INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

2012

NOMBRE DEL PROYECTO: "ANALIZAR LOS COMPUESTOS VOLÁTILES IMPLICADOS EN LA ATRACCIÓN DEL ESCARABAJO EN LOS NIDOS DE LA TORTUGA GOLFINA EN EL SANTUARIO PLAYA LA ESCOBILLA, OAXACA"

(Número de contrato: CONANP/AD–S/ASE/DGOR/DEPC/068/2012)

RESPONSABLES

Dr. Gonzalo Halffter Salas[1]

Dr. José R. Verdú Faraco[2]

Dra. Vieyle Cortez Gallardo[1, 2]

COLABORADORES

Dr. Antonio J. Ortiz Hernández[3]

PRESENTACIÓN

El presente informe sintetiza los resultados en el estudio ecológico y conductual de *Omorgus suberosus* mediado por compuestos químicos con el propósito de implementar un método de control etológico basado en el desarrollo de trampas con atrayentes para este escarabajo, en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca.

JUSTIFICACIÓN

Como han demostrado los trabajos de campo y laboratorio, *Omorgus suberosus* es una seria plaga para los huevos y embriones de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca. Después de los trabajos para CONANP de Halffter *et al*. 2009, no hay duda de que el escarabajo ataca no solamente a los huevos muertos si no también a huevos vivos. La importancia del ataque viene dada por varias circunstancias:

1) La Escobilla es la más importante área de anidación de la tortuga golfina a nivel mundial.

2) Aunque es difícil separar los daños provocados por *O. suberosus* de otros factores de mortalidad, en las áreas de mayor concentración del escarabajo hasta un 70% de los huevos son afectados.

3) *O. suberosus* ha modificado el comportamiento agonístico (de franca agresión interespecífica) típico de las larvas de *Trox* y *Omorgus*. Esto permite su concentración en importantes cantidades en un espacio reducido como es el área de oviposición en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca.

4) Tanto los adultos como las larvas del escarabajo atacan los huevos. Lo anterior, unido a lo corto del ciclo biológico (véase Halffter *et al*. 2009) hace que las poblaciones del escarabajo tengan una rápida respuesta a las arribadas y puestas de la tortuga.

5) El número de *O. suberosus* en el Santuario Playa La Escobilla es muy alto. Lo anterior hace que a pesar de que una estimación preliminar sitúa en 700, 000 los individuos capturados con trampa en 2011, las poblaciones del escarabajo no han decrecido en forma importante.

6) Como una nueva alternativa se propone continuar con el programa de trampeo, pero añadiendo a las trampas una o varias sustancias que aumenten considerablemente su atracción para el escarabajo. Las trampas dejarían de ser de caída para convertirse en trampas de atracción.

7) Para la selección de las sustancias mencionadas en el inciso anterior, es necesario conocer la ecología química de *O. suberosus*: qué tipo de sustancias lo atraen, a cuales responde en forma masiva.

INTRODUCCIÓN

El escarabajo *Omorgus suberosus* Fabricius (Coleoptera: Trogidae; Fig. 1) resalta por ser capaz de rápidas y amplias respuestas antes ofertas excepcionales de recursos alimenticios: siempre proteínas animales concentradas. Estas respuestas modifican profundamente el número de individuos y la dinámica poblacional de *O. suberosus*, así como algunos aspectos concretos de su comportamiento alimentario, con una marcada tendencia a atacar recursos alimentarios concentrados.

Figura 1. *Omorgus suberosus* Fabricius (Coleoptera: Trogidae).

O. suberosus a diferencia de las pocas especies de *Trox* y *Omorgus* con nidificación conocida, pierde los comportamientos larvarios agonísticos y territoriales al atacar recursos alimentarios concentrados. Esto lo convierte en una plaga potencial, ya que esta especie (no cualquier Trogidae) puede responder con un rápido aumento de población (sin las barreras comportamentales antes señaladas), en cualquier circunstancia en la que se presente un alimento proteico abundante y concentrado. Ejemplos son el ataque a los nidos de iguana (*Onelopus scelbstriatus*), el ataque masivo a puestas (ootecas) de langosta migratoria (*Schistocerca*

paranensis) y el ataque a nidos de tortuga (*Chelonia mydas*) en las islas Galápagos. Consideramos que estos casos constituyen claramente procesos adaptativos muy recientes y localizados, que son respuesta a ofertas alimenticias concentradas y excepcionales.

O. suberosus es uno de los principales factores de mortandad de huevos de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* en el Santuario Playa La Escobilla (Oaxaca), el área de anidación más importante de esta tortuga a nivel mundial (López y Aragón 1994). La infestación masiva por el escarabajo, al parecer está relacionada con la densidad y la distribución espacial de los nidos de la tortuga en el Santuario (López–Reyes y Harfush 2000, Halffter et al. 2009). Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que *O. suberosus* presenta características de plaga, al destacar el papel depredador tanto a huevos *vivos* como a *muertos* en condiciones naturales y de laboratorio. Por ello se ha recurrido a diversos métodos para su control, aunque hasta el momento no se ha encontrado una solución definitiva para este problema. La razón principal es que no se cuenta con el conocimiento básico de su comportamiento y comunicación química. Dichos conocimientos resultan indispensables para el planteamiento de métodos y estrategias en el manejo de poblaciones de *O. suberosus* como insecto plaga.

Para entender el fenómeno de La Escobilla es importante señalar que salvo en casos de excepción, los Trogidae encontrados en restos queratinosos están en muy pequeño número (adultos o larvas). Lo que puede relacionarse con: a) Cuando el resto está en superficie, las larvas que lo atacan corresponden a la oviposicion de una hembra que "descubrió" el recurso; b) Las larvas tienden a permanecer aisladas (cada una en su túnel) presentando un fuerte comportamiento agonístico hacia las otras larvas. Ninguno de estos dos comportamientos se presenta en La Escobilla. *O. suberosus* salta dos de las restricciones comportamentales antes señaladas, tiene una marcada tendencia a atacar recursos alimentarios concentrados y una alta capacidad de multiplicación.

Este problema sin duda abre todo un campo en la investigación de la ecología química de *O. suberosus*, para entender el comportamiento gregario en la infestación de nidos de *L. olivacea* como base para establecer una estrategia de conservación de la tortuga en el Santuario Playa La Escobilla (Oaxaca). Dentro del contexto del desarrollo de nuevos métodos de control, es importante entender las bases moleculares de la olfacción en *O. suberosus*, para de tal manera elucidar completamente el rol y la identidad de los compuestos involucrados. Por todo ello se plantea el estudio dirigido a la identificación de semioquímicos (kairomonas y/o feromonas) que intervienen en la comunicación química y el comportamiento de *O. suberosus*. La información

que se genere de este estudio sentará las bases en el implemento de estrategias adecuadas y eficientes (principalmente en el control químico) para *O. suberosus*. Como consecuencia de ello, la ecología química de *O. suberosus* tiene un inmenso potencial para proporcionar nuevos conocimientos sobre la ecología y el comportamiento de los insectos plaga.

Uso de semioquímicos en el control químico

Las sustancias químicas involucradas en las distintas interacciones ecológicas, con las consecuentes respuestas fisiológicas o de comportamiento en los individuos involucrados, se conocen como Semioquímicos (Law y Regnier 1971). La presencia de compuestos semioquímicos se ha estudiado en numerosas familias de coleópteros. En general, la diversidad estructural y la fuerte bioactividad de muchos semioquímicos los vuelve excelentes candidatos para manipular el comportamiento de coleópteros con muchas posibilidades en el control de plagas (Heuskin et al. 2011). En especies que se agregan en gran número como es el caso de *O. suberosus*, según observaciones en campo, el trampeo masivo mediante un atrayente efectivo podría tener un gran impacto en la conservación de la tortuga Golfina, planteándola como una técnica viable para el control de las poblaciones de este trógido en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca.

Los atrayentes primero determinan comportamientos como identificación de la fuente de alimento, en este caso localización de los nidos de *L. olivacea*. En este contexto, se decidió estudiar el perfil volátil de las fuentes de olor. La partida de candidatos a participar en la atracción primaria de *O. suberosus* fueron los componentes volátiles de cadáveres de tortugas y dos estados de los huevos de *L. olivacea*: descompuestos y frescos.

Por otro lado, entre los distintos tipos de semioquímicos se encuentran las feromonas que median interacciones entre organismos de la misma especie. Dentro de las feromonas, existen las de agregación, que son emitidas por un sexo (generalmente los machos) y que sirven como señal para sus conspecíficos de ambos sexos induciéndoles un comportamiento agregativo, con la finalidad de protegerse, reproducirse, alimentarse o un conjunto de ellas. Por ello, se decidió realizar una captura de los volátiles liberados por machos y hembras de *O. suberosus*

OBJETIVO GENERAL

Detección y análisis de los compuestos volátiles implicados en la atracción y concentración de *Omorgus suberosus* en los nidos de tortuga golfina en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca, a fin de implementar un método de control basado en trampas atrayentes con compuestos químicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recoger en campo las sustancias que puedan intervenir en la atracción y concentración de *O. suberosus* en los nidos de tortuga golfina. Análisis químico de las muestras recogidas. Identificación de los componentes principales.
- Realización de ensayos electrofisiológicos y de olfatometría para obtener una señal de la actividad biológica de los compuestos identificados en los extractos volátiles mediante el registro de señales químicas generadas por las antenas de ambos sexos de *O. suberosus*.

ANTECEDENTES

El impacto que tiene el escarabajo *O. suberosus* en la mortalidad de la tortuga *L. olivacea* en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca, ha llevado al desarrollo de un programa de control basado en trampas de caída. A pesar de que estas trampas han capturado un buen número de escarabajos no han tenido éxito en reducir drásticamente las poblaciones de la plaga. Por lo tanto, se plantea un nuevo enfoque de combate basado en el conocimiento de los compuestos químicos que intervienen en el comportamiento de localización de los nidos de la tortuga y en la agregación de los escarabajos. El conocimiento de estos compuestos será la base para el control de *O. suberosus* mediante la utilización de sustancias semioquímicas, tales como feromonas o kairomonas, que son totalmente inocuas al ambiente y además son de elevada efectividad a bajas concentraciones.

ACTIVIDADES REALIZADAS Y RESULTADOS

Colecta de adultos en el campo y mantenimiento en el laboratorio

Adultos de *Omorgus suberosus* se colectaron manualmente, en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca. Una vez capturados, los insectos fueron transportados al laboratorio del Centro Iberoamericano de la Biodiversidad (CIBIO), en la Universidad de Alicante. Los escarabajos se colocaran en terrarios, en el fondo de los terrarios se colocaba arena como sustrato. Las cajas se mantuvieron en los insectarios del laboratorio de zoología, bajo condiciones controladas a 28°C (±1) y con un fotoperiodo de luz–oscuridad de 12:12 h) y se alimentaron periódicamente con

plumas de gallina (Fig. 2). De esta manera se logra una sobrevida de los insectos, con tiempo suficiente para llevar a cabo los ensayos experimentales.

Figura 2. Terrarios de *Omorgus suberosus*.

Captura y extracción de los compuestos volátiles emitidos por la fuente de alimento y por adultos de *O. suberosus*

En el mes de Septiembre de 2011, se realizó la toma de muestras en el Santuario Playa La Escobilla, y se transportaron al centro de trabajo perteneciente a la CONANP, (Fig. 3. Las muestras candidatas a participar en la atracción primaria de *O. suberosus* consistieron en cadáveres de tortugas, dos estados de los huevos de *L. olivacea* (descompuestos y frescos) y machos y hembras de *O. suberosus*.

La extracción de los compuestos químicos volátiles y semivolátiles de las muestras se llevó a cabo por la técnica de micro–extracción SBSE ("Stir Bar Sorptive Extraction"), que se vale de una pequeña barra magnética recubierta de un polímero adsorbente (polidimetilxilosano) que es comercializada con el nombre de "twister" (Fig. 4). El equipo o sistema de captura de volátiles consistió en un frasco de vidrio hermético, que en su interior lleva un twister sujeto a una base metálica para evitar el contacto con la muestra (Fig 5).

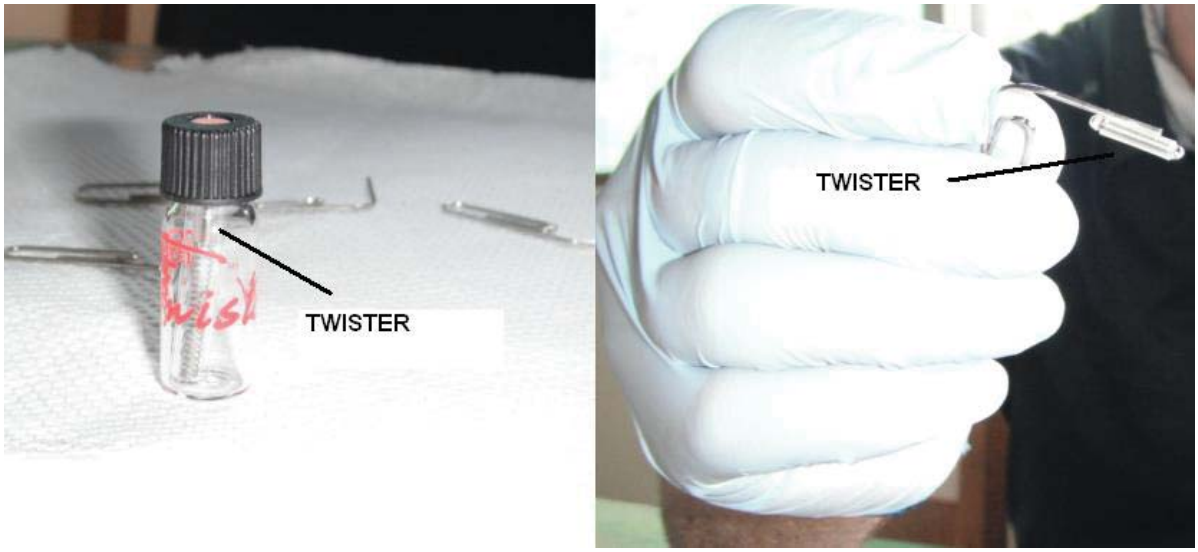

Figura 4. Barra magnética agitadora para micro–extracción SBSE.

Figura 5. Sistema de captura de volátiles.

El sistema de captura de volátiles se dejo actuar durante un periodo de 24 h a 30°C. Los volátiles extraídos se liberaron por desorción térmica mediante el sistema Desorción Térmica Horizontal Gerstel (Fig. 6) para su posterior análisis por GC–MS.

Figura 6. Sistema Desorción Térmica Horizontal Gerstel (TDS–2).

Identificación y cuantificación de compuestos volátiles por Desorción Térmica−Cromatografía de Gases−Espectrometría de Masas

Los twister se llevaron a la Unidad de Servicio Técnicos de Investigación (SSTTI) de la Universidad de Alicante en España, para su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en un equipo HP/Agilent Technologies 6890N y sistema de TDS–2 (Fig. 7). Todo el conjunto lleva como detector selectivo un Espectrómetro de Masas modelo Agilent Tecnologies 5973N con fuente de ionización por impacto de electrones (EI) y analizador de cuadrupolo (baja resolución). El cromatografo de gases fue equipado con una columna DB–05 (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film), utilizando helio como gas acarreador, con una rampa de temperatura inicial de 40°C por 5 min, e incrementando 5°C/min hasta 300°C, y se mantuvo durante 10 min. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la determinación de la masa molecular del compuesto (por ionización química), el uso de una serie de librerías–MS por comparación de índices de retención (WILEY, NIST/NBS y Spectral Database for Organic Compounds, SDBS) y se confirmaron por el análisis de los patrones de fragmentación molecular

La aplicación de la técnica de TDS–CG–MS permitió identificar 83 compuestos volátiles presentes en las muestras que comprenden la fuente de alimentación de adultos y larvas de *O. suberosus* (Fig. 9) y los volátiles emitidos por estos escarabajos (Fig. 10). La tabla 1 muestra los resultados indicándonos un amplio perfil químico que comprenden derivados de azufre y fenoles, hidrocarburos, ácidos grasos, cetonas, entre otros. Una gran parte de los metabolitos identificados son producidos por especies de coleópteros, entre los que destacan algunos derivados de azufre y del fenol, utilizados como feromonas de agregación.

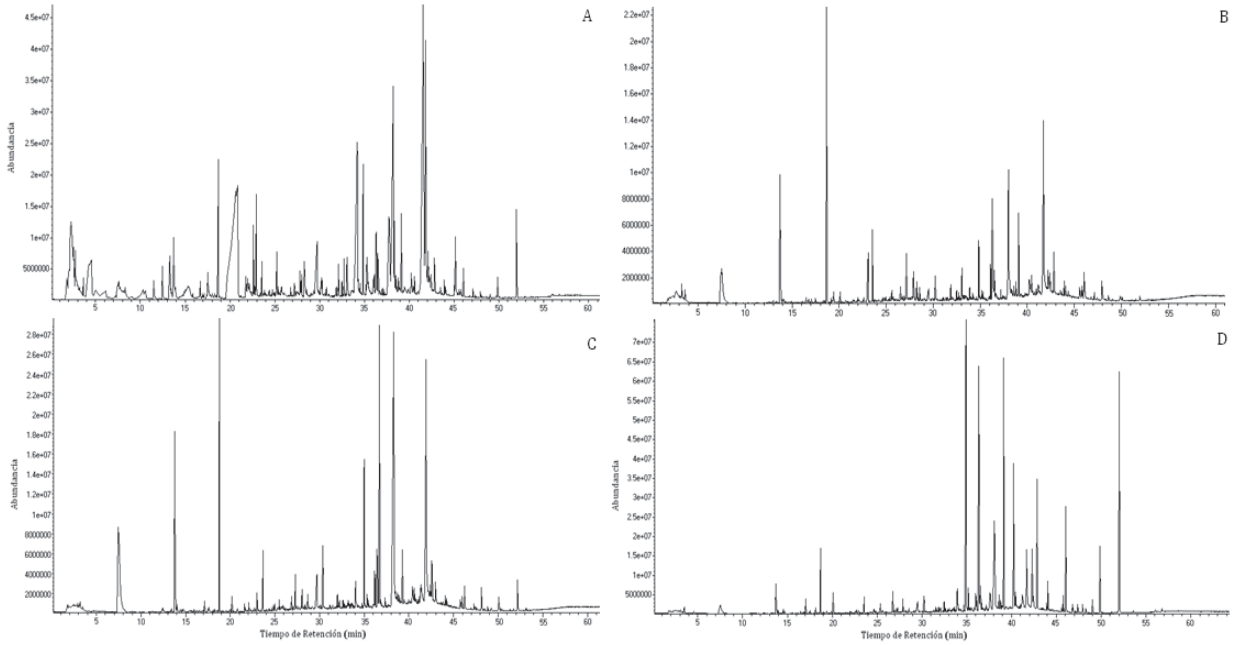

Figura 9. Perfil de volátiles de la fuente de alimentación de *O. suberosus*. A) Cadáveres de tortugas de *L. olivacea*; B) Huevos de *L. olivacea* en descomposición; C) Huevos de *L. olivacea* frescos y D) Huevos de *L. olivacea* recién puestos.

Los compuestos identificados en las muestras de *O. suberosus*, presentan un perfil de volátiles similar en los dos sexos, es decir, no se encontraron diferencias significativas cualitativas en la composición de los extractos de hembras y machos. Gran parte de los compuestos identificados en adultos de *O. suberosus* se encuentran presentes en los elementos que constituyen su fuente de alimento. Los resultados obtenidos hacen plantearse la presencia de semioquímicos

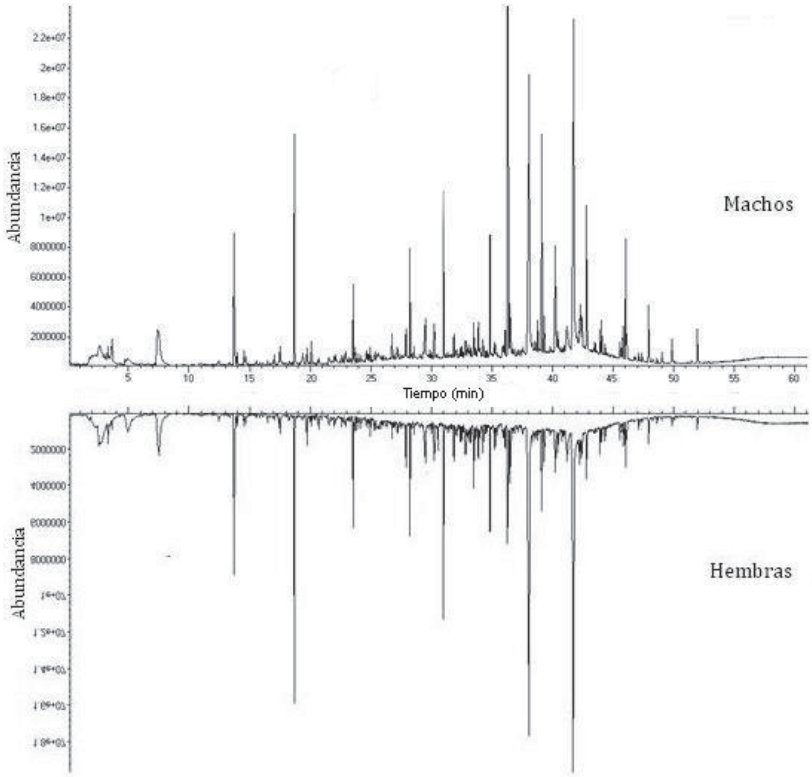

Figura 10. Perfil de volátiles (GC–MS) de extractos de *O. suberosus* macho y hembra.

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de TDS–CG–MS y presentes en la fuente de alimento (CT: Cadáveres de tortuga, HD: Huevos en descomposición, HF: Huevos frescos, HRP: Huevos recién puestos, MOs: Machos de *Omorgus suberosus* y FOs: Hembras de *Omorgus suberosus*. (+) = presencia, (–) = ausencia.

No.	Compuesto	CT	HD	HF	HRP	MOs	HOs
1	1H–Indole	+	+	–	+	–	–
2	1–Octadecene	–	+	–	–	–	–
3	2–ethyl–hexanol	–	–	–	–	–	+
4	2–Undecanone	–	–	–	–	–	+
5	5–Octadecene	–	–	–	–	+	–
6	Acetophenone	+	–	–	–	–	–
7	Alpha–amorphene	–	+	–	–	–	–
8	Anthracene	–	+	–	–	–	–
9	Benzophenone	–	–	–	–	+	+

No.	Compuesto	CT	HD	HF	HRP	MOs	HOs
10	Benzothiazole	–	–	–	–	+	–
11	Cadinene	–	+	–	–	–	–
12	Calamenene	+	–	+	+	+	+
13	Capric acid	+	+	–	+	+	–
14	Caprylic acid	–	–	–	–	+	–
15	Copaene	+	–	+	+	+	–
16	Cyclohexadecane	+	+	–	–	–	–
17	Cyclopentylethyne	–	–	–	–	+	–
18	Decanal	–	–	+	–	+	+
19	Decanoic acid	–	–	–	–	–	+
20	Decanone	–	–	–	–	+	–
21	Dimethyl benzenemethanol	–	–	–	–	–	+
22	Dimethyl disulfide	–	–	–	–	+	+
23	Dimethyl trisulfide	+	–	–	+	+	+
24	Dimethyldecalol	–	+	–	–	–	–
25	Docosane	–	–	–	–	+	–
26	Dodecanamide	–	–	–	+	–	–
27	Dodecanone	–	–	–	–	–	+
28	Eicosane	+	+	–	+	+	+
29	Eicosene	–	+	–	–	–	–
30	Ethyl myristate	+	–	–	+	–	–
31	Ethyl palmitate	–	–	–	+	–	–
32	Geranyl acetone	–	+	+	–	+	+
33	Heneicosane	+	+	+	+	+	+
34	Heptacosane	–	–	–	–	+	–
35	Heptadecane	+	+	+	+	+	+
36	Hexadecanamide	+	–	–	+	–	–
37	Hexadecane	–	+	–	–	–	+
38	Hexadecene	–	–	+	–	+	–
39	Hexadecenoic acid	+	–	–	–	–	–
40	Isopropyl myristate	+	+	+	+	+	–
41	Lauric acid	+	+	+	+	+	+
42	Limonene	–	–	–	–	+	+
43	Linoleic acid	–	+	–	–	–	–
44	Methyl ionone	–	–	–	–	–	+
45	Methyl nonadecane	–	–	–	–	+	+
46	Methyl nonyl ketone	–	–	–	+	–	–
47	Methyl palmitate	–	+	+	+	–	–
48	Methyl stearate	–	+	+	–	–	–
49	Methylindole	+	–	–	+	–	–
50	Methyl–nonadecane	–	–	–	–	–	–
51	Myristic acid	+	+	+	+	+	+

52	N,N–diethyl–3–methyl–benzamide	–	–	–	–	+	–

No.	Compuesto	CT	HD	HF	HRP	MOs	HOs
53	Nonadecane	+	–	+	+	+	+
54	Nonadecene	+	–	–	–	+	+
55	Nonanoic acid	–	–	–	–	+	–
56	Nonanone	+	–	–	–	–	–
57	Octadecane	–	+	+	–	+	+
58	Octadecanoic acid	–	–	–	–	+	–
59	Octadecenamide	–	–	–	+	–	–
60	Octadecene	+	+	+	+	+	+
61	Oleic acid	+	+	+	+	–	+
62	Oxindole	–	–	–	+	–	–
63	Palmitic acid	+	+	–	+	+	+
64	Pentacosane	+	–	+	+	–	+
65	Pentadecane	–	+	+	–	+	–
66	Pentadecanoic acid	+	+	–	+	–	–
67	Pentadecanone	+	–	–	+	–	–
68	Pentadecene	–	–	–	–	–	+
69	Phenol	+	–	–	+	–	–
70	Phenyldodecane	–	–	+	–	–	–
71	Piperidinone	+	+	–	+	–	–
72	Propanoic acid	+	–	–	+	–	–
73	Stearic acid	+	+	–	+	–	+
74	Sulfur	–	+	–	–	+	+
75	Tetracosane	–	–	+	–	+	+
76	Tetradecane	–	–	+	–	+	+
77	Tetradecanol	+	–	–	+	–	–
78	Tetradecene	–	+	–	–	–	–
79	Tricosane	–	+	+	–	+	+
80	Tricosene	–	–	–	–	+	–
81	Tridecane	+	–	–	+	–	–
82	Tridecanone	+	+	–	+	–	–
83	Valeric acid	–	–	–	+	–	–

Una vez determinado el perfil volátil, el siguiente paso consistió en desarrollar una serie de bioensayos en los que se determinaran la actividad o no de los distintos compuestos aislados e identificados. Para ello se realizaron dos tipos de ensayo de laboratorio: ensayos de electroantenografía (EAG) y de olfatometría.

Bioensayos de electrofisiología

La electroantenografía EAG es una técnica neurofisiológica que permite el monitoreo de la percepción de un semioquímico por un insecto. Los insectos, al recibir un estímulo químico, tal como una kairomona o feromona, activan sus receptores olfativos presentes en las dendritas de las neuronas sensoriales desencadenando un proceso de intercambio iónico que acaba con la generación de potenciales de acción, los cuales transmiten la señal olfativa a diferentes glomérulos de los lóbulos olfativos del deutocerebro del insecto. La técnica de EAG permite medir el cambio de potencial bioeléctrico global de la antena debido a la adición de los citados potenciales de acción. Mediante los ensayos de electroantenografía (EAG) pudimos determinar cuáles compuestos son detectados por *O. suberosus* y son candidatos a participar en la comunicación química de esta especie.

Los experimentos de EAG fueron realizados en la Unidad de SSTTI, Universidad de Alicante (Fig. 11) y en el laboratorio de química de la Universidad de Jaén (Fig. 12), España. Para los registros de EAG, la antena del escarabajo fue cortada con unas tijeras de disección y posteriormente montada entre dos electrodos de metal (Fig. 13) conectados a un amplificador (x100) para medir el cambio del potencial eléctrico cuando la antena sea estimulada con los compuestos volátiles. Para ello, se utilizaron estándares químicos comerciales de alta pureza (99%). Entre los compuestos se seleccionaron los siguientes: ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido caprico, benzofenona, geranil acetona, indol, tetradecano, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo y sulfato de dimetilo. La estimulación de la antena se llevó a cabo mediante un controlador de estímulos (Syntech). Así para cada compuesto volátil se analizó la respuesta olfatoria en hembras y machos de *O. suberosus*. Dentro de una pipeta Pasteur se colocó una pieza de papel filtro de 3 x 10 mm (Whatman No. 1), y con una jeringa de cromatografía se depositó una cantidad específica (10 µl) de un compuesto o de hexano (control), en cada caso se dejo evaporar el disolvente durante 30 seg. Para la estimulación de la antena, se dirigió constantemente una corriente de aire puro humidificado (0.7 lt/min) proveniente de una bomba de aire (CS–05 Syntech) hacia la antena mediante un tubo de vidrio en forma de L. La parte de uno de los extremos de la L tiene un pequeño orificio en donde se inserta la pipeta Pasteur con el papel filtro impregnado con la muestra a evaluar. Se aplicaron pulsos de 3 s de aire purificado con un flujo de aire (0.5 lt/min), que empujaron los compuestos de prueba través de la pipeta Pasteur, mediante la activación de un pedal que pulsa un flujo el cual arrastra los vapores del compuesto cargado en el papel filtro y los lleva hacia la antena del insecto. Las señales generadas ingresaron a través de un amplificador de alta impedancia conectado a una interfase

(Interface Data Acquisition Board, IDAC 2, Syntech) que a su vez se encuentra conectada a un ordenador para ser visualizadas y registradas mediante un software de GC–EAD 2010 Syntech (Fig. 14). En este apartado se utilizó una concentración al 100% del compuesto para determinar la actividad en la antena de *O. suberosus.*

Figura 11. Laboratorio de GC–EAD (Syntech 2010), en la Unidad de SSTTI.

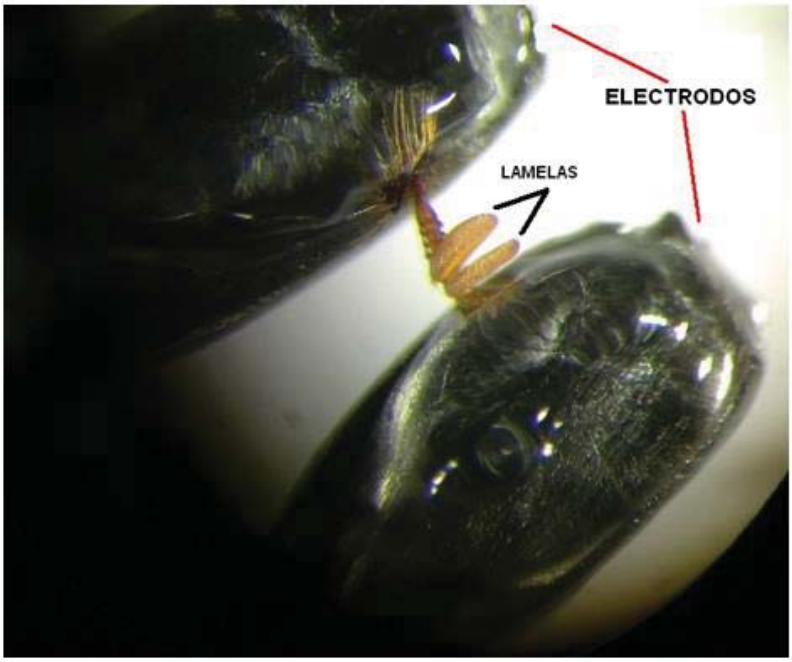

Figura13. Montaje de antena de de *O. suberosus* en un electro de metal.

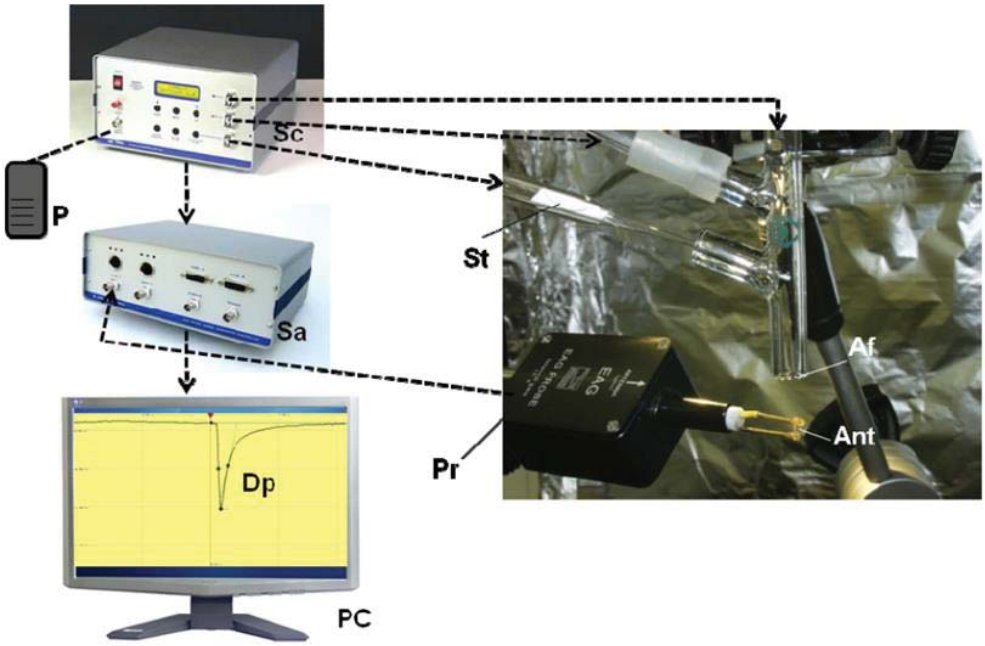

Figura 14. Esquema del sistema utilizado para los ensayos de EAG. Sc: control de estimulos; Sa: modulo para la adquisición de señal (amplificador IDAC 2); P: pedal; St: fuente de estimulo; Pr: sistema PROBE con un microelectrodo; Af: flujo de aire; Ant: antena; Dp: despolarización y PC: computadora.

El comportamiento de la señal de EAG indica que la antena de *O. suberosus* es sensible y muy estable en comparación con otras especies de coleópteros. Los resultados no muestran diferencias significativas entre sexos en los bioensayos cuando *O. suberosus* fue estimulado con los extractos volátiles (n =10). En la tabla 2 se resumen los resultados de los ensayos electroantenográficos. La EAG evidenció que 8 compuestos pertenecientes a diferentes grupos químicos (derivados de azufre, ácidos grasos y compuestos aromáticos) fueron biológicamente activos, mostrando una respuesta electrofisiológica en las antenas de *O. suberosus* (Fig. 15). Entre los volátiles con actividad EAG destacan dimethyl sulfide (DMS), dimethyl sulphoxide (DMSO) y dimethyl trisulfide (DMTS). De los compuestos con actividad biológica en la antena de *O. suberosus*, se seleccionaron los compuestos con antecedentes de actividad biológica en diversos insectos y se realizo un ensayo dosis respuesta (Fig. 16). Por ejemplo, los compuestos derivados de azufre se han reportado como atrayentes en otros grupos de coleópteros, por ejemplo, en algunas especies de *Nicrophorus* (Kalinová et al. 2009, Podskalská et al. 2009). Para estos ensayos no se utilizó el Dimethyl trisulfide (DMTS), a pesar de los buenos resultados de EAG obtenidos, ya que es muy costoso, comparado con los anteriores.

Tabla 2. Resultados EAG en adultos de *O. suberosus* a los estímulos volátiles. CT: Cadáveres de tortuga; HD: Huevos en descomposición; HF: Huevos frescos; HRP: Huevos recién puestos; MOs: Machos de *Omorgus suberosus* y HOs: Hembras de *Omorgus suberosus*.

Compuesto	EAG	Muestra volátil
1H–Indole	+	CT, HD, HRP, MOs, HOs
Benzophenone	–	MOs, HOs
Capric acid	+	CT, HD, HRP, MOs, HOs
Dimethyl sulfide (DMS)	+	MOs, HOs
Dimethyl disulfide (DMDS)	+	MOs, HOs
Dimethyl trisulfide (DMTS)	+	CT, HRP, MOs, HOs
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	–	MOs, HOs
Geranyl acetone	+	HD, HF, MOs, HOs
Linoleic acid	+	HD, MOs, HOs
Oleic acid	+	CT, HD, HF HRP, MOs, HOs
Palmitic acid	–	CT, HD, HRP, MOs, HOs
Stearic acid	–	CT, HD, HRP, MOs, HOs
Tetradecane	–	HF, MOs, HOs

+ = Con actividad
– = Sin actividad

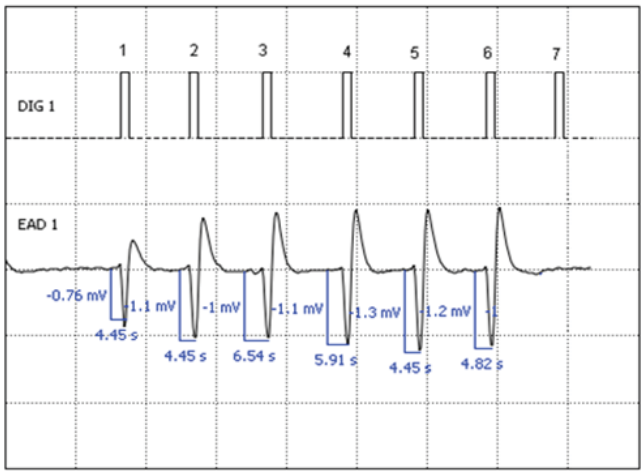

Figura 15. Respuesta electroantenográfica de *O. suberosus* a los diferentes compuestos. El DIG indica la duración del estimulo y el EAD la actividad electroantenográfica. 1) hexano; 2) ácido oleico; 3) indol; 4) DMDS; 5)DMS; 6) geranil acetona; 7) blanco de aire.

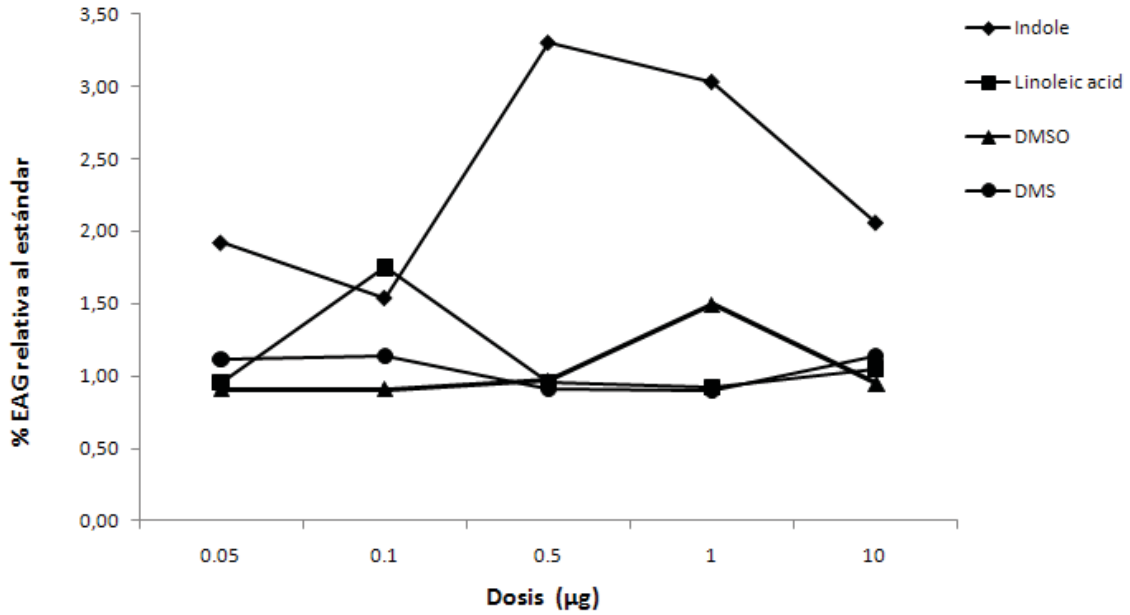

Figura 16. Curva dosis-respuesta EAG en *Omorgus suberosus*.

La gráfica dosis-respuesta EAG revela que el ácido linoleico, el DMS y el DMSO son activos a una dosis baja, no se observa un cambio significativo en la respuesta. En el caso del indol, la mayor respuesta se observa en la dosis de 0.5 µg, con 3.03 mV. A partir de estos resultados se inicio un protocolo para los bioensayos de olfatometría, para tratar de discernir, cuáles de los compuestos inducen un comportamiento atractivo o agregativo para los adultos de *O. suberosus*.

Bioensayos de olfatometría

La olfatometría es una técnica muy común como bioensayo de comportamiento en insectos. Se utilizaron 4 olfatómetros que consistieron en una arena central con cuatro salidas montados de forma vertical (Fig. 17). La arena central consistió en un cono truncado de plástico (un radio superior de 60 cm y un radio inferior de 40 cm) con vermiculita estéril como substrato. El papel de este substrato fue disminuir el estrés para los escarabajos antes de cada experimento. En el depósito de la arena central se montaron los tubos (brazos) en donde se depositaran los envases de plástico en los extremos con los compuestos a probar. Cada tubo consistió en un cilindro de metacrilato (50 cm de longitud, 5 cm de radio externo y 4.75 cm de radio interno) colocado horizontalmente en uno de los agujeros de 5 cm-diámetro del depósito central. Los envases de plástico se colocaron para capturar a los escarabajos con respuesta positiva a los compuestos probados. Se hizo pasar una corriente de aire humedecido y filtrado por carbón activado, dentro de los envases de plástico del olfatómetro, con un flujo total de 1 L/min. El centro de la arena contó con un ventilador de aire hacia fuera y cabe destacar que a los olfatómetros utilizados para medir la respuesta a los compuestos azufrados se les montó adicionalmente un tubo para suministrar el aire a una campana de extracción (Fig. 18). Todos los elementos fueron previamente lavados con acetona y hexano para eliminar cualquier resto de compuesto volátil.

Figura 17. Olfatómetro de cuatro brazos.

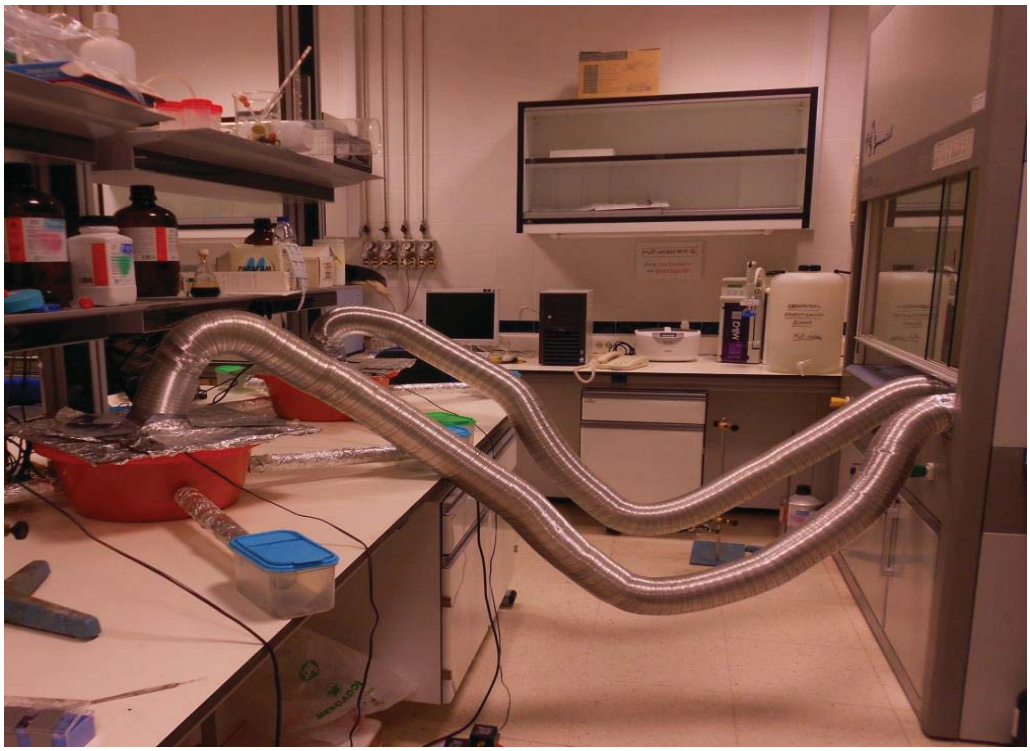

Figura 18. Olfatómetros de cuatro brazos con salida de aire a campana de extracción.

La actividad biológica de los compuestos identificados con actividad electrofisiológica en *O. suberosus*, fue analizado mediante ensayos de olfatometría conductual de elección. Para estos ensayos se preparó una cantidad del compuesto a ensayar, de 100 ml/difusor para los compuestos azufrados (DMS y DMSO) y el ácido linoleico, o de 1 mg/difusor para el indol, empacada individualmente dentro de un tubo difusor. Enseguida se colocaron alternadamente dos difusores con el compuesto a ensayar y dos viales vacios (blanco) dentro de los envases de plástico de los olfatómetros. Con la intención de hacer comparaciones directas entre dos estímulos y dos controles. Se contó el número de insectos y el tipo de elección a las 12 h de haber situado los insectos en el olfatómetro, y se determinó el porcentaje de los mismos con respecto al total de insectos. Así, se definió como respuesta, la entrada del insecto a uno de los brazos del olfatómetro, y como no respuesta, a la ausencia de elección al final del bioensayo. En total se emplearon 20 o 40 individuos diferentes por cada serie de estímulos. Antes de realizar los ensayos de olfatometría, todos los individuos de *O. suberosus* fueron sometidos a un ayuno durante tres días. Los olfatómetros se mantuvieron trabajando a una temperatura entre 28 a 30°C en el cuarto de prueba biológica.

La respuesta olfativa de *O. suberosus* fue positiva para todos los compuestos ensayados (Fig. 19), se observó una conducta de atracción hacia las fuentes de olor. Se encontraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis test: $H_4 = 40{,}89$, $N = 80$, $p < 0.001$) con respecto al control (Fig. 20). Es importante destacar que a los poco minutos de comenzar la prueba, individuos de *O. suberosus* presentaron una respuesta de atracción hacia el DMS y el DMSO (Fig. 21).

Figura 19. Respuesta olfativa positiva de *O. suberosus* a los distintos compuestos ensayados.

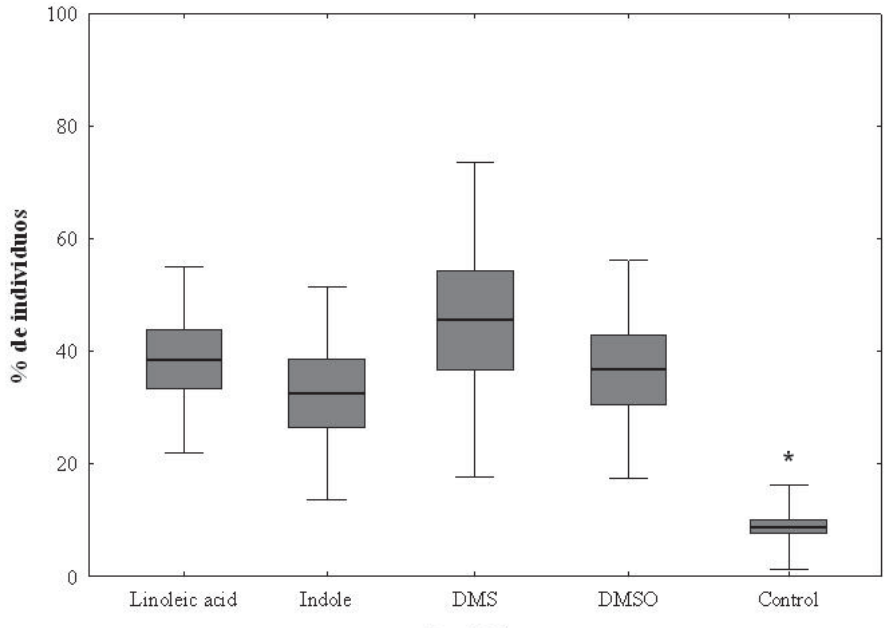

Figura 20. Respuesta de *O. suberosus* a cuatro diferentes señales olfativas. Las líneas horizontales representan las medianas, las cajas muestran el error estándar y las líneas verticales representan la desviación estándar.

Figura 21. Respuesta olfativa de *O. suberosus* hacia el DMS y el DMSO a los 30 min de prueba.

DISCUSIÓN

Con el fin de contar con mayor información acerca de *O. suberosus* y encontrar alternativas para su manejo, se ha avanzado en el conocimiento de los aspectos básicos de su comportamiento. A la fecha a pesar de los esfuerzos por implementar medidas para su control en el Santuario Playa La Escobilla, Oaxaca, no se han obtenido resultados consistentes. De ahí que se haya optado por explorar otras opciones mediante el uso de compuestos atrayentes, cuyo empleo para el manejo de otras especies en el mundo ha dado resultado.

Se ha realizado un profundo estudio de los semioquímicos de la fuente de alimentación y de *O. suberosus* para su aplicación en el seguimiento y control de este escarabajo. Con el perfil químico analítico de los extractos volátiles de la fuente de alimento y de los individuos de *O. suberosus*, fue posible seleccionar ciertos compuestos para identificar su actividad en las antenas de estos escarabajos. Los bioensayos de electroantenografía indican una elevada actividad sobre hembras y machos de *O. suberosus* de algunos compuestos volátiles. El hecho que las respuestas de EAG entre hembras y machos de este trógido no resultaron significativamente diferentes, cuando se estimularon con los diferentes compuestos, sugiere que esta especie puede usar estos volátiles como señales en la búsqueda de alimento. En los bioensayos olfatométricos se encontró que *O. suberosus* es atraído hacia las distintas fuentes de olor y sólo se encontraron diferencias significativas con respecto al control. Estos resultados sugieren que los individuos de *O.*

suberosus, responde de igual forma hacia volátiles liberados por la fuente de alimento (DMS y DMSO) y de sus congéneres (Linoleic acid y 1H- Indole). Todos estos compuestos presentan antecedentes de actividad biológica en diversos insectos. Dichos compuestos podrían tener actividad en condiciones de campo con un diseño de trampa y difusor óptimos. La disponibilidad de atrayentes eficaces para *O. suberosus* supondría una gran ayuda para el control de la plaga.

En general, no existen investigaciones acerca de los compuestos volátiles ni de la ecología química en Trogidae. Los resultados presentados en este informe abren todo un campo de conocimiento sobre la bases de la ecología química de *O. suberosus* para el desarrollo de un sistema de monitoreo y trampeo para su control en los nidos de la tortuga marina *L. olivacea*. Las investigaciones futuras, incluidos los experimentos de campo son necesarios para entender el problema en su complejidad.

REFERENCIAS

Halffter G, Escobar F, Baena ML, Ros M (2009) Distribución espacial y evaluación del daño de *Omorgus suberosus* (Coleoptera: Trogidae) en nidos de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* en el Santuario Playa Escobilla, Oaxaca. Informe final 63 pp

Heuskin S, Verheggen F, Haubruge E, Wathelet JP, Lognay G (2011) The use of semiochemical slow–release devices in integrated pest management strategies. Biotechnol Agron Soc Environ 15(3):459–470

Kalinová B, Podskalská H, Rùžièka J, Hoskovec M (2009) Irresistible bouquet of death — how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus*) attracted by carcasses. Naturwissenschaften 96: 889–899

Law JH, Regnier FE (1971) Pheromones. Annual Rev Biochem 40:533–548

López RE, Aragón L (1994) Programa de investigación y conservación de las Tortugas Marinas. Informe final de las actividades realizadas durante la temporada de anidación 1992–93 de la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en la el Santuario Playa La Escobilla, Tonameca, Pochutla, Oaxaca. Universidad Autónoma Benito Juárez, Oaxaca

López–Reyes EM, Harfush M (2000) Determination of the percentage of olive ridley (*Lepi–dochelys olivacea*) In situ nests that are affected by beetles at Escobilla beach, Mexico. p. 83 In: A. Mosier, A. Foley and B. Brost (eds). Proceedings of the Twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA. Tech. Memo NMFS–SEFSC–477, 369 pp

Podskalská H, Rùžièka J, Hoskovec M, Šálek M (2009) Use of infochemicals to attract carrion beetles into pitfall traps. Entomol Exp Appl 132: 59–64