropuerto Km 2.5, CP 30700; Tapachula, Chiapas. er\_antonio85@hotmail.com, avirgen@ecosur.mx, lcruz@ecosur.mx, emr@ecosur.mx, jrojas@ecosur.mx

**RESUMEN:** En este estudio, se encontró que hembras de *Trichoplusia ni* evaluadas en túnel de vuelo fueron más atraídas a plantas de maíz que a plantas de soya y epazote. El análisis químico mostró que las plantas sanas de soya, maíz y epazote emiten 11, 16 y 22 compuestos volátiles, respectivamente. Sin embargo, solamente el  $\alpha$ -copaeno fue un compuesto común en las tres plantas. Los compuestos linalol,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -farneseno y geranil acetona fueron comunes entre soya y maíz; mientras que el salicilato de metilo fue común entre maíz y epazote, y  $\beta$ -ocimeno entre soya y epazote. La evaluación por electroantenografía de algunos de los compuestos identificados mostró que  $\beta$ -ocimene, salicilato de metilo,  $\alpha$ -farneseno, linalol y geranil acetona son los que mayor estimulación provocaron en las antenas de las hembras. La evaluación de una mezcla de estos cinco compuestos en el túnel de vuelo mostró que 40% y 25% de las hembras evaluadas fueron atraídas y aterrizaron en septos cargados con la mezcla.

Palabras clave: búsqueda de hospedero, olfacción, atracción, EAG, Lepidoptera, Noctuidae, maíz, soya, epazote.

**Behavioral and Electrophysiological Responses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) Females to Host Plant Volatiles**

**ABSTRACT:** In this study, we found that *Trichoplusia ni* females, when evaluated in a wind tunnel, were more attracted to maize plants than to soybean and epazote plants. Chemical analysis showed that soybean, maize, and epazote plants emitted 11, 16, and 22 volatile compounds, respectively. However, only  $\alpha$ -copaene was common among the plant species. Linalool,  $\beta$ -cariophyllene,  $\beta$ -farnesene and geranyl acetone were common between maize and soybean, whereas methyl salicylate was common between maize and epazote, and  $\beta$ -ocimene was common between soybean and epazote. Electrophysiological evaluation of selected compounds showed that  $\beta$ -ocimene, methyl salicylate,  $\alpha$ -farnesene, linalool and geranyl acetone elicited the highest female antennal responses. The behavioral evaluation in a wind tunnel of these five compounds formulated in a blend showed that 40% and 25% of evaluated females were attracted and landed on target.

Key words: host search, olfaction, attraction, maize, soybean, epazote.

**Introducción**

*Trichoplusia ni* Hübner es un insecto conocido comúnmente como el gusano medidor de la col, tiene una distribución geográfica que abarca América del Norte y Centroamérica. Este insecto es considerado como generalista en sus hábitos alimenticios debido a que se alimenta de una gran variedad de plantas de diferentes familias (Capinera, 2008). El proceso de búsqueda de una planta hospedera en los insectos es crucial para asegurar su supervivencia y la de su progenie, dado que este no solo percibe a la planta como un sustrato alimenticio, sino también como un lugar apropiado para oviposición y sitios de refugio (Schoonhoven *et al.*, 2005; Rojas, 2012). Durante este proceso un insecto puede usar señales visuales, olfativas y gustativas (Bernays y Chapman 1994). Este proceso puede verse afectado por factores intrínsecos y extrínsecos, tal como sucede en la atracción de las hembras a una planta hospedera influenciada por su amplitud de dieta (especialista o generalista). Los

estudios recientes sobre lepidópteros (revisado por Rojas, 2012), indican la necesidad de investigar el comportamiento de búsqueda de hospedero de lepidópteros generalistas. La naturaleza polifágica de *T. ni* la hace un modelo interesante para estudios de olfacción. ¿Los diferentes hospedantes emiten señales similares que son interpretadas por las hembras como una planta hospedera? Si esto es así ¿Cuáles son las diferencias que les permiten a las hembras distinguir entre especies de hospedantes y de diferente calidad? Si esto no es así ¿Cada planta hospedante tiene una señal química específica que el insecto puede diferenciar de otras especies?

En este estudio, inicialmente se observó la respuesta comportamental de hembras apareadas de *T. ni* a plantas de soya, maíz y epazote en un túnel de vuelo; posteriormente se identificó los compuestos volátiles emitidos por las plantas estudiadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas; y finalmente se evaluó la respuesta electrofisiológica y comportamental de las hembras de *T. ni* a algunos de los compuestos identificados.

## **Materiales y Método**

Los insectos de *T. ni* usados en este estudio fueron aportados por el insectario de El Colegio de la Frontera Sur en Tapachula, Chiapas. Los insectos fueron alimentados con una dieta artificial (Rojas *et al.*, 2003) y criados bajo condiciones controladas. Hembras apareadas de 3-5 días de edad fueron utilizadas para los experimentos. Plántulas de soya, maíz y epazote fueron trasplantadas en macetas de 13 cm de alto por 12 cm diámetro y mantenidas en jaulas forradas con malla mosquitera para evitar que las plantas fueran infestadas. Aproximadamente de 30-40 días después de sembradas, las plantas fueron utilizadas para extraer sus compuestos volátiles o para llevar a cabo los bioensayos en túnel de vuelo.

Las observaciones comportamentales fueron realizadas en túnel de viento de 184 cm de largo x 66 cm de ancho x 66 cm de alto. Las condiciones y el método para realizar los bioensayos han sido descritos por Rojas *et al.* (2003). Las observaciones se realizaron en pruebas de no elección: una maceta con una planta de soya, maíz o epazote fue colocada en el centro del túnel de vuelo, a una distancia de 10 cm cercana a la alimentación del aire. Los ensayos iniciaron al colocar un recipiente de plástico conteniendo una hembra sobre en una rejilla metálica sostenida por un soporte universal a una altura de 22 cm cercana a la salida del aire. La hembra fue liberada y observada por 5 min. Se tomaron en cuenta las hembras que despegaron, las que volaron en zigzag (atracción) y las que aterrizaron sobre la planta. Las plantas fueron usadas secuencialmente en orden aleatorio. El total, cinco repeticiones de 10 palomillas cada una fueron usadas para cada tratamiento (*e.g.*, maíz, tomate, epazote); por cada repetición una diferente planta fue usada. Las hembras fueron evaluadas individualmente y cada hembra fue usada una sola vez.

Los compuestos volátiles de las plantas fueron muestreados usando la técnica de microextracción en fase sólida usando una fibra de polidimetilsiloxano, previamente calentada a 250 °C en el cromatógrafo de gases por 3 min. La duración total de la colecta fue de 18 h bajo condiciones controladas. Las muestras fueron desorbidas por un minuto en el inyector del CG para su análisis. Se realizaron nueve muestreos por cada especie de planta. Los análisis fueron realizados en un CG Varian modelo CP-3800 acoplado con un espectrómetro de masas modelo Saturn 2200. Los volátiles fueron analizados usando una columna capilar no polar DB5-MS. Los análisis fueron realizados a una temperatura inicial de 50 °C (2 min) con un incremento de 15 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C (10 min). Helio fue usado como gas acarreador a 1 mL/min. La ionización fue por impacto de electrón a 70 eV, en el rango *m/z* 40-350. La identificación se llevó a cabo usando la biblioteca NIST y la confirmación de los mismos fue a través de estándares sintéticos.

La respuesta antenal de los insectos a algunos de los compuestos identificados se llevó a cabo por medio de electroantenografía (EAG). Las condiciones y método de evaluación han sido descritos por Malo *et al.* (2004). La punta y la base de la antena fueron fijadas entre dos electrodos metálicos con un gel electroconductor (Spectra 360). Las dos antenas de cada individuo fueron montadas en los electrodos. En un primer experimento, la antena de las hembras fue estimulada con una dosis de 10 µg de los compuestos seleccionados. Este experimento determinó la respuesta total de los receptores antenales a los compuestos usados, y sirvió para seleccionar a los compuestos más estimulantes para el segundo experimento, en el cual se evaluó el efecto de la dosis (0.01, 0.1, 1 y 10 µg) sobre la respuesta antenal. Las dosis de cada compuesto fue presentado secuencialmente de forma ascendente. La elección de los compuestos fue al azar. En ambos experimentos, se realizaron 10 repeticiones por tratamiento.

La respuesta de las hembras a una mezcla de compuestos sintéticos fue evaluada en el túnel de vuelo descrito anteriormente. La mezcla estuvo constituida por los cinco compuestos que tuvieron una mayor actividad en el estudio de dosis-respuesta. Los compuestos fueron colocados en un septo de caucho a una dosis de 200 µg por compuesto en una proporción 1:1:1:1:1. Las hembras fueron observadas por 5 min de manera individual. Los parámetros registrados fueron levantar el vuelo, atracción y aterrizaje sobre la rejilla metálica que contenía el septo. En total se hicieron 20 repeticiones.

Los resultados de los experimentos fueron analizados mediante el paquete estadístico Minitab 15, 2007. Los datos comportamentales y de EAG fueron sometidos a una análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Antes del ANOVA se comprobó que los datos cumplían con los supuestos de este análisis. La comparación de medias fue realizado por una prueba de Tukey (P < 0.05).

### Resultados y Discusión

Un mayor porcentaje de hembras levantaron vuelo cuando plantas de maíz y epazote fueron ofrecidas en comparación con las plantas de soya. Sin embargo, las plantas de maíz fueron más atractivas que las plantas de soya y epazote. Igualmente, las hembras aterrizaron diferencialmente en las plantas ofrecidas, prefiriendo aterrizar más frecuentemente en plantas de maíz que en epazote, pero el aterrizaje en las plantas de soya fue intermedio y no significativo entre las plantas de maíz y epazote (Cuadro 1).

Cuadro 1. Respuestas (%) promedio (±EE) de hembras apareadas de *Trichoplusia ni* a tres plantas hospederas.

Acto comportamental	Maíz	Soya	Epazote
Levantar vuelo	96±2.67 <sup>a</sup>	70±5.37 <sup>b</sup>	94±4.27 <sup>a</sup>
Atracción	56±4.99 <sup>a</sup>	30±8.03 <sup>b</sup>	30±6.83 <sup>b</sup>
Aterrizaje	46±6.0 <sup>a</sup>	26±7.33 <sup>ab</sup>	20±4.22 <sup>b</sup>

Promedios seguidos por la misma letra dentro de cada fila no son diferentes significativamente (P < 0.05, prueba de Tukey).

El análisis químico mostró que las plantas sanas de soya, maíz y epazote emiten 11, 16 y 22 compuestos volátiles, respectivamente. Sin embargo, solamente el α-copaeno fue un compuesto común en las tres plantas. Los compuestos linalol, β-cariofileno, β-farneseno y geranil acetona fueron comunes entre soya y maíz, mientras que el salicilato de metilo fue común entre maíz y epazote, y β-ocimeno entre soya y epazote.

La evaluación por EAG de algunos compuestos identificados en las plantas hospederas muestra que la antena de hembras de *T. ni* respondieron de manera diferencial a los compuestos evaluados. Numéricamente, las mayores respuestas antenales (1.5 mV) ocurrieron con los compuestos  $\beta$ -ocimene, salicilato de metilo,  $\alpha$ -farneseno, linalol y geranyl acetona. Estos compuestos, además de  $\alpha$ -humeleno y trans- $\beta$ -farneseno, fueron estadísticamente diferentes al control. El experimento de dosis respuesta mostró que a medida que se incremento la dosis se incremento la respuesta electrofisiológica (Fig. 2). En el caso del compuesto  $\beta$ -ocimeno, la respuesta más alta fue obtenida con la dosis de 10  $\mu$ g, seguida de la dosis de 1  $\mu$ g, las menores respuestas fueron obtenidas con las dosis de 0.01 y 0.1  $\mu$ g. En el caso del linalol y  $\alpha$ -farneseno la respuesta antenal más alta fue obtenida con la dosis de 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, no existiendo diferencia en las dosis 0.01, 0.1 y 1  $\mu$ g. Para el geranyl acetona y salicilato de metilo se encontró que la respuesta antenal más alta ocurrió con la dosis de 10  $\mu$ g/ $\mu$ L, la respuesta antenal a la dosis de 1  $\mu$ g fue superior a la dosis de 0.01 10  $\mu$ g, pero igual a la dosis de 0.1  $\mu$ g, no se encontró diferencia significativa entre las dosis de 0.01 y 0.1  $\mu$ g (Fig. 2).

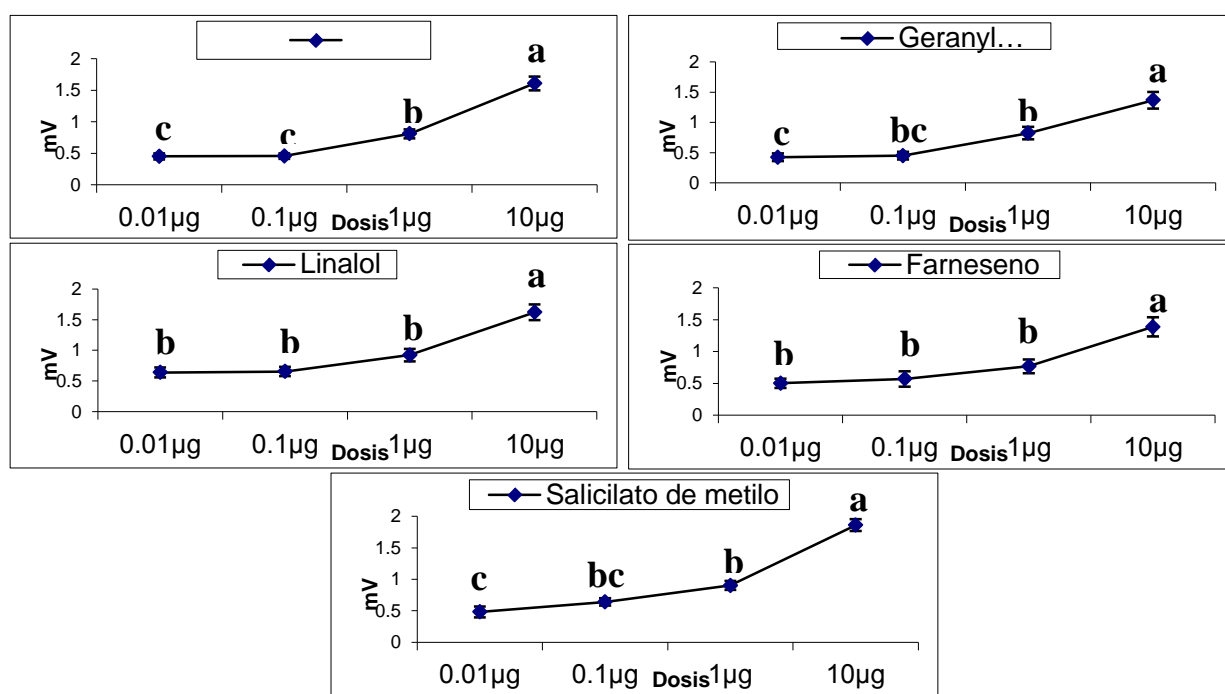


Figura 1. Respuestas antenales promedio ( $\pm$ EE) de las hembras de *Trichoplusia ni* a diferentes dosis del compuesto sintético. Diferencias significativas son indicadas por diferentes letras (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

Se encontró que el 95% de un total de 20 hembras a las que se les ofreció la mezcla de  $\beta$ -ocimeno, salicilato de metilo, linalol, geranyl acetona y  $\alpha$ -farneseno a la misma proporción levantaron vuelo; de estas el 40% fueron atraídas a los volátiles y 25% aterrizaron en el septo con los compuestos o cerca de este.

En este trabajo se observó que las hembras grávidas de *T. ni* fueron atraídas a plantas de maíz, soya y epazote ofrecidas en un túnel de vuelo. Las plantas de maíz parecen ser más atractivas que las plantas de soya y epazote en pruebas de no elección, sin embargo para confirmar este resultado será necesario realizar pruebas de doble elección (p. ej., maíz vs soya, maíz vs epazote). Previos estudios

han mostrado que las hembras apareadas de *T. ni* fueron atraídas a plantas de repollo, soya, tomate, papa y apio (Landolt, 1989; 2001). La preferencia que las hembras de esta especie presentan a una diversidad de plantas, de diferentes familias, enmarca ciertas interrogantes entre las cuales se encuentra si ¿Esta especie responde a una amplia gama de compuestos emitidos por cierta variedad de plantas? o ¿Presenta una detección limitada a ciertos compuestos claves o comunes en plantas? Los perfiles químicos obtenidos de compuestos volátiles de las plantas evaluadas en este trabajo mostraron que existe poca variedad de compuestos comunes entre las tres especies, lo que inclinaría a apoyar la segunda cuestión. Khan *et al.* (1987) reportan que los volátiles de un cultivo de soya resistente a *T. ni* son repelentes a las hembras adultas, mientras que los volátiles de un cultivo susceptible resultaron atractivos para éstas. En el caso de la repelencia del cultivo resistente, Liu *et al.* (1989) reportaron que esta era debido a la presencia de los compuestos 3-tetradeceno y de 1-dodeceno, mientras que la atracción del cultivo susceptible fue por la ausencia de los últimos compuestos, y a la presencia de 4-hexenol acetato, 2,2-dimetil hexanal y del 2-hexenal. Ninguno de los compuestos reportados por Liu *et al.* (1989) fueron encontrados en el presente estudio.

### Conclusiones

En conclusión, este estudio mostró que las hembras de *T. ni* son atraídas a los compuestos volátiles de maíz, soya, y epazote. El análisis químico de estas tres plantas mostró que ellas tienen pocos compuestos en común, lo que sugiere que el insecto responde a una amplia gama de compuestos emitidos por varias plantas. Un análisis electroantagráfico de algunos compuestos identificados mostró que algunos de ellos estimularon las neuronas sensoriales del insecto y los 5 compuestos más activos formulados en una mezcla fueron atractivos a las hembras de esta especie.

### Agradecimientos

A Antonio Santiesteban por su ayuda en la identificación química de los compuestos emitidos por las plantas estudiadas, y a Javier Valle Mora por su apoyo en el análisis estadístico de los datos. Este proyecto tuvo apoyo financiero del fondo sectorial SEP-CONACYT ciencia básica (proyecto No. 165450).

### Literatura Citada

- Bernays, E. A. and R. F. Chapman. 1994. Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. 1<sup>st</sup> Edition. Chapman and Hall, Nueva York, EUA.
- Capinera, J. L. 2008. Encyclopedia of Entomology. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer, Nueva York, EUA.
- Khan, Z. R., A. Ciepiela and D. M. Norris. 1987. Behavioral and physiological responses of cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Huebner), to steam distillates from resistant versus susceptible soybean varieties. *Journal of Chemical Ecology* 13:1903–1915.
- Landolt, P. J. 1989. Attraction of the cabbage looper to host plant and odor in the laboratory. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 53: 117-124.
- Landolt, P. J. 2001. Moth experience and not plant injury affected female cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) orientation to potato plants. *Florida Entomologist* 84: 373-379.
- Liu, S. H., D. M. Norris and P. Lyne. 1989. Volatiles from the foliage of soybean, *Glycine max*, and lima bean, *Phaseolus lunatus*: their behavioral effects on the insects *Trichoplusia ni* and *Epilachna varivestis*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 37: 496-501.
- Malo, E. A., A. Virgen, L. Cruz-López, V. Castrejón-Gómez and J.C. Rojas. 2004. Electrophysiological response of males and females *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

- Noctuidae) to conspecific and plant odors. *Annals of Entomological Society of America* 97: 1273-1284.
- Rojas, J. C. 2012. El papel del estímulo químico durante la búsqueda de hospedero por lepidópteros herbívoros. *Temas Selectos de Ecología Química de Insectos* (ed. por JC Rojas & EA Malo), pp. 287-314. El Colegio de la Frontera Sur, Tapachula, Chiapas.
- Rojas, J. C., A. Virgen and L. Cruz-López. 2003. Chemical and tactile cues influencing oviposition of a generalist moth, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 32: 1386-1392.
- Schoonhoven, L. M., J. J. A. van Loon and M. Dicke. 2005. *Insect Plant Biology*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.