

COMPUESTOS VOLÁTILES ATRAEN AL PICUDO (*Anthonomus eugenii* Cano) DEL CHILE (*Capsicum* spp.) Y PRESENTAN SINERGIA CON SU FEROMONA DE AGREGACIÓN

VOLATILE COMPOUNDS ATTRACT THE PEPPER (*Capsicum* spp.) WEEVIL (*Anthonomus eugenii* Cano) AND SYNERGIZE ITS AGGREGATION PHEROMONE

Manolo Muñiz-Merino^{1*}, Juan Cibrián-Tovar¹, Claudia Hidalgo-Moreno¹, Néstor Bautista-Martínez¹, Humberto Vaquera-Huerta¹, Cristóbal Aldama-Aguilera²

¹Entomología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México, México. (muniz.manolo@colpos.mx, jcibrian@colpos.mx, hidalgo@colpos.mx, hvaquera@colpos.mx, nestor@colpos.mx). ²Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Dr. Manuel Nava número 8, Zona Universitaria poniente. 78290. San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. (cristobal.aldama@uaslp.mx).

RESUMEN

El picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano) es la plaga principal del chile (*Capsicum* spp.) en América, y su manejo requiere técnicas eficientes de monitoreo. Los compuestos volátiles del hospedero podrían servir para ese fin. En esta investigación se evaluó la atracción de los adultos de *A. eugenii* hacia un compuesto individual y 12 mezclas de compuestos volátiles sintéticos (identificados anteriormente en *Capsicum* spp.), se determinó el efecto de tres isómeros [(Z)- β -ocimeno, (E)- β -ocimeno, y D-limoneno] en la respuesta del picudo, y se evaluó la mejor mezcla de volátiles del hospedero, su combinación con la feromona de agregación de *A. eugenii* y la feromona sola. La respuesta del insecto fue evaluada mediante experimentos de elección por pares, realizados en un olfatómetro tipo Y, con dos tratamientos. Las proporciones de insectos que respondieron a cada tratamiento se compararon con la prueba binomial. Los resultados mostraron que la mezcla de (Z)- β -ocimeno, D-limoneno y 2-isobutil-3-metoxipirazina atrajo ($p \leq 0.01$) a los adultos de *A. eugenii* de ambos sexos. El (Z)-3-hexenil acetato y el terpinoleno, adicionados individualmente a la combinación anterior, aumentaron la respuesta de las hembras ($p \leq 0.05$) y machos ($p \leq 0.01$), respectivamente. La inclusión de (E)- β -ocimeno como compuesto principal, en la misma mezcla, aumentó la respuesta de machos ($p \leq 0.05$) y la exclusión de D-limoneno no disminuyó la efectividad de la combinación remanente. En los experimentos finales, los machos tuvieron respuesta mayor a la mezcla de compuestos volátiles del hospedero

ABSTRACT

The pepper (*Capsicum* spp.) weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) is the principal pepper pest in America, and its management requires efficient monitoring techniques. The host volatile compounds could be used for this purpose. In this research the attraction of *A. eugenii* adults towards an individual compound and 12 mixtures of synthetic volatile compounds (identified previously in *Capsicum* spp.) was evaluated, the effect of three isomers [(Z)- β -ocimene, (E)- β -ocimene, and D-limonene] was determined in the weevil response, and the best mixture of host volatiles was evaluated, as well as their combination with the *A. eugenii* aggregation pheromone and the pheromone alone. The insect's response was evaluated through pairwise choice experiments, carried out in a Y-type olfactometer, with two treatments. The proportions of insects responding to each treatment were compared with the binomial test. Results showed that the mixture of (Z)- β -ocimene, D-limonene and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine attracted ($p \leq 0.01$) *A. eugenii* adults of both sexes. The (Z)-3-hexenyl acetate and the terpinolene, added individually to the prior combination, increased the response of females ($p \leq 0.05$) and males ($p \leq 0.01$), respectively. The inclusion of (E)- β -ocimene as principal compound, in the same mixture, increased the response by males ($p \leq 0.05$) and the exclusion of D-limonene did not decrease the effectiveness of the remaining combination. In the final experiments, males had a greater response to the mixture of host volatile compounds ($p \leq 0.05$) and to its combination with the *A. eugenii* aggregation pheromone ($p \leq 0.001$), than to the pheromone by itself; in contrast, females did not show a differentiation in their choice. The research allowed selecting pepper volatile compounds with potential to attract *A. eugenii* adults.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2013. Aprobado: noviembre, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 819-832. 2014.

($p \leq 0.05$) y a su combinación con la feromona de agregación de *A. eugenii* ($p \leq 0.001$), que a la feromona sola; en contraste, las hembras no mostraron diferencia en su elección. La investigación permitió seleccionar compuestos volátiles del chile con potencial atrayente sobre los adultos de *A. eugenii*.

Palabras clave: *Anthonomus eugenii*, atrayentes, *Capsicum*, (E)- β -ocimeno, 2-isobutil-3-metoxipirazina, (Z)- β -ocimeno.

INTRODUCCIÓN

El picudo del chile, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), es la plaga del cultivo de chile (*Capsicum* spp.: Solanaceae) más importante económicamente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Toapanta *et al.*, 2005), donde presenta entre cinco y ocho generaciones por año, en campo abierto, y más en invernadero (Riley y King, 1994). Las larvas ocasionan el daño principal al barrenar el interior de los frutos y propiciar su abscisión. Los adultos también afectan a las plantas al ovipositar, alimentarse en las yemas florales, flores y frutos pequeños, y provocar su abscisión (Gordon y Armstrong, 1990).

La detección oportuna del picudo del chile es fundamental para aplicar medidas de control. Las técnicas de monitoreo utilizadas en la actualidad son el muestreo visual y el uso de trampas cebadas con una feromona de agregación, aislada de los machos (Augustin *et al.*, 2012; Sunil *et al.*, 2014). El primer método es ineficiente, laborioso y poco confiable (Szendrei *et al.*, 2011), mientras que la efectividad del semioquímico varía con la fenología del cultivo, pues es atractivo antes de la fructificación y al final del ciclo productivo, pero su efecto disminuye durante el desarrollo de los frutos (Patrock *et al.*, 1992; Eller *et al.*, 1994).

Diversas investigaciones (Szendrei *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Collatz y Dorn, 2013; Wibe *et al.*, 2014) han mostrado que los compuestos volátiles del hospedero actúan como atrayentes o en sinergia con las feromonas de agregación de diferentes especies (González-Gaona *et al.*, 2010) y de los adultos de *Anthonomus* spp.

El chile, principal hospedero de *A. eugenii*, produce numerosos compuestos volátiles (Pino *et al.*, 2006; In-Kyung *et al.*, 2007; Adesso *et al.*, 2011). Al menos 14 de ellos son liberados durante la floración y fructificación (Adesso *et al.*, 2011),

Keywords: *Anthonomus eugenii*, attractants, *Capsicum*, (E)- β -ocimene, 2-isobutil-3-metoxipirazina, (Z)- β -ocimene.

INTRODUCTION

The pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), is the most important pest, in economic terms, of pepper crops (*Capsicum* spp.: Solanaceae) in tropical and subtropical regions of America (Toapanta *et al.*, 2005), where it presents between five and eight generations per year, in open-field conditions, and more in greenhouses (Riley and King, 1994). Larvae cause the main damage as they bore the inside of the fruits and foster their abscission. Adults also affect plants when laying eggs, feeding off the floral buds, flowers and small fruits, and causing their abscission (Gordon and Armstrong, 1990).

The timely detection of the pepper weevil is fundamental to apply control measures. The monitoring techniques used currently are visual sampling and the use of traps baited with an aggregation pheromone, isolated from males (Augustin *et al.*, 2012; Sunil *et al.*, 2014). The first method is inefficient, laborious and unreliable (Szendrei *et al.*, 2011), while the effectiveness of the semiochemical varies with the crop's phenology, since it is attractive before fructification and at the end of the productive cycle, although its effect decreases during fruit development (Patrock *et al.*, 1992; Eller *et al.*, 1994).

Various studies (Szendrei *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Collatz and Dorn, 2013; Wibe *et al.*, 2014) have shown that host volatile compounds act like attractants or in synergy with the aggregation pheromones of different species (González-Gaona *et al.*, 2010) and *Anthonomus* spp. adults.

Pepper, the main host of *A. eugenii*, produces numerous volatile compounds (Pino *et al.*, 2006; In-Kyung *et al.*, 2007; Adesso *et al.*, 2011). At least 14 of them are released during flowering and fructification (Adesso *et al.*, 2011), phenological stages when pepper plants are highly attractive to *A. eugenii* adults (Adesso and McAuslane, 2009). The principal compound during these stages is (E)- β -ocimene (Adesso *et al.*, 2011). This monoterpene, its stereoisomer (Z)- β -ocimene, and its structural isomer D-limonene have shown variable stimulating

etapas fenológicas en las que las plantas de Chile son altamente atractivas para los adultos de *A. eugenii* (Addesso y McAuslane, 2009). El compuesto principal durante esas etapas es (E)- β -ocimeno (Addesso *et al.*, 2011). Este monoterpene, su estereoisómero (Z)- β -ocimeno y su isómero estructural D-limoneno, han mostrado efecto estimulante variable sobre los adultos de algunas especies de *Anthonomus* (Bichão *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2012). Otros compuestos volátiles de *Capsicum* spp. también inducen actividad conductual o electrofisiológica en diferentes especies del género *Anthonomus* (Szendrei *et al.*, 2009 y 2011; Collatz y Dorn, 2013; Sunil *et al.*, 2014). Los compuestos volátiles de Chile podrían funcionar como atrayentes de los adultos de *A. eugenii* o aumentar la efectividad atrayente de su feromona de agregación, y no se han usado para el manejo de esta especie.

La presente investigación tuvo como objetivos: 1) evaluar la atracción de los adultos de *A. eugenii* hacia un compuesto individual y 12 combinaciones de compuestos volátiles sintéticos; 2) determinar el efecto de los isómeros (Z)- β -ocimeno, (E)- β -ocimeno, y D-limoneno en la respuesta atrayente de los adultos de *A. eugenii*; y 3) evaluar el potencial atrayente de la mejor mezcla de compuestos volátiles sintéticos y de su combinación con la feromona de agregación del picudo del Chile, en comparación con la feromona sola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (km 36.5, carretera México-Texcoco; Montecillo, Texcoco, Estado de México, México), entre abril y septiembre de 2012.

Insectos

Para obtener los insectos necesarios, se recolectaron frutos de Chile (*C. annuum*) jalapeño, güero y morrón, infestados con larvas de *A. eugenii*. Las recolectas se realizaron en Los Mochis, Sinaloa, y Yurécuaro, Michoacán, México. Los frutos se trasladaron al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, y se colocaron en jaulas de acrílico hexagonales (9 L de capacidad) en condiciones controladas de temperatura (26 ± 2 °C) y fotoperíodo (13:11 h luz: oscuridad). Diariamente se retiraron los adultos emergidos, se trasladaron a recipientes nuevos y se alimentaron con frutos de pimiento morrón y agua destilada hasta su uso. Los adultos

effect on adults of some *Anthonomus* species (Bichão *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2012). Other volatile compounds from *Capsicum* spp. also induce behavioral or electrophysiological activity in different species from the *Anthonomus* genus (Szendrei *et al.*, 2009 and 2011; Collatz and Dorn, 2013; Sunil *et al.*, 2014). The pepper volatile compounds could work as attractants for *A. eugenii* adults or increase the attraction effectiveness of its aggregation pheromone, and they have not been used for management of this species.

This research had the following objectives: 1) to evaluate the attraction of *A. eugenii* adults towards an individual compound and 12 combinations of synthetic volatile compounds; 2) to determine the effect of isomers (Z)- β -ocimene, (E)- β -ocimene, and D-limonene in the appealing response of *A. eugenii* adults; and 3) to evaluate the attracting potential of the best mixture of synthetic volatile compounds and their combination with the aggregation pheromone of the pepper weevil, in comparison with the pheromone alone.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were carried out in the facilities of Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (km 36.5, Carretera Mexico-Texcoco; Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico, Mexico), between April and September, 2012.

Insects

In order to obtain the necessary insects, jalapeño, güero and morrón pepper fruits (*C. annuum*), infested with *A. eugenii* larvae, were collected. The collections were performed in Los Mochis, Sinaloa, and Yurécuaro, Michoacán, México. The fruits were transported to Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, and were placed in hexagonal acrylic cages (9 L of capacity) under controlled conditions of temperature (26 ± 2 °C) and photoperiod (13:11 h light:dark). Daily, the adults that had emerged were removed, translated into new containers and fed with morrón pepper fruits and distilled water up to use. The adults were separated by sex according to characteristics described by Eller (1995) and they were left for 18 h without food or water, before testing.

Chemical compounds

The following commercial formulations of synthetic compounds were used (their content and purity are indicated):

se separaron por sexo de acuerdo con las características descritas por Eller (1995) y se dejaron 18 h sin alimento ni agua, antes de las pruebas.

Compuestos químicos

Las siguientes formulaciones comerciales de compuestos sintéticos (se indica su contenido y pureza) fueron usadas: trans- β -ocimeno [mezcla de (E)- β -ocimeno (89.1 %) y (Z)- β -ocimeno (10.2 %)], cis- β -ocimeno [mezcla de (Z)- β -ocimeno (63.4 %) y D-limoneno (26.6 %)], D-limoneno (98 %), 2-isobutil-3-metoxipirazina (99 %), β -ionona (90 %), tetrametil pirazina (98 %), hexil butirato (98 %), (Z)-3-hexenil acetato (98 %), (Z)-3-hexenol (98 %), terpinoleno (90 %), (Z)-3-hexenil butirato (98 %), linalool (97 %), 1-hexanol (98 %) y salicilato de metilo (98 %). Aceite mineral (viscosidad de 100-145 mPa.s, a 20 °C; Sigma-Aldrich®) fue usado como disolvente. El trans- β -ocimeno se adquirió con la empresa CHEMOS GmbH (Regenstauf, Alemania), y el resto de los compuestos y el aceite mineral, con Sigma-Aldrich de México (Toluca, Estado de México, México). Las adquisiciones se realizaron entre 2010 y 2012. Los compuestos se almacenaron a -10 °C hasta su uso.

Pruebas de atracción

Se evaluó la respuesta atrayente de los adultos de *A. eugenii* a un compuesto individual y a mezclas de compuestos volátiles sintéticos (Cuadro 1). La cantidad de cada compuesto, usada en la preparación de las mezclas, se determinó con base en su cuantificación en muestras de pimiento morrón cv California Wonder (a cuyos olores responden los adultos de *A. eugenii*, de acuerdo con ensayos de comportamiento). Los compuestos β -ionona, tetrametil pirazina y hexil butirato no se encontraron en esas muestras, por lo que sus concentraciones fueron similares a las reportadas por Cardeal *et al.* (2006), Pino *et al.* (2006) y Fernández-Trujillo (2007). Las cantidades de los compuestos (Z)- β -ocimeno (11.5 μ g) y D-limoneno (29.5 μ g) (Cuadro 1) estuvieron determinadas por su contenido en las formulaciones comerciales usadas. Las soluciones a evaluar se prepararon diluyendo los compuestos en aceite mineral.

La atracción del insecto hacia los compuestos sintéticos se evaluó mediante cinco series de experimentos de elección por pares (Addesso *et al.*, 2011) (Cuadro 1), realizadas en un olfatómetro de vidrio, tipo Y (tubo central y brazos de 12 y 10 cm de longitud, respectivamente, y 2.5 cm de diámetro interno), operado conforme a las condiciones y metodología descritas por Addesso y McAuslane (2009). Este arreglo permitió escoger uno o más estímulos atrayentes de los adultos de *A. eugenii* al finalizar cada serie experimental, y utilizarlo como testigo o como

trans- β -ocimene [mixture of (E)- β -ocimene (89.1 %) and (Z)- β -ocimene (10.2 %)], cis- β -ocimene [mixture of (Z)- β -ocimene (63.4 %) and D-limonene (26.6 %)], D-limonene (98 %), 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (99 %), β -ionone (90 %), tetramethyl pyrazine (98 %), hexyl butyrate (98 %), (Z)-3-hexenil acetate (98 %), (Z)-3-hexenol (98 %), terpinolene (90 %), (Z)-3-hexenil butyrate (98 %), linalool (97 %), 1-hexanol (98 %) and methyl salicylate (98 %). Mineral oil (viscosity of 100-145 mPa.s, at 20 °C; Sigma-Aldrich®), was used as solvent. The trans- β -ocimene was purchased from the CHEMOS GmbH Company (Regenstauf, Germany), and the rest of the compounds and the mineral oil from Sigma-Aldrich in Mexico (Toluca, Estado de Mexico, Mexico). Purchases were done between 2010 and 2012. The compounds were stored at -10 °C until they were used.

Attraction tests

The attraction response of *A. eugenii* adults to an individual compound and mixtures of synthetic volatile compounds was evaluated (Table 1). The amount of each compound used in the preparation of mixtures was determined based on their quantification in samples of *morrón* pepper cv California Wonder (to whose odors *A. eugenii* adults respond, according to prior behavior assays). The compounds β -ionone, tetramethyl pyrazine and hexyl butyrate were not found in these samples, so their concentrations were similar to those reported by Cardeal *et al.* (2006), Pino *et al.* (2006) and Fernández-Trujillo (2007). The amounts of the compounds (Z)- β -ocimene (11.5 μ g) and D-limonene (29.5 μ g) (Table 1) were determined by their content in the commercial formulations that were used. The solutions to be evaluated were prepared by diluting the compounds in mineral oil.

The insects' attraction towards synthetic compounds was evaluated through five series of pairwise choice experiments (Addesso *et al.*, 2011) (Table 1), performed in a glass type-Y olfactometer (central tube and arms of 12 and 10 cm of length, respectively, and 2.5 cm of inner diameter), operated according to the conditions and methodology described by Addesso and McAuslane (2009). This arrangement allowed choosing one or more attraction stimuli in *A. eugenii* adults at the end of each experimental series, and using it as control or as part of other stimuli, in subsequent experimental series. For the first series two base compounds were considered: (Z)- β -ocimene (BOCIz) and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (MPIR). BOCIz was selected because it was an isomer of the most abundant compound in pepper flowers and fruits, the monoterpene (E)- β -ocimene (BOCIe) (Addesso *et al.*, 2011), which was not available to be evaluated at the beginning of the study. MPIR was chosen because it is a potent odorant of the *Capsicum* spp. fruits

Cuadro 1. Compuestos volátiles sintéticos evaluados como atrayentes de *A. eugenii*, en cinco series de experimentos realizados en un olfatómetro tipo Y.

Table 1. Synthetic volatile compounds evaluated as attractive to *A. eugenii*, in five series of experiments performed with a type-Y olfactometer.

Código [†]	Compuesto	Cant. [‡] (μ g)	Serie experimental																										
			1					2		3							4			5									
			E1 [§]	E2	E3	E4	E5	T [¶]	E1	E2	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	T	E1	E2	E3	E1	E2	T				
1	(E)- β -ocimeno	100.0																							x	x	x	x	
2	(Z)- β -ocimeno	100.0	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
2a	(Z)- β -ocimeno	11.5																							x	x	x	x	
3	D-limoneno	29.5	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
4	2-isobutil 3-metoxipirazina	5.0	x [□]	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
5	β -ionona	5.0				x																							
6	Tetrametil pirazina	5.0					x																						
7	Hexil butirato	15.0							x																				
8	(Z)-3-hexenil acetato	48.0								x																			
9	(Z)-3-hexenol	29.0									x																		
10	Terpinoleno	25.0										x																	
11	3-hexenil butirato	20.0											x																
12	Linalool	1.0												x															
13	1-Hexanol	29.0													x														
14	Salicilato de metilo	35.0														x													
FA	Feromona de agregación ^{††}																											x	x
S	Solvente (aceite mineral) ^{†††}							x																					

[†]Número consecutivo asignado al compuesto; se utiliza solamente en las figuras; [‡]Cantidad del compuesto en la mezcla; [§]Estímulo; [¶]Testigo; [□]Este símbolo señala que el compuesto de ese renglón se incluyó como parte del estímulo señalado en el encabezado de la columna correspondiente. ^{††}Se utilizó tal como viene formulada. ^{†††}Se colocaron 10 μ L en el papel filtro \diamond [†]Consecutive number assigned to the compound; it is used solely in the figures; [‡]Amount of the compound in the mixture; [§]Stimulus; [¶]Control; [□]This symbol signals that the compound in this row was included as part of the stimulus labeled in the heading of the corresponding column. ^{††}It was used as is formulated. ^{†††}10 mL were added to the filter paper.

parte de otros estímulos, en series experimentales subsecuentes. Para la primera serie se consideraron dos compuestos base: (Z)- β -ocimeno (BOCIz) y 2-isobutil-3-metoxipirazina (MPIR). BOCIz se eligió por ser isómero del compuesto más abundante en las flores y frutos de Chile, el monoterpene (E)- β -ocimeno (BOCIe) (Addesso *et al.*, 2011) el cual no estuvo disponible para ser evaluado desde el inicio del estudio. MPIR se escogió por ser un odorante potente de los frutos de *Capsicum* spp. (Zachariah y Gobinath, 2008). Sólo fue posible evaluar individualmente MPIR, ya que BOCIz se encuentra mezclado con su isómero estructural D-limoneno (DLIM), en la formulación comercial utilizada. En total, se incluyeron cinco estímulos en la serie 1: MPIR, BOCIz + DLIM, la combinación de estos (mezcla terciaria) y dos mezclas cuaternarias resultantes de la adición de β -ionona (BION) o tetrametil pirazina (TPIR), a la mezcla terciaria; aceite mineral se utilizó como testigo.

En la segunda serie experimental se contrastaron los dos estímulos más atrayentes de hembras y machos adultos de *A.*

(Zachariah and Gobinath, 2008). It was only possible to evaluate MPIR individually, since BOCIz was mixed with its structural isomer, D-limonene (DLIM) in the commercial formulation used. In total, five stimuli were included in series 1: MPIR, BOCIz + DLIM, the combination of these (tertiary mixture) and two quaternary mixtures that resulted from the addition of β -ionone (BION) or tetramethyl pyrazine (TPIR), to the tertiary mix; mineral oil was used as control.

In the second experimental series, the two most attractive stimuli of female and male adult *A. eugenii*, identified in series 1, were contrasted and the best one was selected. The latter served as control in the third series of tests, where the effectiveness of eight quaternary mixtures, resulting from the individual addition of new compounds to the mixture chosen from series 2, was evaluated.

BION, TPIR and the additional compounds of the third experimental series were selected from lists of compounds previously identified as *Capsicum* spp. volatiles (Pino *et al.*, 2006;

eugenii, identificados en la serie 1, y se seleccionó el mejor. Este último funcionó como testigo en la tercera serie de pruebas, en la que se evaluó la efectividad de ocho mezclas cuaternarias, resultantes de la suma individual de nuevos compuestos a la mezcla elegida en la serie 2.

BION, TPIR y los compuestos adicionales de la tercera serie experimental se seleccionaron de listados de compuestos volátiles identificados previamente en *Capsicum* spp. (Pino *et al.*, 2006; In-Kyung *et al.*, 2007; Adesso *et al.*, 2011). Como criterios de elección se consideró su consistencia en el perfil de volátiles de Chile, sus antecedentes en la atracción de otros curculiónidos y su disponibilidad.

La mejor combinación de la serie 3 (mezcla terciaria) contenía BOC_{Iz} en proporción mayor. Puesto que el compuesto volátil principal que liberan las flores y frutos de Chile es BOC_{Ie} (Adesso *et al.*, 2011), se decidió contrastar, en un primer experimento de la cuarta serie experimental, dos combinaciones: la mezcla terciaria y una mezcla similar con BOC_{Ie} como compuesto principal (en lugar de BOC_{Iz}). No fue posible tener dos mezclas balanceadas en este experimento, sino una terciaria y una cuaternaria, debido a que BOC_{Ie} se encuentra mezclado con BOC_{Iz}, en la formulación comercial utilizada. Dado que era posible excluir DLIM de la combinación cuaternaria, en el segundo experimento de la cuarta serie se contrastó la efectividad atrayente de esta última y de la mezcla terciaria que resultó al prescindir de DLIM.

En la última serie experimental se evaluó la respuesta de los adultos de *A. eugenii* a su feromona de agregación [PEW I y PEW II, Trece[®]; grandlure II (48 %), (E)-grandlure II (32 %), grandlure III (3 %), grandlure IV (2 %), ácido geránico (13 %) y geraniol (2 %)], en comparación con la mejor mezcla de compuestos volátiles sintéticos (seleccionada en la serie 4), o con la combinación de esta y la feromona.

En cada experimento se liberó un adulto (10 a 20 d de edad) en la entrada del olfatómetro. Se le permitió elegir, por un tiempo máximo de 15 min, entre un estímulo y su testigo (series experimentales 1, 3 y 4) o entre dos estímulos (series 2 y 5) (Cuadro 1). Previamente, se colocó un trozo de papel filtro (Whatman No.1; Advantec, Japan) de 2 cm², empapado con 10 μL de la solución estímulo o testigo, en cada una de las cámaras laterales del olfatómetro. Los estímulos se seleccionaron al azar entre los contemplados para cada serie experimental. Se consideró que el insecto había hecho una elección cuando recorrió al menos la mitad de la distancia de uno de los brazos del olfatómetro. Cuando algún adulto no respondió, fue excluido del experimento y se sustituyó por otro. Cada día se evaluó la respuesta de 28 o 42 adultos a dos o tres estímulos (14 insectos por estímulo), hasta completar 56 repeticiones por cada sexo y estímulo. Hembras y machos se evaluaron en experimentos separados. Antes de iniciar

In-Kyung *et al.*, 2007; Adesso *et al.*, 2011). Their consistency in the profile of pepper volatiles was considered as choice criteria, as well as their antecedents in attracting other Curculionidae and their availability.

The best combination of series 3 (tertiary mix) contained BOC_{Iz} in higher proportion. Since the principal volatile compound that pepper flowers and fruits release is BOC_{Ie} (Adesso *et al.*, 2011), it was decided to contrast, in the first experiment of the fourth experimental series, two combinations: the tertiary mixture and a similar mixture with BOC_{Ie} as principal compound (instead of BOC_{Iz}). It was not possible to have two balanced mixtures in this experiment, but rather one tertiary and one quaternary, because BOC_{Ie} is mixed with BOC_{Iz}, in the commercial formulation used. Given that it was possible to exclude DLIM from the quaternary combination, in the second experiment of the fourth series, the attraction effectiveness of the former and the tertiary mixture that resulted from doing without the DLIM was compared.

In the last experimental series, the response of *A. eugenii* adults to their aggregation pheromone [PEW I and PEW II, Trece[®]; grandlure II (48 %), (E)-grandlure II (32 %), grandlure III (3 %), grandlure IV (2 %), geranic acid (13 %) and geraniol (2 %)] was evaluated, in comparison with the best mixture of synthetic volatile compounds (selected in series 4), or with the combination of the latter and the pheromone.

In each test, an adult (10 to 20 d of age) was liberated at the entrance of the olfactometer. It was allowed to choose, during a maximum period of 15 min, between a stimulus and its control (experimental series 1, 3 and 4) or between two stimuli (series 2 and 5) (Table 1). Previously, a 2 cm² piece of filter paper (Whatman No. 1; Advantec, Japan), drenched with 10 μL of the stimulus or control solution, was placed in each one of the lateral chambers of the olfactometer. The stimuli were selected randomly between those contemplated for each experimental series. It was considered that the insect had made a choice when it moved at least half of the distance up one of the arms of the olfactometer. When an adult did not respond, it was excluded from the experiment and it was substituted for another. Each day the response of 28 or 42 adults to two or three stimuli (14 insects per stimulus) was evaluated, until completing 56 repetitions per each sex and stimulus. Females and males were evaluated in separate experiments. Before beginning the tests and after each series of 14 repetitions, the olfactometer was washed with phosphate-free soap; it was rinsed with distilled water, ethylic alcohol and acetone, and it was kept for 30 min in an oven, at a temperature of 200 °C. The lateral chambers of the olfactometer were exchanged every seven insects, with the goal of eliminating the position bias.

los experimentos y después de cada serie de 14 repeticiones, el olfatómetro se lavó con jabón libre de fosfatos; se enjuagó con agua destilada, alcohol etílico y acetona, y se mantuvo 30 min en un horno, a 200 °C. Las cámaras laterales del olfatómetro se intercambiaron cada siete insectos para eliminar el error de posición.

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de atracción se analizaron con la prueba para una proporción binomial (Proc FREQ; SAS Institute Inc., 2004), mediante la cual se determinó si la proporción observada de insectos que entraron a cada cámara del olfatómetro fue significativamente diferente a la esperada ($p \leq 0.5$) bajo la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de la primera serie de experimentos (Figura 1A y 1B), dos fuentes de olor atrajeron a hembras y machos adultos de *A. eugenii*: MPIR y su mezcla terciaria con BOCIz y DLIM. MPIR es un potente odorante en frutos de diferentes especies de Chile (Zachariah y Gobinath, 2008), como *C. annuum* (Cremer y Eichner, 2000; Fernández Trujillo, 2007; In-Kyung *et al.*, 2007;) y *C. chinense* Jacq. (Pino *et al.*, 2006), pese a su concentración baja. BOCIz y DLIM han mostrado

Statistical analysis

The data from the attraction experiments were analyzed with the test for a binomial proportion (Proc FREQ; SAS Institute Inc., 2004), through which it was determined whether the proportion of insects observed entering each chamber of the olfactometer was significantly different to the one expected ($p \leq 0.5$) under the null hypothesis.

RESULTS AND DISCUSSION

According to the results of the first series of experiments (Figure 1A and 1B), two sources of odor attracted adult *A. eugenii* females and males: MPIR and its tertiary mixture with BOCIz and DLIM. MPIR is a potent odorant in fruits of different pepper species (Zachariah and Gobinath, 2008), such as *C. annuum* (Cremer and Eichner, 2000; Fernández Trujillo, 2007; In-Kyung *et al.*, 2007) and *C. chinense* Jacq. (Pino *et al.*, 2006), in spite of its low concentration. BOCIz and DLIM have shown potential to attract adults from *Myloccerinus aurolineatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae) (Sun *et al.*, 2010 and 2012) and *Aegorhinus superciliosus* Guérin (Coleoptera: Curculionidae) (Quiroz, 2010), respectively. Results from this study indicate that these compounds help *A. eugenii* adults to locate their host.

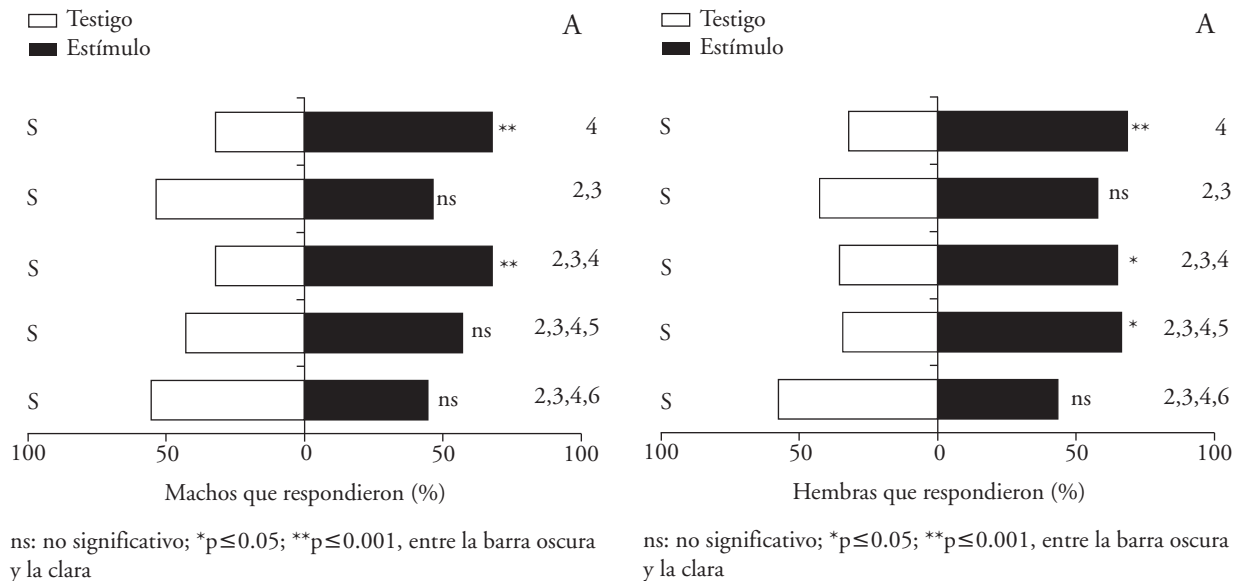


Figura 1. Atracción de los adultos de *A. eugenii* hacia un compuesto individual y cuatro mezclas de compuestos volátiles sintéticos. Figure 1. Attraction of *A. eugenii* adults towards an individual compound and four mixtures of synthetic volatile compounds.

potencial para atraer a los adultos de *Myloccerinus aurolineatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae) (Sun *et al.*, 2010 y 2012) y *Aegorhinus superciliosus* Guérin (Coleoptera: Curculionidae) (Quiroz, 2010), respectivamente. Los resultados del presente estudio indican que estos compuestos contribuyen para que los adultos de *A. eugenii* localicen a su hospedero.

La combinación cuaternaria que incluía BION estimuló solamente a las hembras. Además, BION contrarrestó el efecto atrayente de la mezcla terciaria (al sumarse a la misma), en el caso de los machos (Figura 1A). BION es un compuesto escaso en frutos verdes de Chile, pero aumenta con la madurez (Pino *et al.*, 2006) o al procesarse (Cremer y Eichner, 2000; Fernández-Trujillo, 2007). Por lo tanto, es posible que BION sea para los machos una señal de la calidad disminuida de los frutos para el consumo.

Cuando se permitió a los adultos discriminar entre MPIR y la mezcla terciaria, tanto hembras como machos eligieron la segunda (Figura 2). En forma similar, una variedad amplia de insectos herbívoros son más atraídos por mezclas que por compuestos volátiles individuales de sus hospederos (Szendrei y Rodríguez-Saona, 2010; Collatz y Dorn, 2013).

Los compuestos (Z)-3-hexenil acetato (HEXAC) y terpinoleno (TERP), adicionados individualmente a la mezcla terciaria, propiciaron aumento en la respuesta de hembras y machos, respectivamente (Figura 3A y 3B). El primer compuesto, combinado con hexil acetato y la feromona de agregación de *Anthonomus musculus* Say, también atrae mayor proporción de hembras de esa especie, con respecto a su feromona sola (Szendrei *et al.*, 2011). Tal similitud sugiere que HEXAC contribuye para que

The quaternary combination that included BION stimulated only the females. Also, BION counteracted the attraction effect of the tertiary mix (when it was added to it), in the case of males (Figure 1A). BION is a scarce compound in green pepper fruits, but it increases with maturity (Pino *et al.*, 2006) or when they are processed (Cremer and Eichner, 2000; Fernández-Trujillo, 2007). Therefore, it is possible that for males BION is a signal of the diminished quality of the fruits for consumption.

When it was allowed for adults to discriminate between MPIR and the tertiary mixture, both females and males chose the second (Figure 2). Similarly, a wide variety of herbivore insects are attracted more by mixtures than by individual host volatile compounds (Szendrei and Rodríguez-Saona, 2010; Collatz and Dorn, 2013).

The compounds (Z)-3-hexenyl acetate (HEXAC) and terpinolene (TERP), individually added to the tertiary mix, favored an increase in the response of females and males, respectively (Figure 3A and 3B). The first compound, combined with hexyl acetate and the *Anthonomus musculus* Say aggregation pheromone, also attracts a higher proportion of females of that species, compared to the pheromone alone (Szendrei *et al.*, 2011). Such similarity suggests that HEXAC contributed to *A. eugenii* and *A. musculus* females locating their host, possibly in the search for mating or egg-laying sites. TERP has been identified in *Capsicum frutescens* L. fruits (Cardeal *et al.*, 2006). This compound has a synergic effect with myrcene on the pheromone of *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae) (Borden *et al.*, 2008).

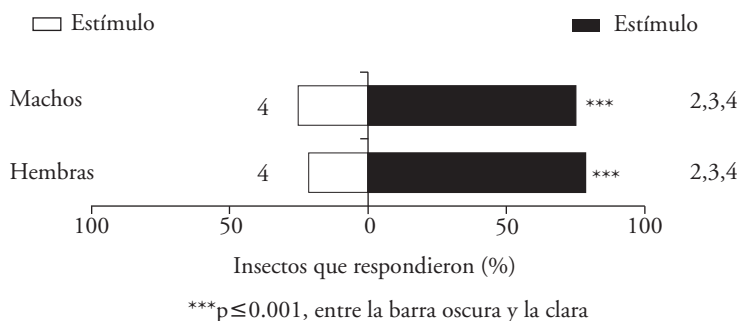
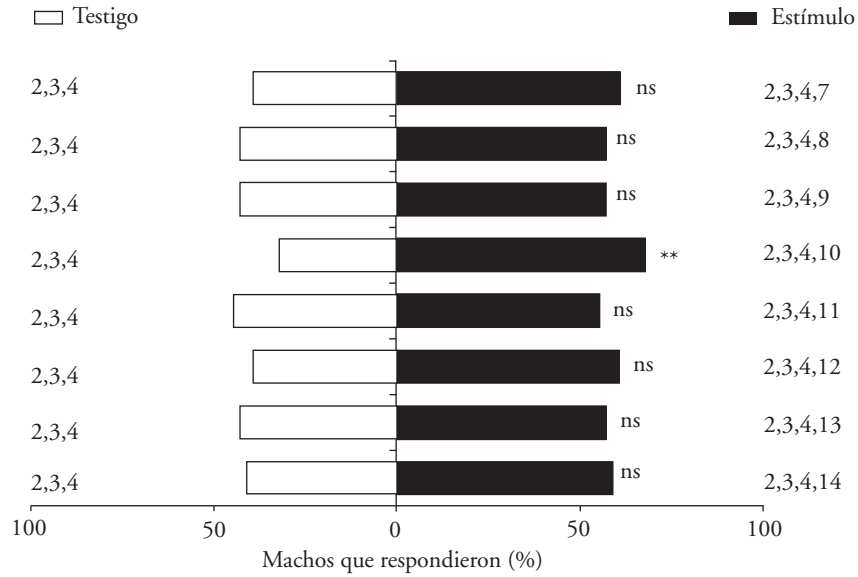
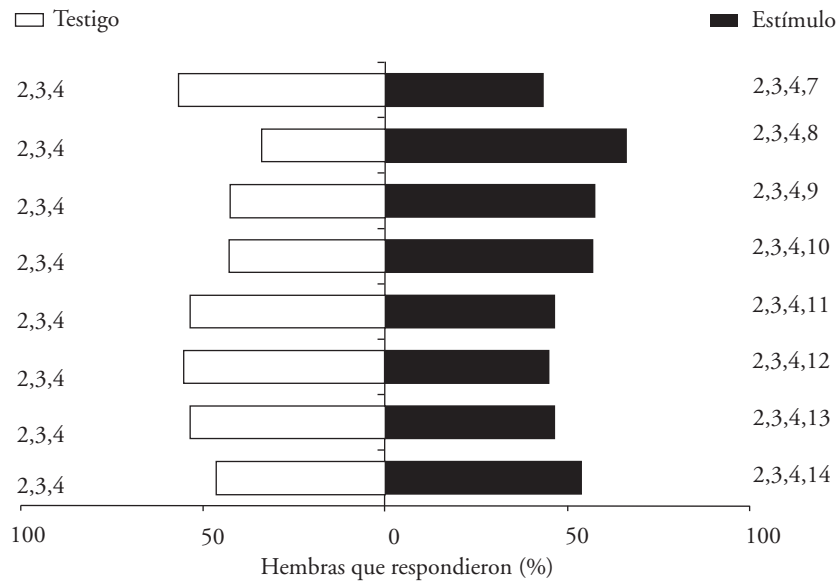


Figura 2. Respuesta de los adultos de *A. eugenii* a los dos mejores estímulos de la primera serie de experimentos.
Figure 2. Response of *A. eugenii* adults to the two best stimuli from the first series of experiments.



ns: no significativo; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$, entre la barra oscura y la clara



ns: no significativo; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$, entre la barra oscura y la clara

Figura 3. Atracción de los adultos de *A. eugenii* hacia mezclas cuaternarias de compuestos volátiles sintéticos.
Figure 3. Attraction of *A. eugenii* adults towards quaternary mixtures of synthetic volatile compounds.

las hembras de *A. eugenii* y *A. musculus* localicen a su hospedero, posiblemente en la búsqueda de sitios de apareamiento u oviposición. TERP se ha identificado en frutos de *Capsicum frutescens* L. (Cardeal *et al.*, 2006). Este compuesto tiene un efecto sinérgico con mirceno sobre la feromona de *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae) (Borden *et al.*, 2008).

According to the results from the fourth series of experiments (Figure 4A and 4B), there was a different response from *A. eugenii* adults to isomers BOC₁z, BOC₁e and DLIM. When offering the tertiary mixture, identified as attractive in series 1 and 2, and a similar combination (with BOC₁e as principal compound and BOC₁z in low proportion), to *A. eugenii* adults, more males preferred the

De acuerdo con los resultados de la cuarta serie de experimentos (Figura 4A y 4B), hubo una respuesta diferente de los adultos de *A. eugenii* a los isómeros BOCIZ, BOCIE y DLIM. Al ofrecer la mezcla terciaria, identificada como atrayente en las series 1 y 2, y una combinación similar (con BOCIE como compuesto principal y BOCIZ en baja proporción), a los adultos de *A. eugenii*, más machos prefirieron la mezcla con BOCIE, en tanto que las hembras no mostraron diferencia en su elección (Figura 4A y 4B). BOCIE es el principal compuesto volátil que se libera durante la floración y fructificación de *C. annuum*, y su abundancia se relaciona en forma directamente proporcional con la atracción de *A. eugenii* hacia tal especie vegetal (Addesso *et al.*, 2011). Este monoterpeno también estimula a los adultos de *Anthonomus grandis* Boheman (Magalhães *et al.*, 2012), *Anthonomus rubi* Herbst (Bichão *et al.*, 2005) y *M. aurolineatus* (Sun *et al.*, 2010 and 2012). La segunda especie cuenta con un grupo de neuronas receptoras de olores, especializado en su detección (Bichão *et al.*, 2005). Lo anterior explica

mixture with BOCIE, while the females did not show a differentiation in their choice (Figure 4A and 4B). BOCIE is the principal volatile compound that is released during flowering and fructification of *C. annuum*, and its abundance is related in a directly proportional manner to the attraction of *A. eugenii* to that plant species (Addesso *et al.*, 2011). This monoterpene also stimulates adults of *Anthonomus grandis* Boheman (Magalhães *et al.*, 2012), *Anthonomus rubi* Herbst (Bichão *et al.*, 2005) and *M. aurolineatus* (Sun *et al.*, 2010 and 2012). The second species has a group of olfactory receptive neurons, specialized in the detection of BOCIE (Bichão *et al.*, 2005). This explains the importance of this compound in the quaternary mixture evaluated in experimental series 4.

Attraction of *A. eugenii* adults towards volatiles from their host did not decrease when excluding DLIM (Figure 4A and 4B), which evidenced that this does not contribute a significant attraction effect. Such a compound also generates a low level of stimulation in *A. rubi* adults (Bichão *et al.*, 2005).

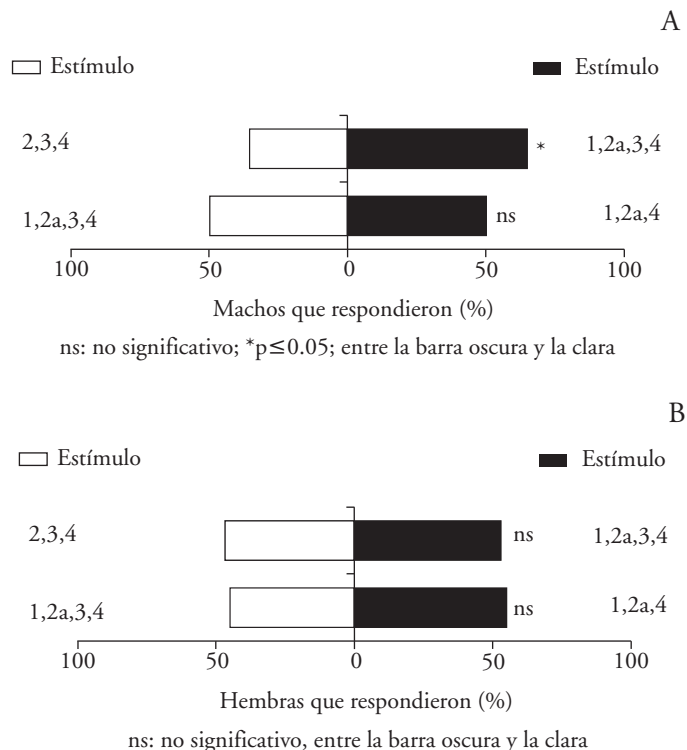


Figura 4. Efecto de los isómeros BOCIE, BOCIZ y DLIM sobre la respuesta atrayente de los adultos de *A. eugenii*.
 Figure 4. Effect of isomers BOCIE, BOCIZ and DLIM on the attraction response of *A. eugenii* adults.

la importancia de BOCle en la mezcla cuaternaria evaluada en la serie experimental 4.

La atracción de los adultos de *A. eugenii* hacia los volátiles de su hospedero no disminuyó al excluir DLIM (Figura 4A y 4B), lo que evidenció que éste no aporta un efecto atrayente significativo. Tal compuesto también genera un nivel bajo de estimulación en los adultos de *A. rubi* (Bichao *et al.*, 2005).

La respuesta de *A. eugenii* a BOCle, BOCiz y DLIM asemeja a la de otros curculiónidos, como *A. grandis* (Dickens y Prestwich, 1989), *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Díaz-Núñez *et al.*, 2006) y *A. superciliosus* (Mutis *et al.*, 2010), los cuales también cambian su comportamiento ante diferentes isómeros.

Los datos de la quinta serie experimental (Figura 5A y 5B) mostraron los compuestos del chile atraen igual número de hembras y cantidad mayor de machos adultos que la feromona de agregación de *A. eugenii*. Estos resultados, y los obtenidos en los experimentos anteriores (Figura 1, 2, 3 y 4), muestran que los compuestos volátiles del hospedero tienen potencial para funcionar como atrayentes del picudo del chile. Pero, es necesario evaluar si la competencia con la feromona de los machos silvestres afectaría su eficacia en campo. El efecto contrario se observó al monitorear a la plaga mediante trampas con feromona: las capturas disminuyen a medida que hay más flores y frutos (Patrock *et al.*, 1992; Eller *et al.*, 1994).

La combinación de los compuestos volátiles de *Capsicum* spp. y la feromona de agregación de *A. eugenii* podría ser más exitosa que un solo semioquímico. Lo anterior es factible en el caso de los machos, cuya respuesta fue mayor hacia la mezcla (Figura 5A). Similarmente, los compuestos de plantas hospederas aumentan el efecto atrayente de las feromonas de otras especies de *Anthonomus* (Szendrei *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2012; Wibe *et al.*, 2014) y de diversos curculiónidos (Reddy y Guerrero, 2004; Francke y Dettner, 2005; Sunil *et al.*, 2014).

A diferencia de los machos, las hembras respondieron igual a la feromona que a las mezclas con los compuestos volátiles de chile (Figura 5B). Este comportamiento fue similar al reportado por Adesso *et al.* (2011), quienes observaron que las hembras copuladas de *A. eugenii* fueron más atraídas por el aroma de frutos de chile que por el de frutos

The response of *A. eugenii* to BOCle, BOCiz and DLIM is similar to that of other Curculionidae, such as *A. grandis* (Dickens and Prestwich, 1989), *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Díaz-Núñez *et al.*, 2006) and *A. superciliosus* (Mutis *et al.*, 2010), which also change their behavior when exposed to different isomers.

Data from the experimental series 5 (Figure 5A and 5B) showed that the pepper compounds attract equal number of females and a higher number of adult males than the *A. eugenii* aggregation pheromone. These results and those obtained in the prior experiments (Figure 1, 2, 3 and 4) show that the volatile compounds of the host have the potential to function as attractants to the pepper weevil. However, it is necessary to evaluate whether competition with the pheromone of wild males would affect their efficacy in the field. The contrary effect has been observed when monitoring the pest through pheromone traps: captures decrease as there are more flowers and fruits (Patrock *et al.*, 1992; Eller *et al.*, 1994).

The combination of *Capsicum* spp. volatile compounds and the *A. eugenii* aggregation pheromone could be more successful than a single semiochemical. This is feasible in the case of males, whose response was greater towards the mixture (Figure 5A). Similarly, the host plant compounds increase the attraction effect of pheromones of other species of *Anthonomus* (Szendrei *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2012; Wibe *et al.*, 2014) and of diverse Curculionidae (Reddy and Guerrero, 2004; Francke and Dettner, 2005; Sunil *et al.*, 2014).

In contrast with the males, the females responded equally to the pheromone than to the mixtures with pepper volatile compounds (Figure 5B). This behavior was similar to the one reported by Adesso *et al.* (2011), who observed that the *A. eugenii* copulated females were more attracted by the pepper fruit aroma than by the fruits combined with conspecific adult males; in contrast, the virgin females responded in greater proportion to the second treatment. The researchers cited suggested that the principal objective of virgin females was seeking an opportunity for mating, and that of copulated ones was to locate egg-laying sites. It is likely that the sexual status of females used in the tests in this study also influenced their attraction response. Therefore, experiments are necessary with copulated and virgin females to elucidate the influence of this factor.

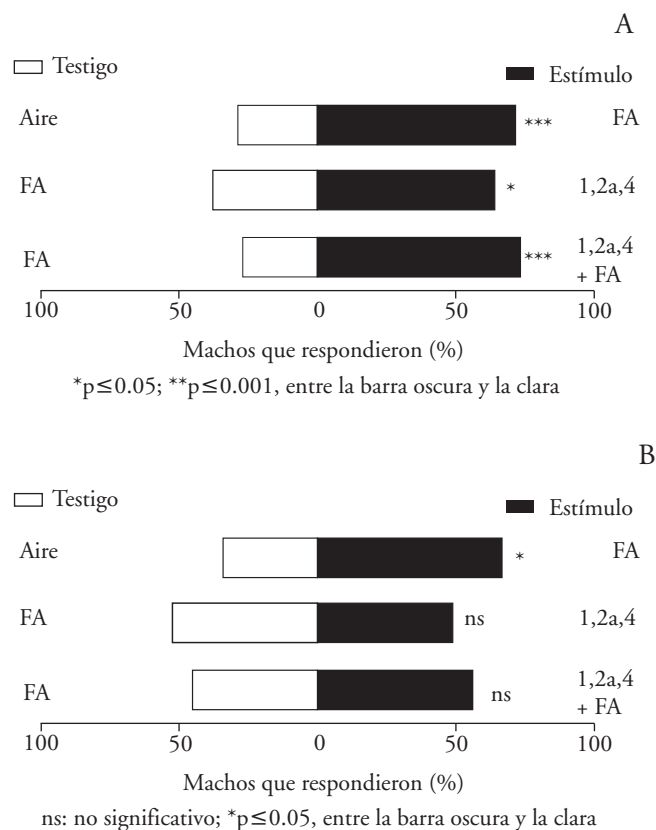


Figura 5. Respuesta de los adultos de *A. eugenii* a compuestos volátiles de su hospedero y a su combinación con la feromona de agregación comercial.

Figure 5. Response of *A. eugenii* adults to host volatile compounds and to their combination with the commercial aggregation pheromone.

combinados con machos adultos coespecíficos. En contraste, las hembras vírgenes respondieron en mayor proporción al segundo tratamiento. Los investigadores citados sugirieron que el objetivo principal de las hembras vírgenes era buscar una oportunidad de apareamiento, y el de las copuladas era localizar sitios de oviposición. Es probable que el estatus sexual de las hembras utilizadas en los experimentos del presente estudio también haya influenciado su respuesta atrayente. Por lo tanto, se requieren experimentos con hembras copuladas y vírgenes para dilucidar la influencia de este factor.

La presente investigación permitió discriminar compuestos volátiles de *Capsicum* spp., con base en su potencial para atraer a los adultos de *A. eugenii*. Tres compuestos (BOCIe, BOCIz y MPIR) ejercieron este efecto en hembras y machos del insecto, y otros dos (HEXAC y TERP) en los adultos de un solo sexo. Similarmente, los compuestos volátiles del hospedero y su combinación con la feromona de agregación de

This research allowed discriminating *Capsicum* spp. volatile compounds, based on their potential to attract *A. eugenii* adults. Three compounds (BOCIe, BOCIz and MPIR) exercised this effect in the insect females and males, and two others (HEXAC and TERP) in adults of a single sex. Similarly, the host's volatile compounds and their combination with the *A. eugenii* aggregation pheromone attracted more males than the pheromone alone, so they could be useful for their monitoring.

Results from these experiments also showed the differential effect of the three isomers evaluated and they evidenced that BOCIE contributed more to attract males than BOCIz, while DLIM did not have a significant effect in the response of *A. eugenii* adults.

The potential of identified attractive mixtures in this study could increase with the inclusion of other host volatile compounds, which are produced in a higher amount during feeding by *A. eugenii* (Addesso *et al.*, 2011). Field experiments will show the

A. eugenii atrajeron más machos que la feromona sola, por lo que podrían ser de utilidad para su monitoreo.

Los resultados de estos experimentos también mostraron el efecto diferencial de los tres isómeros evaluados y evidenciaron que BOCle contribuyó más para atraer a los machos que BOClz, en tanto que DLIM no tuvo un efecto significativo en la respuesta de los adultos de *A. eugenii*.

El potencial de las mezclas atrayentes identificadas en este estudio podría aumentar con la inclusión de otros compuestos volátiles del hospedero, que se producen en mayor cantidad durante la alimentación de *A. eugenii* (Addeso *et al.*, 2011). Experimentos de campo mostrarán la efectividad de esas moléculas en el monitoreo o control del picudo del chile.

CONCLUSIONES

La combinación de los compuestos volátiles (*Z*)- β -ocimeno, D-limoneno y 2-isobutil-3-metoxipirazina atrae a hembras y machos adultos del picudo del chile (*A. eugenii*). Los compuestos (*Z*)-3-hexenil acetato y terpinoleno, adicionados individualmente a la combinación anterior, propician un aumento en la respuesta de hembras y machos, respectivamente.

La sustitución de (*Z*)- β -ocimeno por una mezcla con (*E*)- β -ocimeno (como compuesto principal) y (*Z*)- β -ocimeno (en baja proporción), aumenta la respuesta de los machos, y la exclusión de D-limoneno no reduce la efectividad de atracción de la combinación remanente.

La mezcla de tres compuestos volátiles del chile [(*E*)- β -ocimeno, (*Z*)- β -ocimeno y 2-isobutil-3-metoxipirazina] atrae más machos que la feromona de agregación de *A. eugenii*, y la combinación de ambos (compuestos del chile y feromona) atrae más machos que la feromona sola.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 229415, otorgada al autor para realizar estudios de Doctorado. A la Línea Prioritaria de Investigación 16 (LPI-16: Innovación Tecnológica) del Colegio de Postgraduados, por el apoyo financiero.

LITERATURA CITADA

Addeso, K. M. and H. J. McAuslane. 2009. Pepper weevil attraction to volatiles from host and nonhost plants. *Environ. Entomol.* 38: 216-224.

effectiveness of those molecules in the monitoring or control of the pepper weevil.

CONCLUSIONS

The combination of volatile compounds (*Z*)- β -ocimene, D-limonene and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine attracts adult females and males of the pepper weevil (*A. eugenii*). The (*Z*)-3-hexenyl acetate and terpinolene compounds, added individually to the previous combination, foster an increase in the response by females and males, respectively.

The substitution of (*Z*)- β -ocimene for a mixture with (*E*)- β -ocimene (as principal compound) and (*Z*)- β -ocimene (in low proportion), increases the response of the males, and the exclusion of D-limonene does not reduce the effectiveness of attraction of the remaining combination.

The mixture of three pepper volatile compounds [(*E*)- β -ocimene, (*Z*)- β -ocimene and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine] attracts more males than the aggregation pheromone of *A. eugenii*, and the combination of both (pepper compounds and pheromone) attracts more males than the pheromone alone.

—End of the English version—

---*---

- Addeso, K. M., H. J. McAuslane, and H. T. Albom. 2011. Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomol. Exp. Appl.* 138: 1-11.
- Augustin, S., N. Boonham, P. Donner, M. Faccoli, D. C. Lees, L. Marini, N. Mori, E. P. Toffolo, A. Quilici, A. Roques, A. Yart and A. Battisti. 2012. A review of pest surveillance techniques for detecting pests in Europe. *EPPO Bulletin* 42: 515-551.
- Bichão, H., A. K. Borg-Karlson, J. Araújo, and H. Mustaparta. 2005. Five types of olfactory receptor neurons in the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi*: selective responses to inducible host-plant volatiles. *Chem. Senses* 30: 153-170.
- Borden, J. H., D. S. Pureswaran, and J. P. Lafontaine. 2008. Synergistic blends of monoterpenes for aggregation pheromone of the mountain pine beetle (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 101: 1266-1275.
- Cardeal, Z. L., M. D. R. Gomes da Silva, and P. J. Marriott. 2006. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Commun. Mass Sp.* 20: 2823-2836.

- Collatz, S. and S. Dorn. 2013. A host-plant derived volatile blend to attract the apple blossom weevil *Anthonomus pomorum* – the essential volatiles include a repellent constituent. *Pest Manag. Sci.* 69: 1092-1098.
- Cremer, D. R. and K. Eichner, 2000. Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *J. Agr. Food Chem.* 48: 2454-2460.
- Díaz-Núñez, V., G. Sánchez-Martínez y N. E. Guillelte. 2006. Respuesta de *Dendroctonus mexicanus* (Hopkins) a dos isómeros ópticos de verbenona. *Agrociencia* 40: 349-354.
- Dickens, J. C. and G. D. Prestwich. 1989. Differential recognition of geometric isomers by the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* 15: 529-540.
- Eller, F. J. 1995. A previously unknown sexual character for the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 78: 180-183.
- Eller, F. J., R. J. Bartlett, B. S. Shasha, D. J. Schuster, D. G. Riley, P. A. Stansly, T. F. Mueller, K. D. Shuler, B. Johnson, J. H. Davis, and C. A. Sutherland. 1994. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.* 20: 1537-1555.
- Fernández-Trujillo, J. P. 2007. Extracción convencional de oleoresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones. *Grasas Aceites* 58: 252-263.
- Francke, W. and K. Dettner. 2005. Chemical signalling in beetles. *Top. Curr. Chem.* 240: 85-166.
- González-Gaona, E., G. Sánchez-Martínez, A. Zhang, J. Lozano-Gutiérrez, y F. Carmona-Sosa. 2010. Validación de dos compuestos feromonales para el monitoreo de la cochinilla rosada del hibisco en México. *Agrociencia* 44: 65-73.
- Gordon, R. y A. M. Armstrong. 1990. Biología del picudo del pimiento, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae), en Puerto Rico. *J. Agr. U. Puerto Rico* 74: 69-73.
- In-Kyung, K., A. M. A. El-Aty, S. Ho-Chul, B. L. Hyang, K. in-Seon, and S. Jae-Han. 2007. Analysis of volatile compounds in fresh healthy and diseased peppers (*Capsicum annuum* L.) using solvent free solid injection coupled with gas chromatography-flame ionization detector and confirmation with mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 45: 487-494.
- Magalhães, D. M., M. Borges, R. A. Laumann, E. R. Sujii, P. Mayon, J. C. Caulfield, C. A. O., Midega, Z. R. Khan, J. A. Pickett, M. A. Birkett and M. C. Blassioli Moraes. 2012. Semiochemicals from herbivory induced cotton plants enhance the foraging behavior of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. *J. Chem. Ecol.* 38: 1528-1538.
- Mutis, A., L. Parra, L. Manosalva, R. Palma, O. Candia, M. Lizama, F. Pardo and A. Quiroz. 2010. Electroantennographic and behavioral responses of adults of raspberry weevil *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) to odors released from females. *Environ. Entomol.* 39: 1276-1282.
- Patrock, R. J., D. J. Schuster and E. R. Mitchell. 1992. Field evidence for an attractant produced by the male pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Fla. Entomol.* 75: 138-144.
- Pino, J., E. Sauri-Duch, and R. Marbot. 2006. Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chem.* 94: 394-398.
- Quiroz, A. 2010. Electroantennographic and behavioral responses of adults of raspberry weevil *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) to odors released from conspecific females. *Environ. Entomol.* 39: 1276-1282.
- Reddy, G. V. P. and A. Guerrero. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Sci.* 9: 253-261.
- Riley, D. G. and E. G. King. 1994. Biology and management of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): a review. *Trends Agri. Sci.* 2: 109-121.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT[®] 9.1 User's guide. Cary, NC. USA.
- Sun, X. L., G. C. Wang, Y. Gao, and Z. M. Cheng. 2012. Screening and field evaluation of synthetic volatile blends attractive to adults of the tea weevil, *Mylokerinus aurolineatus*. *Chemoecology* 22: 229-237.
- Sun, X. L., G. C. Wang, X. M. Kai, S. Jin, Y. Gao and Z. M. Chen. 2010. The tea weevil, *Mylokerinus aurolineatus* is attracted to volatiles induced by conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 36: 388-395.
- Sunil, T., T. C. Leskey, A. L. Nielsen, J. C. Piñero, and C. R. Rodríguez-Saona. 2014. Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones. *In: Integrated pest management, current concepts and ecological perspective.* Abrol, D. P. (Editor). pp. 141-168.
- Szendrei, Z. and C. Rodríguez-Saona. 2010. A meta-analysis of insect pest behavioral manipulation with plant volatiles. *Entomol. Exp. Appl.* 134: 201-210.
- Szendrei, Z., A. Averill, H. Alborn, and C. Rodríguez-Saona. 2011. Identification and field activity of attractants for the cranberry weevil, *Anthonomus musculus* Say. *J. Chem. Ecol.* 37: 387-397.
- Szendrei, Z., E. Malo, L. Stelinski, and C. Rodríguez-Saona. 2009. Response of cranberry weevil (Coleoptera: Curculionidae) to host plant volatiles. *Environ. Entomol.* 38: 861-869.
- Toapanta, M. A., D. J. Schuster, and P. A. Stansly. 2005. Development and life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. *Environ. Entomol.* 34: 999-1008.
- Wibe, A., A. K. Borg-Karlson, J. Cross, H. Bichão, M. Fountain, I. Liblikas and L. Sigsgaard. 2014. Combining 1,4-dimethoxybenzene, the major flower volatile of wild strawberry *Fragaria vesca*, with the aggregation pheromone of the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* improves attraction. *Crop Prot.* 64: 122-128.
- Zachariah, T. J. and P. Gobinath. 2008. Paprika and chilli. *In: Chemistry of spices.* Parthasarathy, V.A., B. Chempakam and T. J. Zachariah (Editores). CABI Publishing. Wallingford, Oxon, GBR. pp: 260-311.