

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DEL PERÚ**

Escuela de Posgrado



Diseño y desarrollo de biotampas avanzadas para la desinfección
de granjas avícolas afectadas por *Alphitobius diaperinus*
(Coleoptera: Tenebrionidae)

Tesis para obtener el grado académico de Doctora en Ingeniería que
presenta:

Erika Lizet Milagros Calla Quispe

Asesor:

Alfredo Jesús Ibáñez Gabilondo

Co-asesor:

Carlos Gabriel Martel Gora

Lima, 2022



A mis madres Luzmila y Nelly por su
esfuerzo y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar un profundo agradecimiento a mi asesor, el Dr. Alfredo Ibáñez, por su apoyo constante, guía, motivación y amplio conocimiento brindado. De igual forma, el agradecimiento a mi co-asesor, el Dr. Carlos Martel, por sus constantes asesorías amistosas y guía durante el desarrollo de esta investigación. Ambos han enriquecido mis conocimientos, muchas gracias por ello y por la paciencia infinita que tuvieron conmigo a lo largo del desarrollo de esta investigación y redacción de esta tesis.

Esta investigación fue apoyada a través del "Proyecto de Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica (8682-PE)" mediante una beca otorgada para mis estudios de posgrado, financiado por el Banco Mundial, CONCYTEC y PROCIENCIA (010-2018-FONDECYT-BM-PDAEG). Adicionalmente, agradezco a "The Max Planck Partner Group" por su apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación. Asimismo, a la Pontificia Universidad Católica del Perú por acogerme en sus aulas durante los estudios de posgrado para llevar a cabo un buen desempeño de la investigación, desarrollándose ampliamente en el laboratorio del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA).

A cada profesor presente en esta etapa, en especial a la Dra. Fanny Casado y la Dra. Madina Mansurova, por el aporte a mi formación y apoyo brindado a lo largo de la tesis.

De manera muy particular, agradezco el apoyo brindado por mi familia, sobre todo a mis madres Luzmila y Nelly por su apoyo y enseñarme a siempre ser perseverante. Asimismo, a mi tía Eva, quien me acompañó durante todo este proceso.

A mis queridos amigos Miki, Hammerly y Karen por el apoyo proporcionado en la etapa experimental, los consejos brindados y amena compañía durante la realización de mi trabajo de investigación.

Un especial reconocimiento a Sol y Anchor por acompañarme durante el día y madrugadas en el proceso de redacción.

Son muchas las personas que me han ayudado durante el proceso de mi trabajo doctoral, a todos ellos mi aprecio y agradecimiento por su compromiso y apoyo incondicional.

RESUMEN

Los escarabajos de la especie *Alphitobius diaperinus* son una de las mayores plagas de granjas avícolas a nivel mundial. Las larvas y adultos de esta especie causan graves pérdidas económicas y daños sanitarios de los productos cárnicos y sus derivados comercializados. Actualmente se vienen desarrollando métodos químicos alternativos mediante el uso de semioquímicos en biotrampas para disminuir el uso de insecticidas como control rutinario de esta plaga. Sin embargo, se precisa mayor investigación con respecto a la identificación de las señales químicas de *A. diaperinus* y evaluación de su comportamiento conductual frente a esas señales, siendo estos factores clave para la eficacia de las biotrampas.

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo diseñar y desarrollar biotrampas avanzadas usando semioquímicos de *A. diaperinus* como herramientas químicas con el fin de reducir las poblaciones de esta plaga. Para ello, primero se evaluó, en horas de mayor actividad sexual, el efecto de las señales químicas emitidas por adultos de *A. diaperinus* de ambos sexos (hembras y machos) en sus estadios de experiencia sexual (virgen y experimentado) en la atracción a largo alcance y en las respuestas de comportamiento de apareamiento (tocar, montar y copular) a corto alcance sobre otros adultos mediante ensayos olfatométricos. Los adultos de *A. diaperinus* demostraron un comportamiento complejo en la atracción y apareamiento basado en señales olfativas de corto y largo alcance, las cuales se ven afectadas por el sexo y la experiencia sexual. Por un lado, se identificaron las señales olfativas asociadas al sexo y experiencia sexual que afectan el apareamiento y la atracción en adultos de *A. diaperinus*, lo cual permitió detectar un total de 67 señales químicas de largo alcance mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, de las cuales 28 señales son específicas a cada sexo y 39 señales generalizadas que emiten ambos sexos. Por otro lado, se detectaron 19 señales químicas de corto alcance relacionadas a su experiencia sexual, de las cuales todas las señales se detectaron en ambos sexos, mientras que solo 14 se detectaron en adultos vírgenes. Entre los compuestos identificados se encuentran alcanos, quinonas, benzotiazoles, benzofenonas, ácidos grasos, ésteres y terpenos. Adicionalmente, se evaluaron las respuestas electrofisiológicamente activas a las antenas de machos de las señales químicas de adultos de *A. diaperinus* según su sexo y experiencias sexual mediante cromatografía de gases acoplada a electroantenografía, detectando un total de 39 señales químicas electrofisiológicamente activas. Entre los compuestos identificados se encuentran benzoquinonas, limoneno, alcanos, ácidos grasos y ésteres. Posteriormente, se describieron los procesos de manufactura involucrados en el diseño de trampas que permita la captura de la plaga en estudio. Para su manufactura, se contempló parámetros físicos, métodos químicos de control y aspecto ecológico de esta plaga. Finalmente, se implementó y validó en laboratorio las biotrampas avanzadas fabricadas utilizando las señales de largo alcance de machos como herramientas químicas para el control de *A. diaperinus*.

Los resultados del presente proyecto permiten sentar las bases a nivel nacional de una tecnología alternativa a los métodos convencionales para el control de la plaga de *A. diaperinus* en industrias avícolas. Asimismo, se espera contribuir con la generación de una tecnología limpia y simple que permita mejorar la productividad de la actividad avícola.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción general.....	13
1.1. <i>Avicultura industrial.....</i>	13
1.2. <i>Alphitobius diaperinus.....</i>	14
1.2.1. Aspecto ecológico.....	14
1.2.2. Impacto económico.....	15
1.3. <i>Métodos de control.....</i>	15
1.4. <i>Semioquímicos como herramientas químicas en la manufactura de biotrapas....</i>	17
1.5. <i>Identificación de semioquímicos.....</i>	20
2. Formulación del problema de investigación.....	21
2.1. <i>Hipótesis.....</i>	21
2.2. <i>Objetivos.....</i>	22
2.2.1. Objetivo general.....	22
2.2.2. Objetivos específicos.....	22
2.3. <i>Estructura de capítulos.....</i>	22
3. Capítulo 1. Identificación y estudio de las señales olfativas asociadas al sexo y experiencia sexual que afectan el apareamiento y la atracción en <i>Alphitobius diaperinus</i>.....	24
3.1. <i>Introducción.....</i>	24
3.2. <i>Metodología.....</i>	26
3.2.1. Colecta y crianza de <i>A. diaperinus</i>	26
3.2.2. Olfatometría.....	27
3.2.3. Extracción e identificación de semioquímicos.....	30
3.3. <i>Resultados.....</i>	34
3.3.1. Olfatometría.....	34
3.3.2. Análisis químicos.....	43
3.4. <i>Discusiones.....</i>	54
4. Capítulo 2. Diseño de trampas avanzadas.....	61
4.1. <i>Evaluación de criterios para el diseño y desarrollo de biotrapas avanzadas....</i>	61
4.1.1. Estrategias de control.....	61
4.1.2. Dispositivos emisores.....	62

4.2.	Revisión de métodos basados en semioquímicos para el control de <i>A. diaperinus</i> .	64
4.2.1.	Estrategias de atracción (sistemas “pull”)	64
4.2.2.	Estrategias de repulsión y atracción (sistemas “push-pull”)	66
4.2.3.	Estrategias de atracción e infección	67
4.3.	Métodos de control existentes en el mercado para el control de <i>A. diaperinus</i> en galpones	69
4.4.	Diseño de biotrapas avanzadas	70
5. Capítulo 3. Manufactura y validación en laboratorio de biotrapas avanzadas para el control de <i>Alphitobius diaperinus</i>		74
5.1.	Introducción	74
5.2.	Metodología	75
5.2.1.	Cría de insectos	75
5.2.2.	Colecta de herramientas químicas	75
5.2.3.	Verificación de herramientas químicas mediante ensayos olfatométricos	76
5.2.4.	Validación de las biotrapas avanzadas	77
5.3.	Resultados	82
5.3.1.	Evaluación de herramientas químicas	82
5.3.2.	Validación de biotrapas avanzadas	83
5.4.	Discusiones	87
6. Conclusiones generales		90
7. Referencias bibliográficas		93
ANEXOS		105
Anexo 1. <i>Alphitobius diaperinus</i>		105
Anexo 2: Logros académicos		106

NOTACIONES

SÍMBOLOS

°C	grado centígrado
cm	centímetro
eV	electronvoltio
h	hora
m/z	relación masa/carga
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
μL	microlitro
μm	micrómetro



ABREVIATURAS

ACP	Análisis de componentes principales [PCA]
ANOVA	Análisis de varianza
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
dFexp, dFexp*	hembra experimentada lavada
CG	Cromatografía de gases [GC]
CI	Ionización química
DDA	adquisición dependiente de datos
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano
EI	Ionización electrónica
EM	Espectrometría de masa [MS]
EM, EM ²	Espectrometría de masas en tándem [MS-MS, MS ²]
exp	experimentado
EQ	número de equivalentes
Fexp	hembra experimentada
Fexp*, Fexp**	hembra experimentada muerta por congelación
FID	Detector de ionización de llama
Fv	hembra virgen
Fv*	hembra virgen muerta por congelación
GC-EAD	Cromatografía de gases acoplado a detección antenográfica
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Hex	hexano
HR	humedad relativa
Mexp	macho experimentado
MEFS	Microextracción en fase sólida [SPME]
Mv	macho virgen
NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico
PERMANOVA	Análisis de varianza multivariante permutacional
RI	Índice de retención de Kovats
TIC	cromatograma de iones totales
v	virgen
VOC	volátiles

[Entre corchetes la sigla en inglés]

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del coleóptero <i>Alphitobius diaperinus</i>	14
Figura 2. Métodos de control de <i>Alphitobius diaperinus</i> en granjas avícolas..	17
Figura 3. Proceso de manufactura de biotrapas avanzadas.....	18
Figura 4. Esquema del ensayo de comportamiento de apareamiento.....	30
Figura 5. Atracción de los adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> hacia señales olfativas emitidas por otros adultos, clasificados según su sexo y experiencia sexual.....	35
Figura 6. Secuencia de apareamiento de machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> con hembras en base a la experiencia sexual..	36
Figura 7. Respuestas conductuales de apareamiento de machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> con hembras vivas según su sexo y experiencia sexual.....	38
Figura 8. Respuestas conductuales de apareamiento de machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> con hembras muertas según su sexo y experiencia sexual.....	41
Figura 9. Respuestas conductuales de apareamiento de machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> con hembras muertas según su sexo y experiencia sexual..	42
Figura 10. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz filtrada de señales químicas de largo alcance de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> muestra las puntuaciones de PCA y el gráfico de cargas..	44
Figura 11. Cromatogramas GC-MS (APPI) de señales químicas de largo alcance en adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> según su sexo ..	46
Figura 12. Escalamiento no multidimensional (NMDS) de señales químicas de largo alcance de adultos experimentados de <i>Alphitobius diaperinus</i> . ..	47
Figura 13. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz filtrada de señales químicas de corto alcance de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> muestra las puntuaciones de PCA y el gráfico de cargas..	48
Figura 14. Cromatogramas GC-MS (CI) de señales químicas de corto alcance en adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> según su sexo y condición sexual.....	50

Figura 15. Escalamiento no multidimensional (NMDS) de señales químicas de corto alcance de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> clasificados por sexo y experiencia sexual.....	51
Figura 16. Respuestas de las antenas de Mexp por GC-EAD frente a señales químicas de Fexp detectadas por GC-FID obtenidas de los extractos de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i>	54
Figura 17. Conformación “pull” de las biotrapas en campo para el control de <i>Alphitobius diaperinus</i>	65
Figura 18. Conformación “pull” y “push-pull” de las biotrapas en campo para el control de <i>Alphitobius diaperinus</i>	66
Figura 19. Conformación de las biotrapas de atracción e infección en campo para el control de <i>Alphitobius diaperinus</i>	68
Figura 20. Trampa “CAPT 7” actuando como sistema de atracción para el control de <i>Alphitobius diaperinus</i> en granjas avícolas.....	70
Figura 21. Imágenes de la trampa XLURE disponible en el mercado..	71
Figura 22. Dibujo mecánico de la trampa XLURE MST.....	72
Figura 23. Diseño de la trampa física para la captura de <i>Alphitobius diaperinus</i> ..	73
Figura 24. Diseño de la distribución de biotrapas en sistemas de atracción “pull” en la caja de plástico y rotación de las posiciones de las biotrapas.....	79
Figura 25. Adultos experimentados atrapados en las biotrapas después de los ensayos de su validación.....	80
Figura 26. Diseño con dos biotrapas, una conformación alternativa al sistema de atracción “pull”.....	81
Figura 27. Diseño de simulación de un galpón con diversas trampas y posibles lugares donde los insectos pueden esconderse..	82
Figura 28. Atracción de los adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> hacia las señales químicas de larga distancia obtenidas de otros adultos, clasificados según su sexo y experiencia sexual.....	83

Figura 29. Respuestas atractivas de adultos experimentados de <i>Alphitobius diaperinus</i> hacia biotrapas en sistemas de atracción “pull”.....	84
Figura 30. Respuestas no atractivas de adultos experimentados de <i>Alphitobius diaperinus</i> hacia biotrapas.....	85
Figura 31. Respuestas atractivas de adultos experimentados de <i>Alphitobius diaperinus</i> hacia biotrapas en sistemas de atracción.....	86
Figura 32. Respuestas atractivas de adultos experimentados de <i>Alphitobius diaperinus</i> hacia biotrapas en simulación de un galpón con diversas trampas.....	87
Figura 33. Características anatómicas de pupas y adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> ...	105



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química reportada en adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> , según su sexo y origen	19
Tabla 2. Condiciones instrumentales del GC-MS	32
Tabla 3. Comportamiento de apareamiento (en segundos; media \pm SD) de adultos de machos de <i>Alphitobius diaperinus</i> con hembras muertas según su sexo y experiencia sexual	40
Tabla 4. Cantidad media (10^4 abundancia \pm SD) de señales químicas de largo alcance detectadas en adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i>	45
Tabla 5. Cantidad media (ng/insecto \pm SD) de señales químicas de corto alcance detectadas en adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i>	49
Tabla 6. Compuestos electrofisiológicamente activos detectados por antenas de Mexp en Fexp, Fv y Mv de <i>Alphitobius diaperinus</i>	53
Tabla 7. Parámetros usados en la colecta de herramientas químicas y validación de biotampas.....	78

1. Introducción general

1.1. Avicultura industrial

En el 2021, el subsector avícola representó el 26,4 % del Valor Bruto del sector Agropecuario, el cual representa aproximadamente el 2 % del PBI nacional, convirtiéndose en el proveedor principal de proteína de origen animal en el Perú. Esto evidencia que el sector avícola es clave en el desarrollo de la producción agropecuaria (Inonán Oyola & León Hinostroza, 2021, 2022). La producción avícola en el Perú y en el mundo es una de las actividades pecuarias caracterizadas por un constante crecimiento. Aunque la crisis generada por la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 afectó económicamente a muchos sectores industriales, el sector agropecuario tuvo un crecimiento de 3,8% durante el 2021 en comparación con el inicio de la pandemia por el COVID-19 (Inonán Oyola & León Hinostroza, 2021; Luque Zúñiga et al., 2021). Sin embargo, aún con la alta demanda y rendimiento, son varios los problemas a los que se enfrenta. Algunas de las dificultades encontradas de importancia económica y sanitaria es el desarrollo de plagas en las instalaciones por roedores e insectos (moscas y escarabajos). Entre la plaga de escarabajos de mayor índice en granjas avícolas están *Carcinops pumilio* (Coleoptera: Histeridae), *C. troglodytes* (Coleoptera: Histeridae), *Euspilotus rubriculus* (Coleoptera: Histeridae), *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae), *Mezium americanum* (Coleoptera: Ptinidae), *Somotrichus unifasciatus* (Coleoptera, Carabidae), *Gnathocerus cornutus* (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), siendo este último el de mayor incidencia en las granjas avícolas (70-95%). *Alphitobius diaperinus* se reproduce rápidamente mostrando incluso un incremento de 5000 a 18000 insectos en tan solo seis semanas (Calibeo-Hayes et al., 2005; Chernaki-Leffer et al., 2007; Denux & Zagatti, 2010; Díaz et al., 2008; Galindo Acosta, 2021; Pinto et al., 2009; Retamales et al., 2011; Rodríguez Miranda & Grillo Ravelo, 2019; Strother & Steelman, 2001).

1.2. *Alphitobius diaperinus*

1.2.1. Aspecto ecológico

El escarabajo *A. diaperinus* pertenece a la familia Tenebrionidae. Aunque es originario del continente africano, su distribución es cosmopolita. Su ciclo de vida consta de 4 estadios, ver Figura 1, que en condiciones óptimas de temperatura y humedad puede llegar a la etapa adulta en tan solo 60-80 días. Los individuos de *A. diaperinus* se desarrollan principalmente en la cama de los galpones, debido al abundante alimento y las condiciones de temperatura y humedad, aunque ciertos estadios completan las fases en los materiales aislantes que rodean los galpones, debido a la protección que ofrecen (Crippen & Esquivel, 2012; Domínguez, 2012; Dunford & Kaufman, 2006; Hassemer et al., 2016; Robinson, 2005). Estos escarabajos actúan como vectores de virus (como leucosis, coronavirus, influenza aviar, enfermedades de Marek, Newcastle y Gumboro; Goodwin & Waltman (1996); McAllister et al. (1995)), bacterias (como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Aspergillus spp.* y *Staphylococcus ssp.*, Agabou & Alloui (2010); Hazeleger et al. (2008); Leffer et al. (2010); Roche et al. (2009)) y hongos (L. F. A. Alves, Alves, Bressan, Neves, & Alves, 2004; da Soares et al., 2018) patógenos que pueden causar pérdida de peso e incluso la muerte en las aves (Arena et al., 2018; Dinev, 2013; Retamales et al., 2011; Singh & Johnson, 2012).

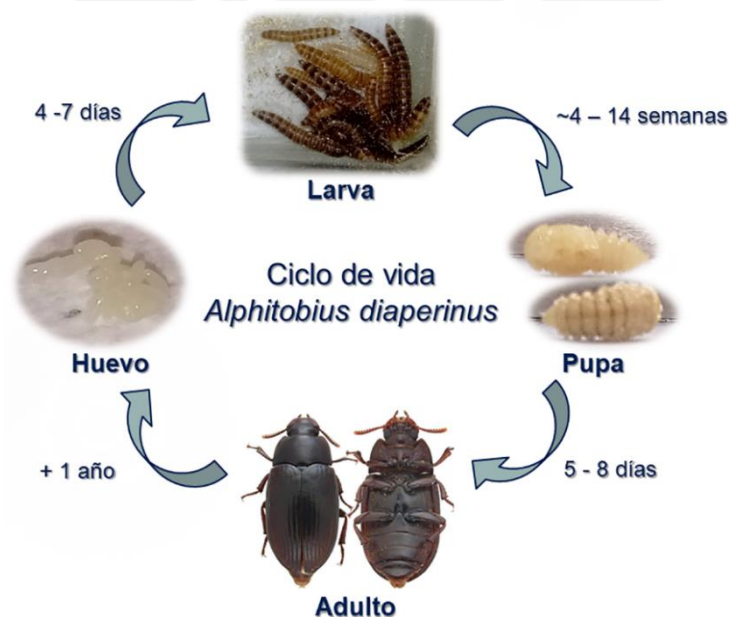


Figura 1. Ciclo de vida del coleóptero *Alphitobius diaperinus*.

1.2.2. Impacto económico

Alphitobius diaperinus es el responsable de daños nutricionales, comerciales, sanitarios y estructurales, generando así graves pérdidas económicas en la industria avícola, debido a la inversión en pesticidas y medicamentos para prevenir enfermedades en las aves. Por ejemplo, una granja avícola en Perú requiere una inversión de alrededor de USD 800 000 por año en medicamentos para prevenir enfermedades en los pollos, mientras que en Estados Unidos presenta pérdidas anuales de USD 839 millones atribuidas a los costos ambientales y sociales por el uso de los plaguicidas (Llaque Ramos, 2009; Pimentel, 1992; Pimentel et al., 1980). El daño nutricional resulta de la ingestión de larvas y adultos por las aves, perjudicando el desarrollo de estas por la reducción del consumo de alimento balanceado. Además, la ingesta del insecto provoca lesiones internas en el pollo, dejándolos vulnerables a infecciones, lo que conlleva a daños sanitarios en las aves, pérdidas comerciales y aumento de los costos de producción (Domínguez, 2012; Santo I Monteys, 2011; Uemura et al., 2008). El daño estructural lo causan las larvas al intentar pupar, pues perforan los materiales aislantes de las instalaciones (Alexandre et al., 2006). Más aún, al completar su fase adulta en aproximadamente dos meses, estos se diseminan rápidamente por los galpones y sus poblaciones aumentan con cada nuevo lote de pollos producidos (cada 1–1,5 meses se produce un lote de pollo). Los métodos físicos y químicos (insecticidas) son insuficientes para su control, además, los insecticidas causan daños sanitarios en las aves y sus productos derivados que llegan al consumidor final (Alencar, 2015; Devine et al., 2008; Domínguez, 2012; Llaque Ramos, 2009; Pimentel, 1992; Pimentel et al., 1980; Santo I Monteys, 2011). Por lo tanto, se amerita efectivas estrategias de control que beneficie toda la cadena productiva avícola.

1.3. Métodos de control

Los métodos desarrollados para el manejo y control de esta plaga pueden ser físicos, químicos y/o biológicos (ver Figura 2). La mayoría de las estrategias para controlar esta plaga se basan en la aplicación conjunta de métodos físicos como la

reposición cíclica de las camas de paja en el sistema de producción y métodos químicos como el uso de insecticidas (Domínguez, 2012; Dunford & Kaufman, 2006; Hassemer et al., 2019; Rodríguez et al., 2013; Santo I Monteys, 2011). Sin embargo, aunque los métodos químicos son eficientes en reducir la población de estos escarabajos, existen problemas asociados a su toxicidad y la resistencia que ha desarrollado esta plaga a varios insecticidas (Rumbos et al., 2019). Por ejemplo, insecticidas a base de carbamatos, fosforados o piretroides son encontrados en trazas dentro de la carne de pollo debido a la rutinaria fumigación de paredes y suelo de los galpones, amenazando así la entrega de productos inocuos (del Valle et al., 2016; Wolf et al., 2015; Zorzetti et al., 2015). En efecto, el uso de plaguicidas representa un peligro grave para la salud y el medio ambiente, por ello se busca continuamente métodos alternativos a su uso. Una alternativa a los métodos químicos es la aplicación conjunta de métodos físicos (alterando las condiciones de temperatura y humedad de las granjas, Wolf et al. (2015)) y biológicos (uso de especies patógenas para *A. diaperinus*; Hassemer et al. (2020); Juárez Figueroa (2007)). Sin embargo, las desventajas que presentan están asociadas a los altos costos por su aplicación y bajas tasas de mortalidad que generan en *A. diaperinus*. Por lo expuesto, los métodos químicos son más eficientes en términos de mortalidad, sin embargo, su aplicación tiene severas consecuencias sanitarias. Por ello, actualmente se desarrollan métodos químicos alternativos usando sustancias no tóxicas, como el uso de trampas con semioquímicos (señales químicas para comunicación) para el control de plagas (Yew & Chung, 2015).



Figura 2. Métodos de control de *Alphitobius diaperinus* en granjas avícolas. Método (A) físico (granja avícola después de limpieza de las camas), (B) químico (aplicación de insecticidas) y (C) biológico (aplicación de patógenos contra insectos).

1.4. Semioquímicos como herramientas químicas en la manufactura de biotrapas

La manufactura avanzada es la aplicación de tecnologías y metodologías innovadoras (herramientas) para obtener un producto de calidad altamente competitivo en el mercado a partir de materias primas (Castillo, 2017). En la presente investigación se utilizarán trampas físicas como materia prima, en las cuales se incorporarán señales químicas (herramientas químicas) para el proceso de manufactura de trampas avanzadas, también llamada biotrampa. Las ventajas de biotrapas sobre insecticidas es que las señales químicas usadas les permiten ser mucho más eficiente y específica en la captura de una población de insectos en particular, ya que estas señales atraerían a los insectos hacia el interior de la trampa permitiendo su captura. A continuación, ejemplificamos el proceso de manufactura avanzada de las biotrapas.

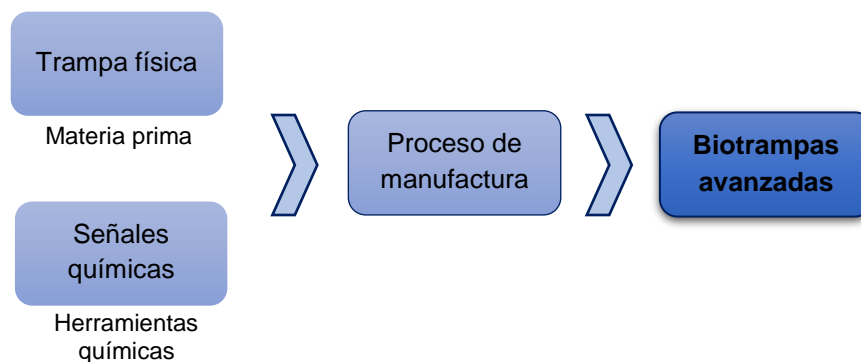


Figura 3. Proceso de manufactura de biotrapas avanzadas.

Las señales químicas que libera una especie para comunicarse con otra especie (aleloquímicos) se han investigado por su acción de manipular el comportamiento conductual de la otra especie, los cuales se han aplicado en diversos métodos de control de plagas (Acevedo, 2020; Heuskin et al., 2011; Rumbos et al., 2019). Por otro lado, las señales químicas que liberan insectos de una especie para comunicarse con otros de la misma especie (feromonas) se pueden usar para manipular su comportamiento conductual. Por ello, también son particularmente efectivos en el control de plagas por ser respetuosas con el medio ambiente y altamente específicas según la composición feromonal, al ser utilizadas como herramientas químicas en la manufactura de biotrapas (Adamski et al., 2019; Hassan & Shakir, 2008; Müller & Buchbauer, 2011; Yew & Chung, 2015).

En resumen, a pesar de que el uso de insecticidas es usualmente más económico que el uso de feromonas para el control de plagas, las ventajas del potencial uso de biotrapas en la industria pecuaria incluyen ser ecológicas y mejorar la seguridad alimentaria. De acuerdo a la literatura, algunos ejemplos de aleloquímicos usados en control de plaga de insectos son las alomonas (por su acción repelente de la plaga) y cairomonas (por su acción atrayente de la plaga), mientras que las feromonas usadas para monitoreo y control biológico de coleópteros son feromonas de alarma (por su efecto repelente), de agregación (por su efecto de atracción) y sexuales (por su efecto en disminuir la reproducción) (Acevedo, 2020; Heuskin et al., 2011; Romero-López et al., 2005; Yew & Chung, 2015). Sin embargo, el factor limitante principal para el uso de feromonas es la disponibilidad de esta y la factibilidad de su uso; por ello la elección feromonal en la manufactura de las biotrapas dependerá de la estrategia de control a realizar.

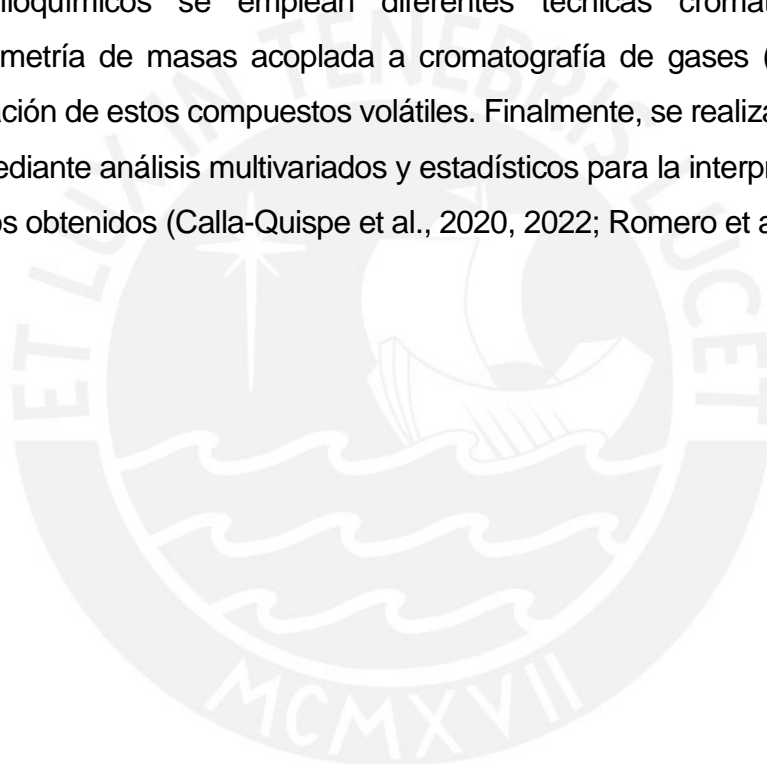
Con respecto al control de *A. diaperinus* mediante el uso de sus semioquímicos se ha estudiado su composición química (ver Tabla 1), reportando un diferente perfil químico (composición química) dependiendo de la distribución geográfica de la plaga (Bartelt et al., 2009; Cossé & Zilkowski, 2015; Falomo, 1986; Hassemer et al., 2015, 2016, 2019, 2020; Singh & Johnson, 2012). Para mayor detalle de las biotrampas investigadas para el control de *A. diaperinus* revisar el Capítulo 2.

Tabla 1. Composición química reportada en adultos de *Alphitobius diaperinus*, según su sexo y origen

Adultos	Origen	Compuestos químicos	Tipo de muestreo	Referencia
Machos	US	(<i>E</i>)- β -ocimeno, (<i>R</i>)-(+)-dauceno, 2-nonanona, (<i>S</i>)-(+)-linalol y (<i>R</i>)-(+)-limoneno. De estos compuestos, los tres primeros actúan como señales atrayentes (Feromonas de agregación)	Volátil	Bartelt et al. (2009), Cossé & Zilkowski (2015), Singh & Johnson (2012)
Hembras	US	(<i>S</i>)-(-)-limoneno y 2-nonanona	Volátil	Bartelt et al. (2009)
Machos	Brasil	(<i>R</i>)-limoneno, 2-nonanona, (<i>E</i>)-ocimeno, (<i>S</i>)-linalol, (<i>R</i>)-dauceno y (<i>E,E</i>)- α -farneseno. Todos estos compuestos actúan como señales atrayentes (Feromonas de agregación)	Volátil	Hassemer et al. (2016)
Hembras y machos	US	3 benzoquinonas (2-metil-1,4-benzoquinona, 2-etil-1,4-benzoquinona y derivado de 1,4-benzoquinona) y 3 hidrocarburos insaturados	Glándulas abdominales	Tseng et al. (1971)
Hembras y machos	US	3 benzoquinonas (1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona) y 3 hidrocarburos insaturados	Glándulas odoríferas	Falomo (1986)
Hembras y machos	Brasil	23 señales entre alquenos, monoterpenos, sesquiterpenos, aldehídos, cetonas y benzoquinonas. De estos, los compuestos: 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona actúan como señales de defensa (Feromonas de alarma)	Glándulas abdominales	Hassemer et al. (2015)
Hembras y machos	US	37 señales entre alquenos, alcanos y metilalcanos (C25-C40)	Cutícula	Lockey (1979)

1.5. Identificación de semioquímicos

La identificación de semioquímicos para el control de plagas requiere de técnicas analíticas muy sensibles para su detección e identificación. Para ello, primero se realizan una serie de ensayos biológicos (olfatométricos) para evaluar el comportamiento conductual del insecto hacia el aislamiento de sus compuestos químicos. Asimismo, mediante la técnica de electroantenografía (EAG) permitirá detectar si los compuestos aislados provocan una respuesta en la antena del insecto y con ensayos biológicos adicionales se podrá determinar la función biológica del semioquímico (Brezolin et al., 2018). Posteriormente, para identificar los semioquímicos se emplean diferentes técnicas cromatográficas como espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) para la identificación de estos compuestos volátiles. Finalmente, se realizan tratamiento de datos mediante análisis multivariados y estadísticos para la interpretación de datos biológicos obtenidos (Calla-Quispe et al., 2020, 2022; Romero et al., 2021).



2. Formulación del problema de investigación

La producción avícola en el Perú y en el mundo es una de las actividades pecuarias caracterizadas por un constante crecimiento (Inonán Oyola & León Hinojosa, 2021). Adicionalmente, la industria avícola se encuentra condicionada en aplicar protocolos de bioseguridad y medidas de salud e higiene como parte de sus buenas prácticas de manufactura. Sin embargo, a nivel mundial, la plaga por escarabajos de *A. diaperinus* es la más común en la industria avícola. Mas aún, esta plaga genera cuantiosas, pérdidas económicas y daños sanitarios (Domínguez, 2012; Santo I Monteys, 2011; Wolf et al., 2015). Lamentablemente, no existe un método de control que sea ecológico y altamente eficiente contra esta plaga. Los métodos actualmente utilizados son la aplicación conjunta de métodos físicos (limpieza de las camas de galpones) y métodos químicos con el uso de insecticidas. Sin embargo, la aplicación de estos químicos tóxicos causa graves daños de intoxicación de las aves y sus productos derivados, contaminación de los aviarios y una resistencia de esta plaga ante esos químicos por la aplicación rutinaria que se realiza.

Por ello, surge la necesidad de generar nuevas tecnologías que permitan realizar un control de plagas más eficientes, llevando a la reducción de estos organismos. Por ejemplo, la manufactura avanzada de biotrapas para la captura de *A. diaperinus* tendría un mayor impacto que los insecticidas debido al manejo sencillo, la rapidez del tratamiento y su inocuidad con el medio ambiente. Las biotrapas permitirían la captura de los insectos en sus formas móviles (adultos y larvas) por su acción atrayente, sin riesgo de generar resistencia en la población de los escarabajos. El presente trabajo pretende fabricar biotrapas avanzadas para neutralizar selectivamente *A. diaperinus*, la plaga de las granjas avícolas.

2.1. Hipótesis

¿Cómo se puede aprovechar las señales químicas de adultos de *Alphitobius diaperinus* para diseñar y desarrollar biotrapas avanzadas que permitan incrementar su captura para el control potencial de dicha plaga en la industria avícola?

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Diseñar y desarrollar biotrampas avanzadas empleando señales químicas para la captura de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

2.2.2. Objetivos específicos

- i. Identificar compuestos químicos que funcionen como atrayentes de *A. diaperinus* y evaluar mediante ensayos olfatométricos y electrofisiológicos su potencial uso como herramientas para la manufactura de biotrampas.
- ii. Diseñar trampas avanzadas empleando señales químicas de *A. diaperinus*.
- iii. Implementar biotrampas avanzadas usando como herramientas químicas atrayentes las señales químicas producidas por adultos de *A. diaperinus*.
- iv. Validar las biotrampas en laboratorio.

2.3. Estructura de capítulos

Para un adecuado análisis del objeto de estudio, el trabajo de investigación se estructuró en tres capítulos. El primer capítulo está relacionado con identificar las herramientas químicas para la manufactura de la biotrampa, el segundo con el diseño de biotrampas avanzadas y el tercero con su manufactura y validación en laboratorio. A continuación, se detalla el contenido de cada uno de estos capítulos en mención:

Capítulo 1. Identificación y estudio de las señales olfativas asociadas al sexo y experiencia sexual que afectan el apareamiento y la atracción en *Alphitobius diaperinus*: Se estudia, en horas de mayor actividad sexual, el efecto de las señales químicas de largo y corto alcance emitidas por ambos sexos y diferentes experiencias sexuales de adultos de *A. diaperinus* sobre el atractivo y comportamiento de apareamiento sobre otros adultos. Asimismo, se evalúa las respuestas electrofisiológicas de las señales químicas detectadas.

Capítulo 2. Diseño de trampas avanzadas: se describe los procesos de manufactura involucrados para el diseño de trampas que permita la captura de la plaga en estudio.

Capítulo 3. Manufactura y validación en laboratorio de biotampas avanzadas para el control de *Alphitobius diaperinus*: Finalmente, se fabrican las biotampas avanzadas usando como herramientas las señales químicas de largo alcance de adultos de *A. diaperinus* y se valida en laboratorio el uso de dichas biotampas para la captura de adultos de *A. diaperinus*.



3. Capítulo 1. Identificación y estudio de las señales olfativas asociadas al sexo y experiencia sexual que afectan el apareamiento y la atracción en *Alphitobius diaperinus*

3.1. Introducción

Los insectos adultos desarrollan una secuencia de comportamientos para alcanzar la reproducción sexual, lo que implica la comunicación y el reconocimiento de la pareja, el cortejo y la cópula (Adamski et al., 2019; Lizée et al., 2017; Nieberding et al., 2008). La comunicación y el reconocimiento se dan a través de estímulos visuales, táctiles, auditivos y olfativos (Ferveur, 2005; Font & Desfilis, 2003; Qadir et al., 2021). Este último se basa en señales químicas y son los más críticos y fundamentales en las interacciones entre los insectos (Fedina & Lewis, 2008; Geiselhardt, Otte, et al., 2009; Heuskin et al., 2014; Lizée et al., 2017). La señalización olfativa en los sistemas de comportamiento sexual involucra señales de largo alcance y de corto alcance (Crook et al., 2004; Fedina & Lewis, 2008; Geiselhardt, Otte, et al., 2009; Peterson et al., 2007). Las señales olfativas de largo alcance son emitidas por una de las parejas sexuales (macho o hembra) para obtener la orientación de una pareja potencial, lo que promueve el atractivo a largas distancias. Esta secuencia es seguida por posturas o comportamientos de llamada (Bell et al., 2007; Fedina & Lewis, 2008; Lizée et al., 2017). Una vez que las parejas sexuales se contactan, las señales olfativas de corto alcance se involucran para influir en la orientación y en la estimulación de la cópula. Estas señales pueden ser percibidas por el contacto (Crook et al., 2004; Fedina & Lewis, 2008; Geiselhardt, Otte, et al., 2009; Peterson et al., 2007) y/o contactando las partes bucales con la secreción glandular tergal (Crook et al., 2004; Fedina & Lewis, 2008; Goodwin & Waltman, 1996; Lizée et al., 2017; Retamales et al., 2011; Sreng, 2006; Wojcik, 2013).

En algunas especies de escarabajos Tenebrionidae, el macho o la hembra inicia la búsqueda de pareja emitiendo el atrayente de largo alcance. Existen varias características específicas como el estatus sexual (por ejemplo, comportamiento adulto divergente por experiencia sexual diferente), dimorfismo sexual (es decir, diferencias adultas debido al sexo), el grado de gregarismo o incluso los hábitos de alimentación que parecen estar involucradas en el desarrollo del apareamiento

(Crippen & Esquivel, 2012; Crook et al., 2004; Dunford & Kaufman, 2006; Giunti et al., 2018; Hassemer et al., 2016; Kamiya et al., 2015; Liu et al., 2010; Peterson et al., 2007; Qadir et al., 2021; Spikes et al., 2010; Wojcik, 2013). En cuanto a adultos de *A. diaperinus*, se han reportado diferencias cuantitativas y cualitativas de los perfiles químicos volátiles, cuticulares y de glándulas según su sexo y distribución geográfica, ver Tabla 1. (Bartelt et al., 2009; Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2016; Lockey, 1979; Soetemans et al., 2020; Tseng et al., 1971; Falomo 1986). Sin embargo, la identificación química de las feromonas por sí sola no garantiza el éxito en el control de las poblaciones de plagas, ya que las respuestas de los insectos dependen en gran medida del contexto. Por ejemplo, la emisión de señales químicas de una especie insectos puede verse influenciado debido a factores ambientales de crecimiento (Menzel et al., 2017; Soetemans et al., 2020), interacción interespecífica (Batalha et al., 2020; Giunti et al., 2018) y el origen de la población (Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2016, 2020; Singh & Johnson, 2012).

Aunque se sabe que las señales químicas atractivas son emitidas por machos vírgenes de *A. diaperinus* (Bartelt et al., 2009; Hassemer et al., 2016), se ha reportado en otras especies de escarabajos que las señales atractivas pueden ser emitidas por ambos sexos (Chen et al., 2014; Fedina & Lewis, 2008; Kamiya et al., 2015; Vanderbilt et al., 1998). Por ello, planteamos la hipótesis de que ambos sexos producen señales químicas atractivas, las cuales pueden o no relacionarse a la experiencia sexual de *A. diaperinus*. Adicionalmente, dado que se conoce el comportamiento homosexual en *A. diaperinus* (Bartelt et al., 2009; Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2015, 2016), se espera que ambos sexos presenten similitud en su perfil químico. Este capítulo tuvo como objetivo comprender si las señales químicas emitidas por los adultos de *A. diaperinus* son atractivas e inducen respuestas de apareamiento. Además, ¿el sexo o el estado de la experiencia sexual afecta la producción química y las respuestas de comportamiento de los adultos de *A. diaperinus*? Para probar la hipótesis, se llevó a cabo experimentos de comportamiento, análisis químicos y electrofisiológicos de señales de largo y corto alcance emitidas por ambos sexos y diferentes experiencias sexuales de *A. diaperinus*.

3.2. Metodología

3.2.1. Colecta y crianza de *A. diaperinus*

Los escarabajos adultos de *A. diaperinus* se obtuvieron de una producción avícola comercial en el Departamento de Lima, Distrito de Villa María del Triunfo, camino hacia el Parque Industrial Quebrada Retamal (coordinada geográfica es 12° 09' 27.8" S 76° 53' 46.2" W), a una altitud entre 200–300 msnm, en 2019. Los cuatro estadios (huevo, larva, pupa y adulto) de *A. diaperinus* se criaron en el laboratorio en cajas de vidrio (30 x 25 x 20 cm), las cuales se mantuvieron en una cámara de clima controlado (Memmert HPP750, Memmert GmbH, Schwabach, Alemania) a una temperatura constante de 30 °C, humedad relativa (HR) del 50 % y con un fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad) (fotofase 07:00 a 19:00 h y escotofase 19:00 a 07:00 h; GMT-5). En una de las cajas de vidrio, cientos de machos y hembras adultos colectados se mantuvieron y se dejaron reproducir libremente, mientras que las nuevas larvas emergentes se transfirieron a placas de Petri (60 × 15 mm), que se mantuvieron en una segunda caja de vidrio. Esta segunda caja fue monitoreada dos veces por semana para alimentarlos y buscar pupas. Luego se identificó el sexo de cada pupa (como hembras "F" y machos "M" siguiendo Esquivel et al., 2012) y se aisló en una placa de Petri para evitar cualquier posible evento de apareamiento. En caso de que el reconocimiento del sexo no pudiera llevarse a cabo en la etapa de pupa (por ejemplo, los primeros adultos recolectados), el reconocimiento del sexo se llevó a cabo presionando su abdomen ventral prolongado para ver los genitales bajo un microscopio estereoscópico. Las larvas y adultos de *A. diaperinus* se alimentaron con harina de trigo comercial "Blanca flor" (Alicorp, Lima, Perú) y se les proveyó de agua mediante un papel toalla húmedo. Los adultos aislados sin experiencia sexual se denominaron 'vírgenes' (v), mientras que los adultos criados en grupos de machos y hembras combinados se consideraron sexualmente experimentados (exp). Un adulto se consideró sexualmente maduro a partir de los 21 días de adultez. Todos los ensayos descritos a continuación se realizaron durante las horas de actividad de apareamiento.

3.2.2. Olfatometría

i. Atracción de las señales químicas según su sexo y experiencia sexual

Se usó un olfatómetro de tubo en Y (tubo de vidrio de 8 mm de diámetro, 10 cm de longitud del tronco seguido de dos brazos de 5 cm de longitud) para probar el poder atractivo de las señales químicas emitidas por machos y hembras vírgenes o experimentados. Cada brazo de tubo en Y se conectó a un tubo de vidrio (1 cm de diámetro y 15 cm de longitud). Uno de los tubos de vidrio contenía uno de los siguientes tratamientos: (i) 20 hembras experimentadas ('Fexp'), (ii) 20 hembras vírgenes ('Fv'), (iii) 20 machos experimentados ('Mexp'), o (iv) 20 machos vírgenes ('Mv'); mientras que el otro tubo quedó vacío para ser utilizado como control. Se colocó un individuo perteneciente a una de las cuatro categorías (Fv, Fexp, Mv, Mexp) dentro del tronco del olfatómetro. Luego se activó la bomba eléctrica para impulsar el flujo de aire dentro del olfatómetro a una velocidad constante de 0,3 L/min a través de filtros de carbón activado (malla 20–40, Sigma-Aldrich). La respuesta se registró por un tiempo de 5 minutos y se consideró finalizada cuando el escarabajo ingresó totalmente al brazo de tratamiento o control. Se realizaron al menos 30 repeticiones por cada tratamiento (553 análisis en total, de los cuales en 90 ensayos los insectos no respondieron, por ello esos resultados no se contabilizaron). Sin embargo, debido a limitaciones en el número de individuos Mv, el tratamiento de comparación de Mv y control no se realizó con todas las combinaciones de escarabajos. Después de cada prueba, se giró 180° todo el olfatómetro para evitar efectos de iluminación y posición. Todos los escarabajos probados se usaron solo una vez, mientras que los escarabajos dentro de las cámaras se les permitió aclimatarse durante 1 h, activando la bomba eléctrica para impulsar el flujo de aire dentro de las cámaras a una velocidad constante de 0,3 L/min. Ello se realizó antes de las pruebas para evitar la acumulación de posibles compuestos poco atractivos (por ejemplo, feromonas de disuasión o alarma). Las respuestas atractivas de los adultos de *A. diaperinus* frente a los tratamientos se analizaron mediante prueba binomial (50 % de probabilidad de seleccionar cada brazo), realizadas

con la función `binom.test` del paquete *stats* del software R, versión 3.6.1 (R Core Team, 2017).

ii. Efecto del sexo y experiencia sexual en el comportamiento de apareamiento y su descripción

Se evaluó el comportamiento de apareamiento en tratamientos basados en todas las combinaciones posibles de sexo y experiencia sexual [Fv–Mv (n=15), Fv–Mexp (n=20), Fexp–Mv (n=15) y Fexp–Mexp (n=15)]. Para ello, se colocó un macho y una hembra en una placa de Petri (60 × 15 mm), el cual contenía un papel de filtro en el fondo, y se observó su comportamiento durante un total de 10 min. Luego se cronometraron las diferentes respuestas conductuales: (a) contacto, es decir, interacción que involucra contacto mediante el uso de sus antenas o su patas protorácicas, antes o después de la cópula, (b) monta, cuando el macho está sobre la hembra y expone sus genitales y (c) cópula, cuando el macho inserta su genital en el órgano sexual femenino. Asimismo, se registró (a) el número de intentos de apareamiento exitosos, es decir, cuando se produce la cópula y (b) fallidos, en una cópula fallida. Las diferencias en el tiempo total de cada respuesta de comportamiento (es decir, tiempo de contacto, monta y cópula) y el efecto de la experiencia sexual se analizaron mediante la realización de un modelo lineal. El tiempo registrado por respuesta conductual se transformó en raíz cuarta antes de los análisis, y la experiencia sexual tanto de macho como hembras se estableció como variables predictivas. Para identificar posibles efectos combinados, también se llevaron a cabo pruebas post-hoc Bonferroni. Todos los análisis se realizaron en R, utilizando las funciones `lm` y `emmeans` de los paquetes *stats* (R Core Team, 2017) y *emmeans* (Lenth et al., 2019).

iii. Evaluación del rol de señales químicas de largo y corto alcance

Se realizaron dos tipos de ensayo para evaluar el comportamiento de apareamiento de machos con hembras muertas basados en todas las combinaciones de sexo y experiencia sexual. Para ello, se compararon las diferentes respuestas conductuales del macho durante un total de 10 min: tiempo de contacto, monta y cópula. Asimismo, se registraron el número de intentos de apareamiento exitosos y fallidos.

En el primer ensayo, se evaluó la aptitud sexual del macho y el rol de las señales químicas de corto alcance emitidas por la hembra, para ello se colocó un macho y una hembra viva en una placa de Petri (60 × 15 mm) y se observó su comportamiento hasta que el macho intentara aparearse, rápidamente se retiró al macho y se colocó en otra placa Petri, previamente acondicionada, a 5 mm de (a) una hembra muerta (misma condición sexual que la hembra viva) por congelación (45 min a -20 °C), o (b) una hembra sacrificada por congelación y lavada con diclorometano por 24 h usando equipo soxhlet. Los tratamientos evaluados fueron Fv^*-Mv , Fv^*-Mexp , $Fexp^*-Mv$, $Fexp^*-Mexp$, $dFexp-Mv$ y $dFexp-Mexp$, donde “*” se denominan a hembras muertas por congelación y “dFexp” hembras experimentadas lavadas. En el segundo ensayo, se evaluó el rol de ambas señales químicas de largo y corto alcance, para ello se colocó una Fexp viva en una placa Petri (60 × 15 mm), la cual estaba cubierta por una fina capa de papel aluminio con pequeños orificios que permitiera pasar las señales químicas de largo alcance y encima de ello se colocó un Mv a 5 mm de una Fexp**, todo ello cubierto con otra placa Petri (60 × 15 mm), ver Figura 4. Los tratamientos evaluados fueron $Fexp^{**}-Mv$ y $dFexp^*-Mv$, donde “Fexp**” se denominan a hembras experimentadas muertas por congelación y “dFexp*” hembras experimentadas lavadas.

En ambos ensayos, al usar parejas muertas, se descartó la posibilidad que el comportamiento conductual de la pareja influya en el comportamiento de apareamiento del macho. Las diferencias en el tiempo total de cada respuesta de comportamiento y el efecto de la experiencia sexual, así como identificar posibles efectos combinados se analizaron igual que el inciso anterior (sec. 3.2.2.ii). Adicionalmente se evaluaron las diferencias de todos los resultados obtenidos en el comportamiento de apareamiento (sec. 3.2.2.ii y 3.2.3.iii) mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, seguidas de comparaciones por pares mediante pruebas de Mann-Whitney-U con corrección de Bonferroni. Estos análisis se realizaron utilizando el paquete *stats* en R (R Core Team, 2017).

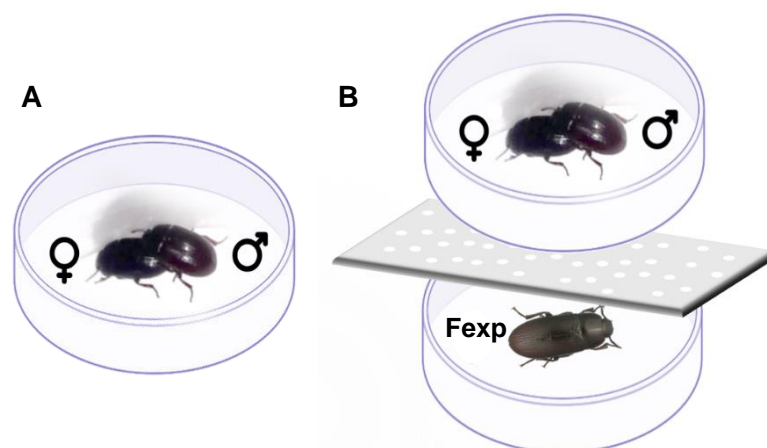


Figura 4. Esquema del ensayo de comportamiento de apareamiento en A) 1 y B) 2 placas Petri. ♀: Fv*, Fexp* o dFexp. ♂: Mv o Mexp.

3.2.3. Extracción e identificación de semioquímicos

i. Señales químicas de largo alcance

Cuarenta adultos de cada sexo fueron acondicionados en cámaras de vidrio (1 cm de diámetro y 15 cm de longitud) con 200 mg de comida y 100 μ L de agua impregnada en papel de filtro (1 \times 1 cm) por 18 h. Seguidamente, cada cámara de vidrio fue ventilada durante 1 h con flujo de aire a una velocidad constante de 0,3 L/min a través de filtros de carbón activado (malla 20–40, Sigma-Aldrich). Las muestras blanco (CBK) se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin adultos en su interior (número de muestras Fexp: n=19, Mexp: n=20, CBK: n=10). Los volátiles fueron colectados usando fibras SPME de DVB/CAR/PDMS (Sigma Aldrich) con espesor de 50/30 μ m durante 1 h. Las muestras se analizaron inmediatamente por GC-MS.

ii. Señales químicas de corto alcance

Se realizaron dos tratamientos para evaluar la composición química de las señales de corto alcance en adultos de *A. diaperinus* según su sexo y experiencia sexual. Para ello, adultos de diferente sexo y experiencia sexual fueron congelados por 45 min a -20 °C, luego descongelados durante 10 min a temperatura ambiente.

El primer tratamiento se realizó para determinar la composición de las señales químicas de corto alcance, para ello cada muestra extraída consistió en doce

individuos del mismo sexo y experiencia sexual (número de muestras Fv: n=4, Fexp: n=14, Mv: n=4, Mexp: n=14). Seguidamente, cada muestra se sumergió en 2 ml de hexano (grado MS, Sigma-Aldrich) y se agitó a 2000 rpm durante 2 min. Luego, el extracto se transfirió a otro vial y se agregó 1 μ L de 1000 ppm de hexadecano (C16) como estándar interno. Posteriormente, los extractos se concentraron a 120 μ L usando una corriente suave de nitrógeno y luego se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis químico. El segundo tratamiento se desarrolló para confirmar la composición química y determinar posteriormente aquellos compuestos electrofisiológicamente activos, para ello cada muestra extraída consistió en al menos veinte individuos del mismo sexo y experiencia sexual (Fv, Fexp y Mv). A continuación, cada muestra se extrajo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis químico y electrofisiológico.

iii. Identificación de compuestos químicos

Las señales químicas de largo y corto alcance se analizaron por cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrómetro de masas APPI-Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). Las condiciones instrumentales con las cuales se trabajaron se describen en la Tabla 2. Los datos obtenidos en el espectrómetro de masas (MS) de alta precisión se adquirieron en adquisición dependiente de datos (DDA), en modo positivo con un rango de escaneo de 50–750 m/z . Adicionalmente, las señales químicas de corto alcance se analizaron mediante GC-MS (MS; Agilent 7250 GC/Q-TOF, Santa Clara/CA, EE. UU.) con fuente de ionización electrónica y química (EI/CI). Las condiciones instrumentales se describen en la Tabla 2. El EI se fijó a 70 eV con un rango de escaneo de 50–750 m/z .

La minería de datos se realizó utilizando MS-DIAL v4.6. Para ello, los datos sin procesar, formato raw, se convirtieron al formato .abf para analizarlos por el MS-DIAL, el cual alineó los cromatogramas y normalizó las muestras en base al TIC (cromatograma de iones totales). Seguidamente, se realizó un filtrado mediante análisis de componentes principales (PCA de datos transformados con log₁₀ y normalizados por tipificación) y ANOVA unidireccional (p -anova < 0,01) mediante MATLAB vR2019b. Este filtrado nos permitió rastrear la calidad de los datos, reducir la dimensionalidad, identificar

posibles valores atípicos e identificar grupos de muestras. Para la filtración final se consideró que el área promedio de la muestra fuera al menos tres veces el área promedio del estándar interno y del blanco. La identificación de los compuestos se logró comparando los espectros de masas (MS^2) y los índices de retención de Kovats (solo para compuestos de corto alcance) con bases de datos como PubChem, Fiehn BinBase, MoNA, Chemspider, Metlin y NIST. Los compuestos de corto alcance se cuantificaron comparando sus áreas máximas con el área (señal) del estándar interno (C16).

Tabla 2. Condiciones instrumentales del GC-MS

Señales químicas	largo alcance	corto alcance	corto alcance
GC-MS	Thermo Fisher Scientific		Agilent
Fuente de ionización	APPI		EI/CI
Columna	DB-5 (30 m x 0.25 mm d.i., 0,25 um espesor)		
Temperatura de columna	15 min / 50 °C; 270 °C a 10 °/min 8 min 270 °C	2 min / 50 °C; 250 °C a 10 °/min 20 min 250 °C	2 min / 50 °C; 250 °C a 10 °/min 20 min 250 °C
Temperatura de inyector	250 °C	250 °C	250 °C
Temperatura de detector	270 °C	270 °C	270 °C
Gas portador	He (1,5 mL/min)		
Volumen de inyección	-	1 µL	1 µL
Modo de inyección	splitless		

Para inspeccionar gráficamente las posibles diferencias en los perfiles químicos de machos y hembras con diferentes experiencias sexuales, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) usando las proporciones relativas de los compuestos detectados. El NMDS se basó en la matriz de similitud de Bray-Curtis del conjunto de datos transformado a raíz cuadrada. Asimismo, para identificar diferencias significativas de los perfiles químicos entre los cuatro grupos (según sexo y experiencia sexual), se realizó un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) utilizando la matriz de similitud de Bray-Curtis de las proporciones relativas de los perfiles químicos transformado a raíz cuadrada. Se realizaron un total de 99999 permutaciones y corrección de Holm, considerando “sexo” como factor fijo y “experiencia sexual” como factor anidado dentro de “sexo”. El NMDS y PERMANOVA se realizaron utilizando

el paquete *vegan* (Oksanen et al., 2020), mientras que la corrección de Holm utilizó el paquete *RVAideMemoire* (Hervé, 2021) de R.

iv. Identificación de semioquímicos potenciales mediante electroantenografía

Para determinar los potenciales compuestos químicos con función de semioquímicos atrayentes, se realizaron análisis electrofisiológicos con las antenas de los machos adultos de los extractos hexánicos (sec. 3.2.3. ii.) de cada categoría (número de ensayos Fv: n=13, Fexp: n=7, Mv: n=12) de *A. diaperinus*, mediante GC acoplado a electroantenografía (GC-EAD). El GC HP 6890 (Hewlett Packard Co., Palo Alto, USA) estaba equipado con un detector de ionización de llama (FID) y EAD (IDAC-2, Syntech, Hilversum, Netherlands). Las antenas de machos de *A. diaperinus* fueron extirpados con una microtijera (Castroviejo, Fine Science tools; 69,121 Heidelberg, Alemania) con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi 2000-CS, ZEISS, Oberkochen, Alemania). Cada antena extirpada fue cortada en la base del pedicelo, montada entre dos capilares de vidrio llenos de solución Ringer (5 g NaCl, 0,42 g KCl y 0,19 g CaCl₂·2H₂O en 1000 mL agua desmineralizada) y conectada a electrodos de oro. Para registrar simultáneamente las respuestas de FID y EAD, el efluente de GC se dividió (FID: EAD = 1: 1) bajo un suministro de gas suplementario (N₂; 30 mL/min). El efluente se humidificó con un flujo de aire limpio de 100 mL/min y se filtró con carbón activado. Esta fracción efluente transportada de la columna hacia el EAD se dirigió a la antena a través de un tubo de vidrio. La inyección (1 µL) del estímulo olfativo a evaluar fue en modo splitless a 50 °C en el GC, equipado con una columna DB5 apolar (30 m × 0.25 mm d.i.) y operando a un flujo constante de gas de 2 mL/min H₂. Las señales químicas fueron denominadas "electrofisiológicamente activos" cuando desencadenaron respuestas en el EAD.

3.3. Resultados

3.3.1. Olfatometría

i. Atracción de las señales químicas según su sexo y experiencia sexual

En general, todos los escarabajos adultos, independientemente de su sexo o experiencia sexual, se sintieron atraídos por la señal olfativa emitida por machos experimentados o vírgenes, ver Figura 5. En efecto, Fv, Fexp, Mv y Mexp se sintieron significativamente más atraídos por las señales olfativas de Mv (Fv: $p=0,02$; Mv: $p=0,0003$) y Mexp (Fv: $p=0,00003$; Fexp: $p=0,00002$; Mexp: $p=0,00002$) sobre el control. De manera similar, todos se sintieron más atraídos, aunque apenas significativo ($p<0,1$) para Fv ($p=0,07$) y Mv ($p=0,09$), por los olores de Fv en comparación con el control (Fexp: $p<0,00001$; Mexp: $p=0,006$). Curiosamente, aunque los machos se sintieron más atraídos por la señal olfativa de Fexp en comparación con el control (Mv: $p=0,0006$; Mexp: $p=0,08$), las hembras, independientemente de su experiencia sexual, se sintieron igualmente atraídas tanto por las señales olfativas de Fexp y el control ($p<0,1$). Por otro lado, Fv no mostró ninguna preferencia cuando se probó los olores de Fexp contra el control (Fexp: $p=0,36$; Fv: $p=0,85$).

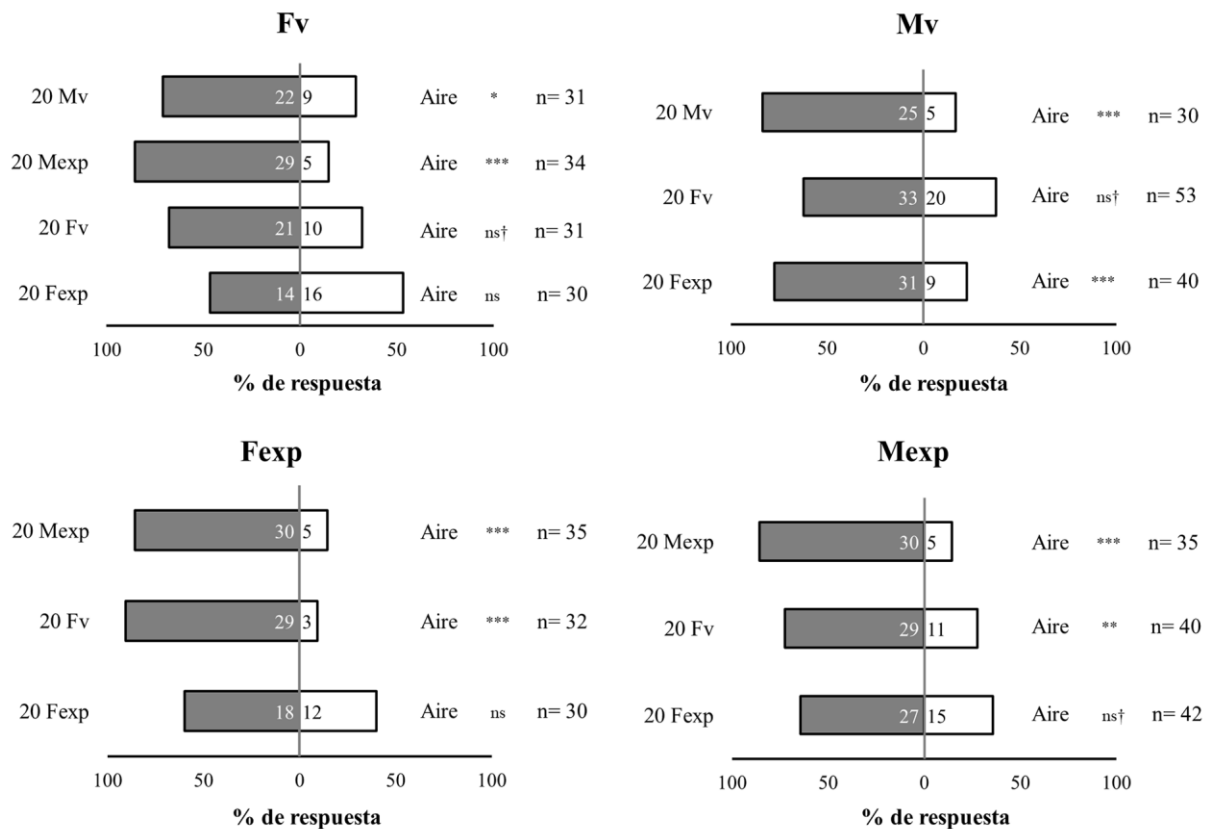


Figura 5. Atracción de los adultos de *Alphitobius diaperinus* hacia señales olfativas emitidas por otros adultos, clasificados según su sexo y experiencia sexual. Se muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), poco significativas († $p < 0,1$) y no significativas (ns $p \geq 0,1$) según la prueba binomial exacta. Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes.

ii. Efecto del sexo y experiencia sexual en el comportamiento de apareamiento y su descripción

La secuencia del comportamiento de apareamiento en *A. diaperinus* exhibió tres fases distintas, ver Figura 6. La fase pre-copulatoria (localización del insecto) comenzó cuando ambos adultos se acercaron entre ellos. Después de acercarse, se tocaban las cutículas con las antenas o patas protorácicas desde la derecha, izquierda o posterior. Cuando el macho reconoce a la hembra, intenta montarla por la espalda, doblando su abdomen y dejando al descubierto su órgano genital. Las hembras también contribuyeron a tener un intento exitoso de apareamiento colocándose debajo del macho y exponiendo

sus genitales al exponer el último esternito. En la fase copulatoria, durante la monta, el macho tocaba la cutícula de la hembra con su pata protorácica y mesotorácica, tocando su protórax con la antena y palpo maxilar. La cópula registrada duró entre 4–16 segundos cuando el Mv se estaba apareando, mientras que para el Mexp duró entre 3–5 segundos. En la fase post-copulatoria, ambos adultos siguieron en contacto. Adicionalmente, cuando un macho no tuvo un apareamiento exitoso debido a su menor tamaño en comparación con la hembra, ambos insectos intentaron aparearse nuevamente.

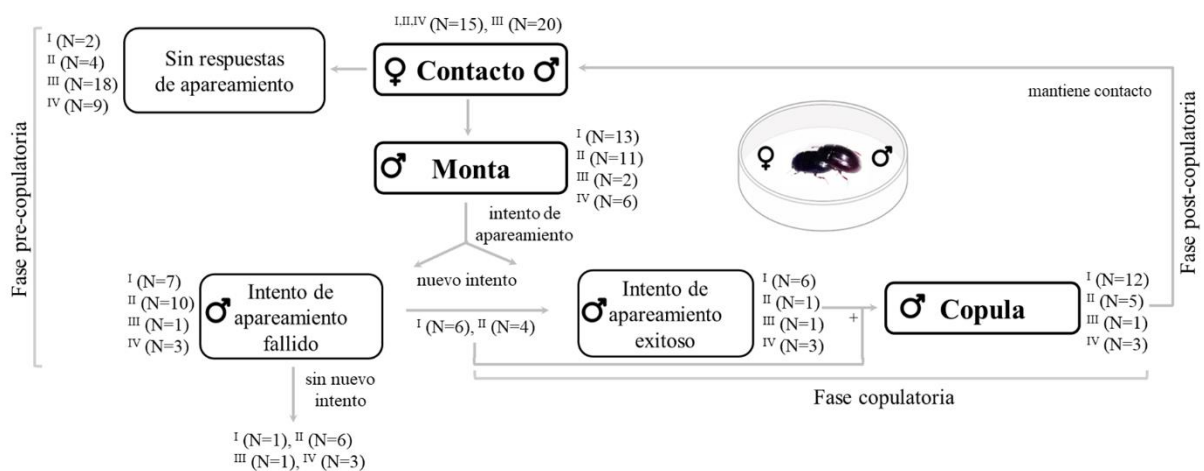


Figura 6. Secuencia de apareamiento de machos de *Alphitobius diaperinus* con hembras en base a la experiencia sexual. N = número de parejas ensayadas. ^I Fv–Mv, ^{II} Fexp–Mv, ^{III} Fv–Mexp, ^{IV} Fexp–Mexp. Cada número en el gráfico indica el número de parejas que exhiben el comportamiento del total de observaciones. Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes.

En las respuestas de tiempo de contacto no encontramos diferencias entre cualquier tipo de combinación de machos y hembras (estado de experiencia sexual en machos: $F_{1,61}=0,11$; hembras: $F_{1,61}=0,0001$ y combinación del estado de experiencia sexual en machos y hembras: $F_{1,61}=0,44$; para todos $p>0,05$; Figura 7). Por el contrario, encontramos efectos significativos tanto en el tiempo de monta y cópula del estado de la experiencia sexual en machos (monta: $F_{1,61}=34,39$; cópula: $F_{1,61}=25,09$, para ambos $p<0,0001$, Figura 7) y la combinación del estado de experiencia sexual en machos y hembras (monta:

$F_{1,61}=4,44$; copula: $F_{1,61}=9,19$; para ambos $p<0,05$, Figura 7). Efectivamente, Mv montó y copuló mucho más tiempo con hembras en comparación con Mexp, ver Figura 7. Además, en las comparaciones por pares, el tiempo de monta que involucró tanto Fv–Mv duró más ($34,5 \pm 45,9$ s) que cualquier otra combinación (Fv-Mv vs Fv-Mexp: $p<0,0001$; Fv-Mv vs Fexp-Mexp: $p=0,009$), excepto cuando se comparó con Fexp–Mv ($25,7 \pm 26,3$ s; $p=0,83$; Figura 7). Sin embargo, Fv–Mv copuló ($5,6 \pm 4,4$ s) más tiempo que cualquier otra combinación, y no hubo diferencia significativa al comparar entre las combinaciones restantes (Fexp-Mv vs Fv-Mexp: $p=0,08$; Fexp-Mv vs Fexp-Mexp: $p=0,58$; Fv-Mexp vs Fexp-Mexp: $p=0,72$; Figura 7).



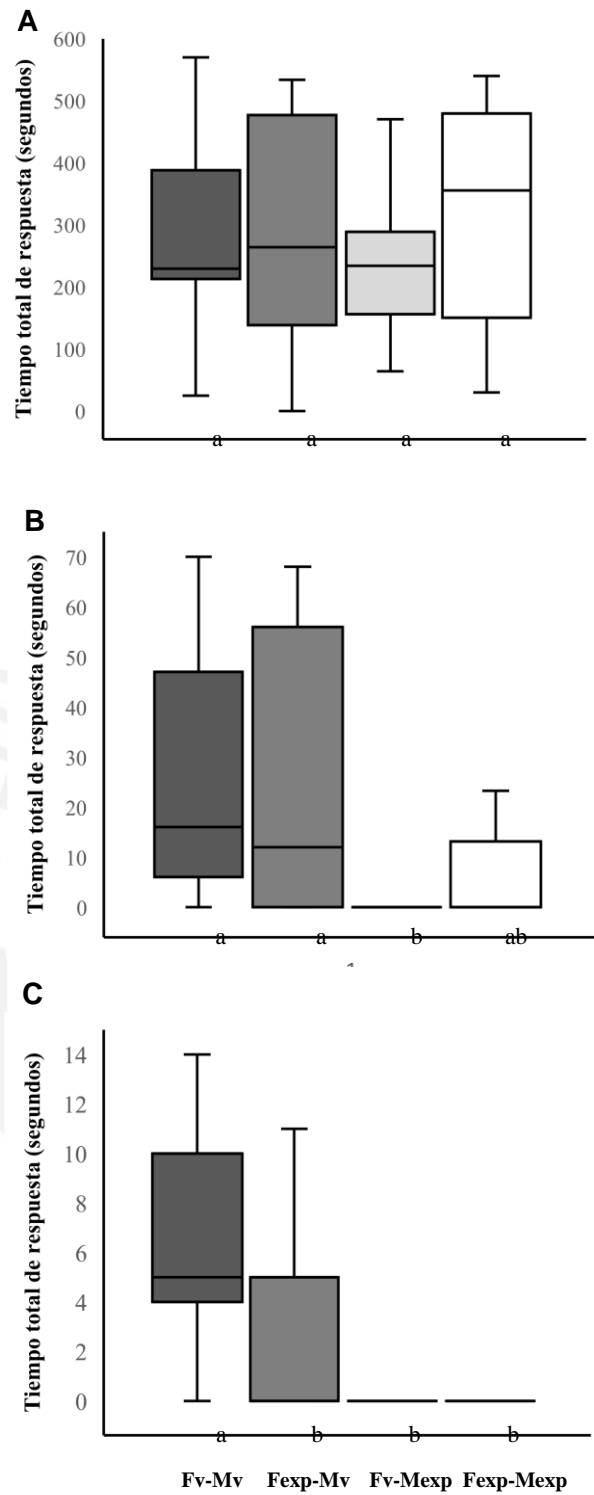


Figura 7. Respuestas conductuales de apareamiento de machos de *Alphitobius diaperinus* con hembras vivas según su sexo y experiencia sexual. Tiempo total de (A) contacto, (B) monta y (C) cópula. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas entre tratamiento ($p < 0,05$). Fexp, hembras

experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados; Mv, machos vírgenes.

iii. Evaluación del rol de señales químicas de largo y corto alcance

Para obtener una respuesta en el comportamiento de apareamiento de los machos se debió juntar previamente con una hembra viva, lo cual indicaba que i) para que se dé la cópula es necesario comportamientos conductuales de ambos o de una de las parejas o ii) además de las señales químicas de corto alcance, son necesarias las de largo alcance.

En el primer ensayo, la secuencia del comportamiento de apareamiento del macho exhibió las tres fases descritas anteriormente (fase pre-copulatoria, copulatoria y post-copulatoria), ver Figura 6. Lo más resaltante en la fase pre-copulatoria es que el macho al localizar a la hembra muerta tocaba la cutícula del tórax, cabeza, élitros, abdomen y región genital, incluso en la mayoría de las veces levantaba sus élitros para lamer los tergitos (dorsal) o volteaba a la hembra para poder contactar sus esternitos (ventral). Asimismo, a diferencia de las respuestas registradas anteriormente, el tiempo de cópula del Mv con la hembra muerta (F^*) duró entre 7–297 segundos, mientras que el Mexp no mostró registro ni de monta ni cópula. Por otro lado, cuando la hembra lavada (dF) se exponía al macho, este exhibía los comportamientos conductuales de contacto ya descritos, para luego alejarse y no volver a localizarla. En la fase post-copulatoria, el Mv volteaba a la hembra para inspeccionar nuevamente la cutícula del abdomen ventral.

Efectivamente, en las respuestas de tiempo de contacto, monta y cópula no se encontró diferencias en la combinación del estado de experiencia sexual en machos y hembras (para todos $F_{2,96} < 0,46$; $p > 0,05$; Tabla 3, Figura 8). Por el contrario, si se encontró efectos significativos en las respuestas de tiempo de contacto ($F_{1,96} = 14,65$; $p < 0,0001$), monta ($F_{1,96} = 19,40$; $p < 0,0001$) y cópula ($F_{1,96} = 9,62$; $p < 0,01$) de la experiencia sexual masculina, ver Figura 8. Asimismo, se encontró diferencias significativas del estado de la hembra muerta (F^* y dF) en las respuestas de tiempo de contacto ($F_{2,96} = 18,62$; $p < 0,0001$) y monta ($F_{2,96} = 3,40$; $p < 0,05$), ver Figura 8. Además, respecto a las combinaciones por pares, el tiempo de contacto de los machos con hembras

muertas (F^{*}) es mayor que con hembras lavadas (dF), a excepción de Fexp–Mexp, ver Figura 8. Por otro lado, el Mv montó y copuló con hembras muertas en comparación con el nulo comportamiento de Mexp (Figura 8). En efecto, en las comparaciones por pares, el Mv montó con Fv^{*} (8,8 ± 14,0 s) y Fexp^{*} (9,4 ± 23,3 s) a diferencia que cualquier otra combinación (p<0,05; Tabla 3, Figura 8). Sin embargo, Fv^{*}–Mv copuló (8,9 ± 15,7 s) más tiempo que cualquier otra combinación (p<0,05), excepto cuando se comparó con Fexp^{*}–Mv (14,7 ± 57,6 s; p>0,05; Tabla 3, Figura 8).

Tabla 3. Comportamiento de apareamiento (en segundos; media ± SD) de adultos de machos de *Alphitobius diaperinus* con hembras muertas según su sexo y experiencia sexual

Tratamiento	N	Contacto*	Monta*	Cópula*
Fv [*] - Mv	26	297,1 ± 137,8	8,8 ± 14,0	8,9 ± 15,7
Fexp [*] - Mv	27	287,1 ± 157,3	9,4 ± 23,3	14,7 ± 57,6
Fv [*] - Mexp	13	191,3 ± 164,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Fexp [*] - Mexp	12	174,4 ± 200,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
dFexp - Mv	12	74,5 ± 96,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
dFexp - Mexp	12	72,2 ± 136,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

*Diferencias significativa entre tratamientos por respuesta conductual (p<0,05).

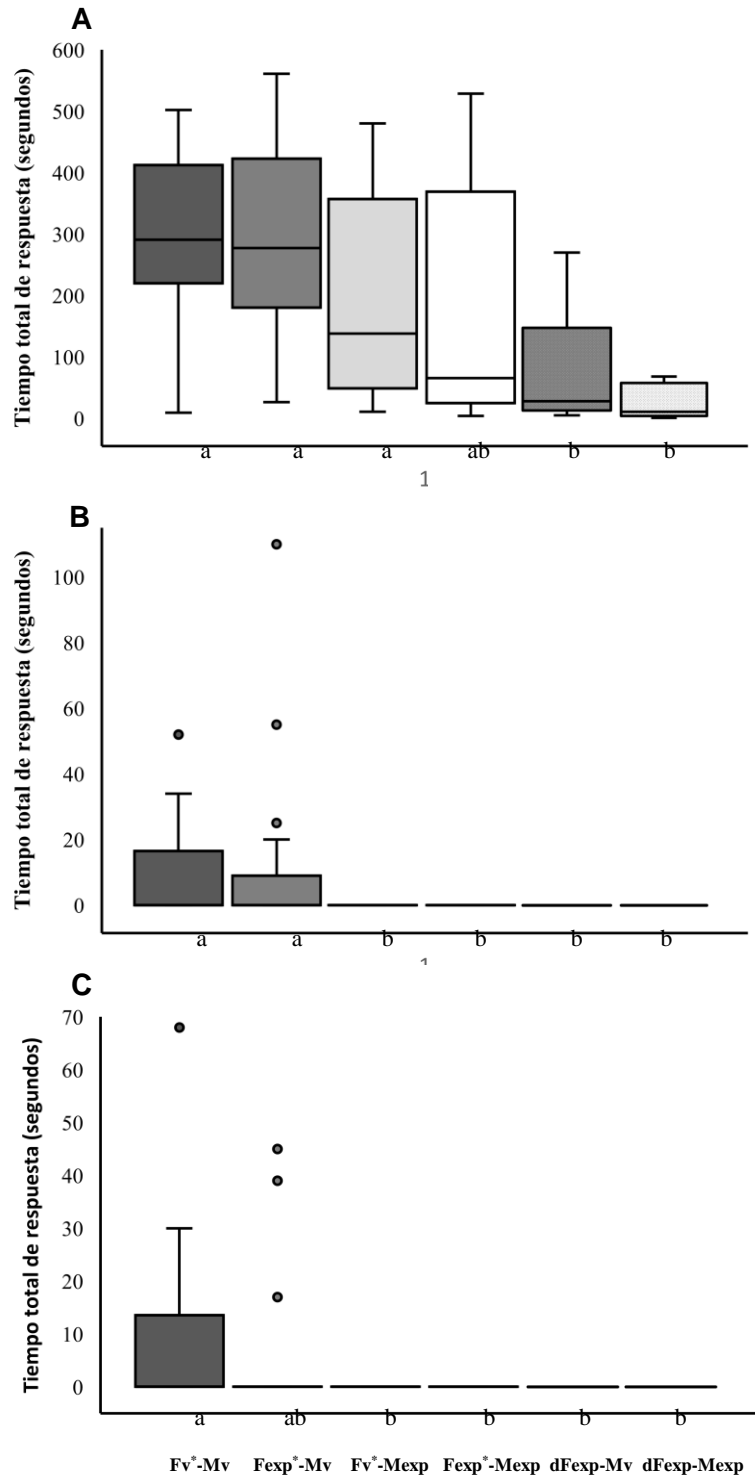


Figura 8. Respuestas conductuales de apareamiento de machos de *Alphitobius diaperinus* con hembras muertas según su sexo y experiencia sexual. Tiempo total de (A) contacto, (B) monta y (C) cópula. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Fexp*, hembras experimentadas muertas por congelación; Fv*, hembras vírgenes muertas por congelación; dFexp, hembras experimentadas lavadas; Mexp, machos experimentados; Mv, machos vírgenes.

En el segundo ensayo, lo más resaltante se evidenció en la fase pre-copulatoria, donde el Mv se movía con las antenas en dirección del movimiento de la Fexp, una vez localizada la Fexp**, el macho exhibía los comportamientos conductuales de contacto ya descritos anteriormente, sin embargo, con dFexp*, una vez contactada el Mv se alejaba rápidamente (Figura 9). En efecto, se encontró diferencias significativas del estado de la hembra muerta (Fexp** y dFexp*) en las respuestas de tiempo de contacto ($F_{1,38}=54,87$; $p<0,0001$) y monta ($F_{1,38}=5,88$; $p<0,05$). Por el contrario, no se encontraron diferencias en el tiempo de cópula ($F_{1,38}=1,52$; $p>0,05$), sin embargo, Fv**–Mv ($3,1 \pm 9,9$ s) copularon al menos en tres ensayos.

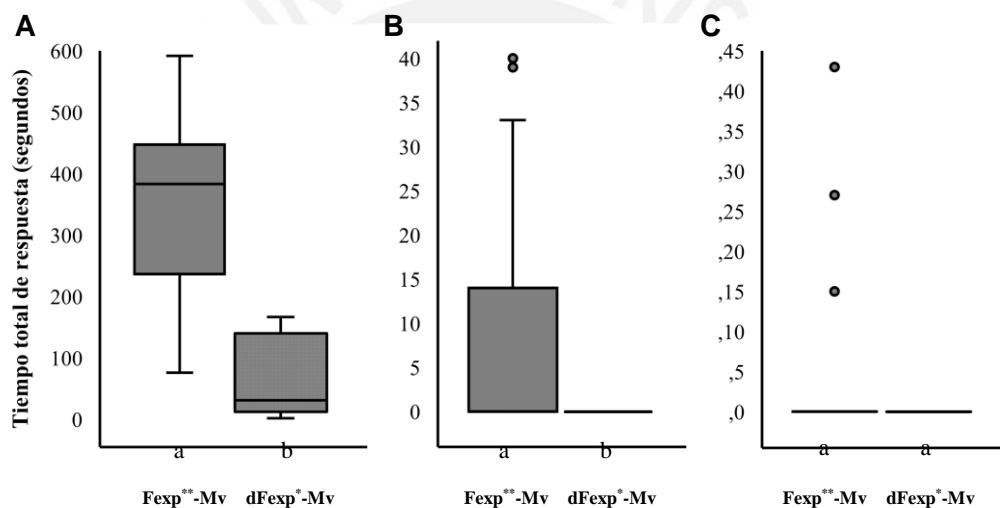


Figura 9. Respuestas conductuales de apareamiento de machos de *Alphitobius diaperinus* con hembras muertas según su sexo y experiencia sexual. Tiempo total de (A) contacto, (B) monta y (C) cópula. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$). Fexp**, hembras experimentadas muertas por congelación; dFexp*, hembras experimentadas lavadas; Mv, machos vírgenes.

En general, al comparar todos los ensayos de comportamiento (sec. 3.2.2.ii y 3.2.2.iii) se encontró diferencia significativa del estado de la hembra en las respuestas de tiempo de contacto ($F_{6,195}=16,55$; $p<0,0001$), monta ($F_{6,195}=10,22$; $p<0,0001$) y cópula ($F_{6,195}=4,71$; $p<0,001$), es decir, el contacto, monta y cópula con una hembra lavada (dF) es menor que con una hembra

viva (F) y hembra muerta (F*), ver Figura 7, 8 y 9. En la combinación por pares, no existe diferencia significativa en el tiempo de contacto entre Fexp**–Mv y cualquier combinación entre machos y F o F* ($p>0,05$). Además, aunque el Mv se aparee con Fv y Fv*, el tiempo de monta es significativamente menor con Fv* ($p<0,01$). Respecto al tiempo de cópula, las respuestas de copula de Mv no se diferencian cuando copular con Fv o Fv* ($p>0,05$), sin embargo, la cópula es mayor que cualquier otra combinación de sexo o experiencia sexual ($p<0,05$), excepto para Fexp–Mv ($p>0,05$).

3.3.2. Análisis químicos

i. Señales químicas de largo alcance según su sexo

Un total de 67 compuestos químicos de largo alcance se detectaron en modo positivo mediante GC-MS (APPI) seguido de un tratamiento de datos con PCA y ANOVA unidireccional ($p\text{-anova}<0,01$), ver Figura 10. 39 compuestos se detectaron en ambos sexos, aunque en diferentes concentraciones relativas, mientras que 26 y 2 compuestos se detectaron en Fexp y Mexp, respectivamente (Tabla 4).

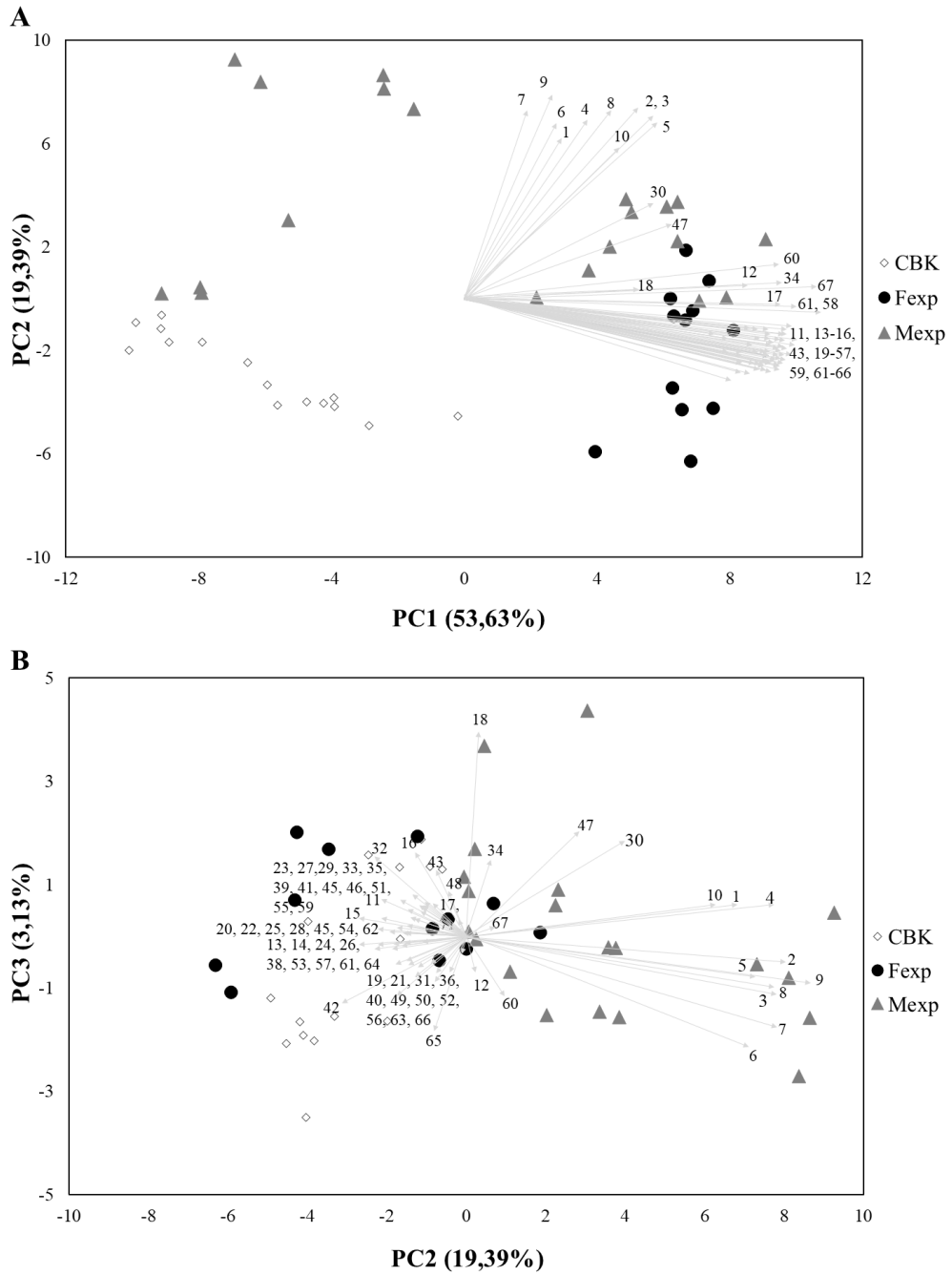


Figura 10. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz filtrada de señales químicas de largo alcance de adultos de *Alphitobius diaperinus* muestra las puntuaciones de PCA y el gráfico de cargas. (A) PC1 vs. PC2, (B) PC2 vs. PC3. Los números en la gráfica (picos) representan los compuestos descritos en la Tabla 4. CBK, blanco; Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

Tabla 4. Cantidad media (10^4 abundancia \pm SD) de señales químicas de largo alcance detectadas en adultos de *Alphitobius diaperinus* (F_{exp} n=12; M_{exp} n=20)

Pico	Tiempo de retención tr (min)	Masa medida (m/z)	F_{exp}	M_{exp}
1	2.61	145.06544	16.92 \pm 16.04	69.7 \pm 75.5
2	2.61	141.08759	12.4 \pm 12.51	176.77 \pm 233.33
3	2.66	159.09802	4.48 \pm 4.53	69.09 \pm 94.06
4	2.61	89.05815	15.34 \pm 14.99	119.74 \pm 139.24
5	2.60	97.06298	8.61 \pm 8.53	109.51 \pm 142.72
6	2.73	113.09362	ND	5.2 \pm 7.37
7	2.65	73.06361	ND	8.06 \pm 11.11
8	2.65	115.07299	0.7 \pm 0.8	13.52 \pm 18
9	2.61	123.07789	0.32 \pm 0.42	9.75 \pm 12.91
10	21.06	136.04967	3.87 \pm 6.71	8.56 \pm 11.65
11	22.28	132.09117	2.61 \pm 0.87	ND
12	22.51	145.10156	2.07 \pm 0.8	ND
13	22.84	133.10179	2.84 \pm 1.04	1.22 \pm 1.6
14	23.32	162.14070	2.92 \pm 0.86	1.21 \pm 1.39
15	23.32	133.10161	2.43 \pm 0.67	ND
16	23.54	119.08585	2.57 \pm 0.67	ND
17	23.58	162.14110	3.13 \pm 0.86	1.36 \pm 1.28
18	23.78	159.08063	2.28 \pm 2.12	2.37 \pm 2.57
19	23.88	148.12494	3.66 \pm 1.66	ND
20	24.01	151.14885	2.25 \pm 0.65	ND
21	24.02	133.10167	2.54 \pm 0.71	ND
22	24.23	162.14111	1.45 \pm 0.86	ND
23	24.33	147.11766	1.37 \pm 0.57	0.58 \pm 0.75
24	24.44	141.06998	3.16 \pm 1.51	1.39 \pm 1.55
25	24.47	133.10155	2.18 \pm 0.93	ND
26	24.54	174.14098	3.45 \pm 0.98	ND
27	24.71	147.11761	2.36 \pm 0.67	1.03 \pm 1.02
28	24.79	147.11737	2.03 \pm 0.66	0.87 \pm 0.94
29	24.88	173.13322	1.8 \pm 1.08	0.63 \pm 0.8
30	24.88	124.05225	1.85 \pm 3.18	1.89 \pm 3.67
31	24.89	133.10155	2.2 \pm 0.87	ND
32	24.91	147.11771	2.33 \pm 0.69	ND
33	24.91	174.14101	2.85 \pm 1.06	1.4 \pm 1.25
34	25.02	129.07037	1.79 \pm 1.02	0.73 \pm 0.71
35	25.12	176.15627	3.6 \pm 0.61	ND
36	25.41	129.07037	2.36 \pm 0.95	ND
37	25.45	143.08586	2.26 \pm 0.41	1 \pm 0.95
38	25.54	115.05514	2.69 \pm 0.65	ND
39	25.56	135.08078	2.16 \pm 2.01	0.52 \pm 0.93
40	25.62	190.17229	2.93 \pm 0.68	1.3 \pm 1.28
41	25.66	157.10168	1.54 \pm 0.65	0.61 \pm 0.74
42	25.76	115.05486	3.93 \pm 1.03	ND
43	25.80	147.11719	3.39 \pm 0.59	ND
44	25.81	178.17224	2.38 \pm 0.68	1.05 \pm 1.02
45	25.90	141.07056	2.5 \pm 0.79	1.03 \pm 1.04
46	25.93	129.07053	2.6 \pm 0.72	0.95 \pm 0.91
47	25.97	138.06789	3.1 \pm 5.7	2.51 \pm 5.34
48	26.08	147.11697	2.66 \pm 0.79	1.13 \pm 1.02
49	26.10	133.10156	2.62 \pm 0.64	ND
50	26.43	186.14093	2.13 \pm 0.71	ND
51	26.44	182.10942	2.62 \pm 0.57	1.13 \pm 1.03
52	26.66	129.07045	3.21 \pm 0.76	ND
53	26.76	154.07814	2 \pm 0.58	0.83 \pm 0.8
54	26.78	157.10207	2.64 \pm 0.82	ND
55	26.79	190.17197	2.18 \pm 0.71	0.81 \pm 0.85
56	26.92	205.15950	5.36 \pm 2.91	ND
57	26.95	143.08611	2.69 \pm 0.66	ND
58	27.01	155.08600	2.8 \pm 0.58	0.86 \pm 1
59	27.04	196.12532	2.12 \pm 0.6	0.93 \pm 0.96
60	27.08	185.13292	1.6 \pm 0.68	0.59 \pm 0.56
61	27.16	181.10202	2.61 \pm 0.67	1.22 \pm 1.13
62	27.36	120.09390	2.57 \pm 0.45	1.15 \pm 1.09
63	27.40	144.09398	2.05 \pm 0.6	ND
64	27.65	157.10204	3.64 \pm 0.78	1.61 \pm 1.47
65	28.04	131.08618	3.23 \pm 0.52	ND
66	28.29	129.07059	2.32 \pm 0.44	ND
67	28.40	158.10944	2.12 \pm 0.64	0.98 \pm 0.94

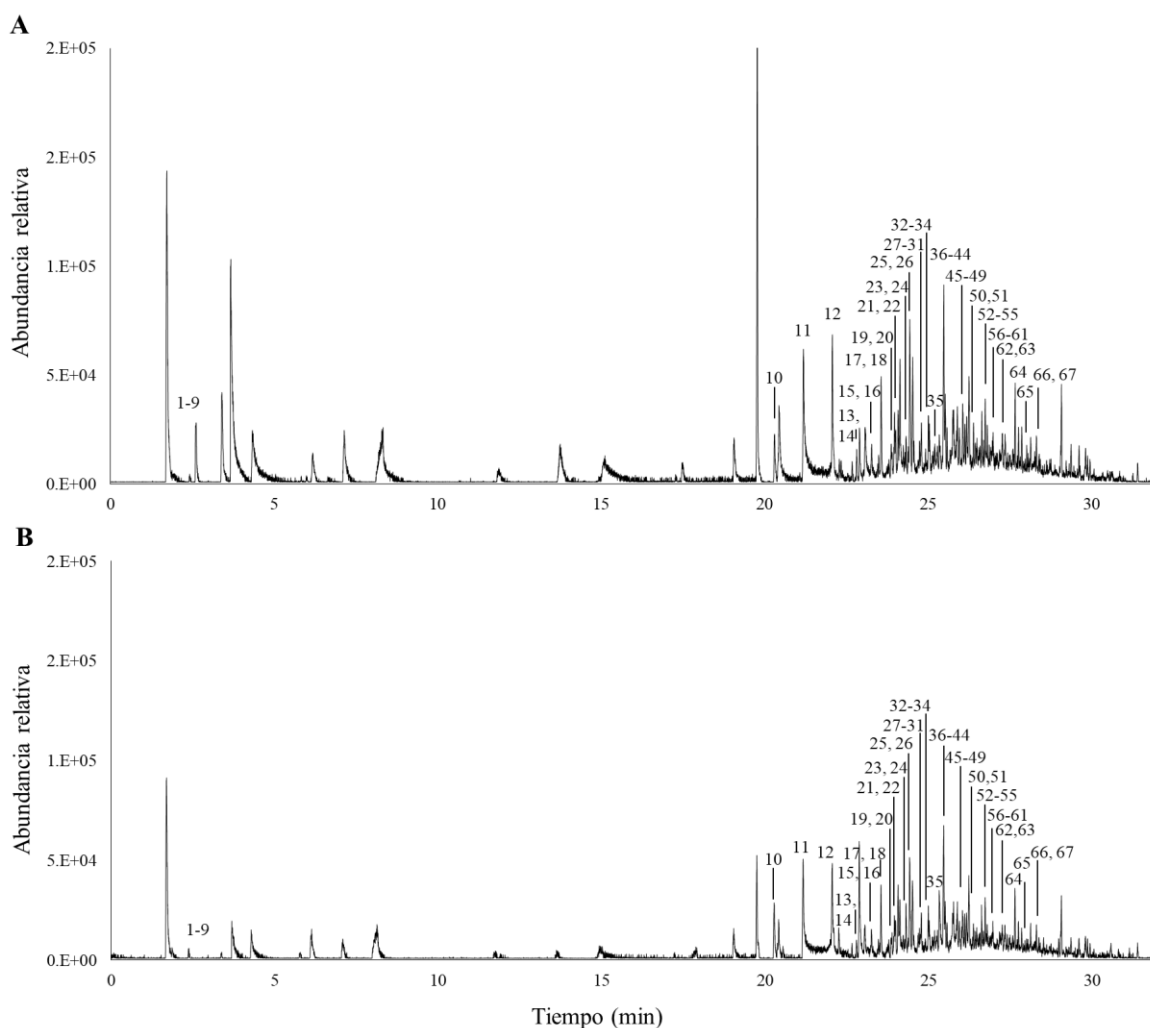


Figura 11. Cromatogramas GC-MS (APPI) de señales químicas de largo alcance en adultos de *Alphitobius diaperinus* según su sexo (A) Fexp (B) Mexp. Los números en la gráfica (picos) representan los compuestos descritos en la Tabla 4. Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

La similitud del perfil químico de largo alcance entre machos y hembras experimentados de *A. diaperinus* se mostró visualmente mediante el análisis NMDS (Figura 12), el cual fue coherente con el PCA graficado (Figura 10). En efecto, el análisis PERMANOVA mostró diferencias significativas en los perfiles químicos de largo alcance según su sexo (es decir, Fexp vs Mexp; Pseudo- $F_{(1,31)} = 10.981$; $p < 0.001$).

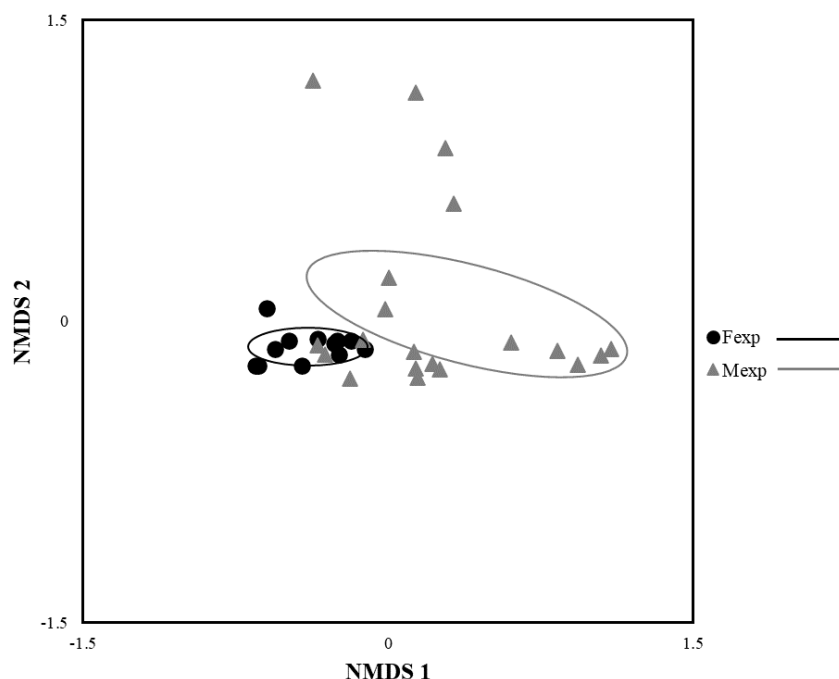


Figura 12. Escalamiento no multidimensional (NMDS) de señales químicas de largo alcance de adultos experimentados de *Alphitobius diaperinus*. Tener en cuenta la superposición de los perfiles químicos en relación con la experiencia sexual. NMDS basado en similitudes de Bray-Curtis (estrés = 0.06509). Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

ii. Señales químicas de corto alcance según su sexo y experiencia sexual

Se detectaron un total de 19 compuestos químicos de corto alcance en modo positivo mediante GC-MS (EI/CI) seguido de un tratamiento de datos con PCA y ANOVA unidireccional ($p\text{-anova} < 0,01$), ver Figura 13. Catorce compuestos químicos fueron identificados pertenecientes a los alcanos, quinonas, benzotiazoles, benzofenonas, ácidos grasos, ésteres y terpenos (Tabla 5). Los 19 compuestos se detectaron en ambos sexos, aunque en diferentes concentraciones relativas, mientras que solo 14 se detectaron en adultos vírgenes (Tabla 5). En efecto, el limoneno, ácido oleico, ácido linoleico y nonacosano solo se detectaron en adultos experimentados. Asimismo, 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona se detectaron como componentes mayoritarios en el perfil químico de adultos de *A. diaperinus*, aunque significativamente mayor en adultos experimentados (Tabla 5, Figura 14).

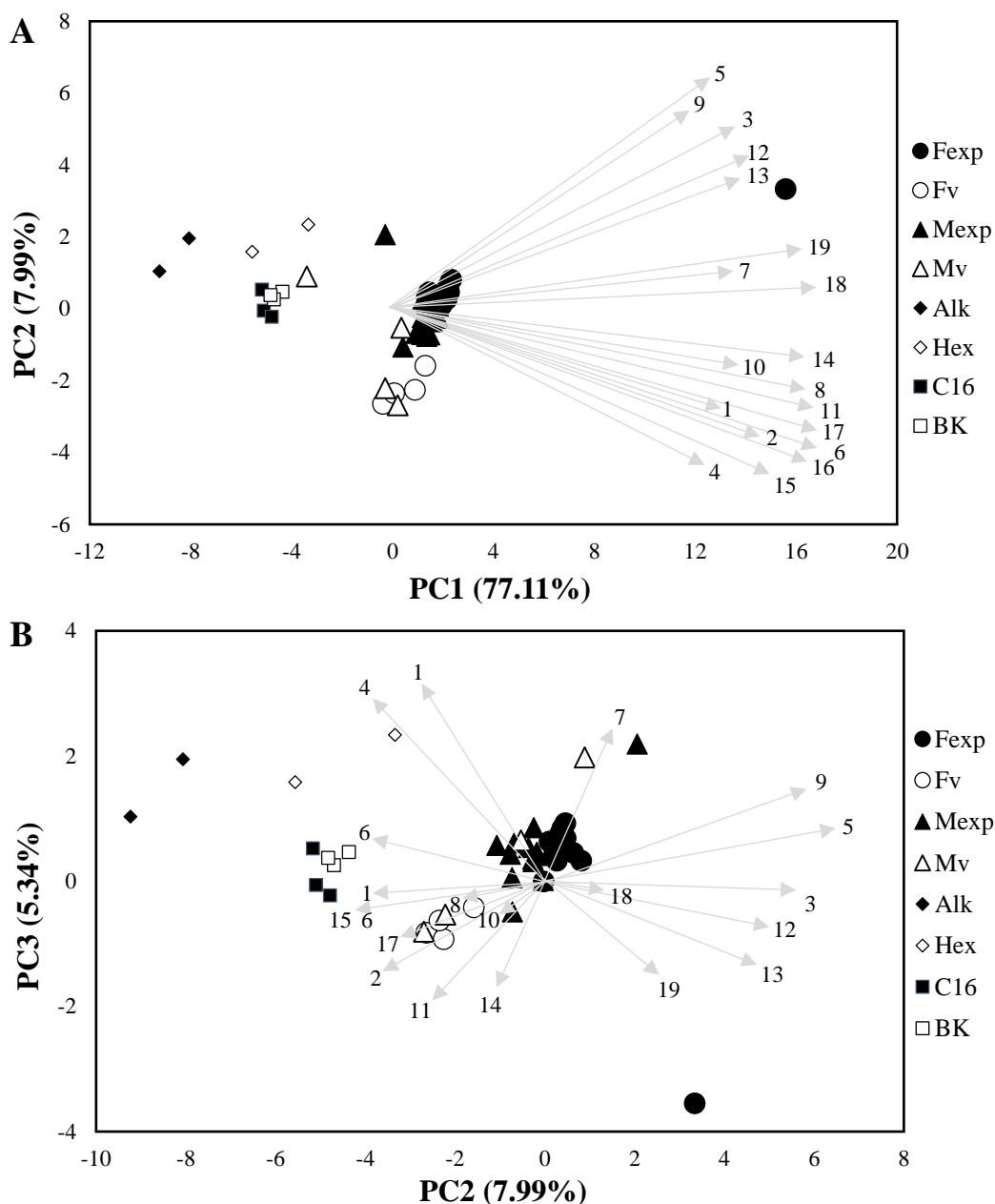


Figura 13. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz filtrada de señales químicas de corto alcance de adultos de *Alphitobius diaperinus* muestra las puntuaciones de PCA y el gráfico de cargas. (A) PC1 vs. PC2, (B) PC2 vs. PC3. Los números en la gráfica (picos) representan los compuestos descritos en la Tabla 5. Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes; Alk, estándar de alcanos; Hex, hexano; C16, hexadecano; BK, blanco.

Tabla 5. Cantidad media (ng/insecto \pm SD) de señales químicas de corto alcance detectadas en adultos de *Alphitobius diaperinus*

(Fv, Mv n=4; Fexp, Mexp n=14)

Pico	Compuesto químico	Fórmula molecular	RI calculado *	Tiempo de retención tr (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	% error (ppm)	Fexp	Fv	Mexp	Mv
1	2-Metil-1,4-benzoquinona	C ₇ H ₆ O ₂	1015	7.20	123.04406	123.04419	1.06	160.99 \pm 52.81	43.78 \pm 34.95	163.06 \pm 66.22	44.58 \pm 27.84
2	m-cresol	C ₇ H ₈ O	1020	7.28	123.08044	123.08070	2.11	1.11 \pm 0.73	3.98 \pm 1.83	1.12 \pm 0.78	1.90 \pm 2.01
3	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	1030	7.44	81.06988	81.07004	1.97	3.14 \pm 0.95	ND	1.61 \pm 0.73	ND
4	2-Etil-1,4-benzoquinona	C ₈ H ₈ O ₂	1109	8.66	137.05971	137.06010	2.85	422.18 \pm 93.07	198.99 \pm 83.7	390.17 \pm 60.86	225.18 \pm 95.28
5	2,5-Dimetil-1,4-benzoquinona	C ₈ H ₈ O ₂	1111	8.70	79.05423	79.05423	0.00	2.81 \pm 0.55	0.46 \pm 0.82	2.65 \pm 0.6	ND
6	Benzotiazol	C ₇ H ₅ NS	1233	10.53	136.02155	136.02173	1.32	1.40 \pm 0.64	3.06 \pm 2.28	1.91 \pm 2.04	2.19 \pm 2.22
7	2-Etil-1,4-hidroquinona	C ₈ H ₁₀ O ₂	1431	13.26	139.07536	139.07574	2.73	7.01 \pm 6.23	0.08 \pm 0.02	6.52 \pm 5.43	0.76 \pm 1.39
8	Benzofenona	C ₁₃ H ₁₀ O	1638	15.82	183.08044	183.07999	2.46	0.39 \pm 0.17	0.71 \pm 0.13	0.42 \pm 0.21	0.66 \pm 0.43
9	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1967	19.35	257.24751	257.24814	2.45	2.99 \pm 2.24	ND	1.58 \pm 3.62	0.13 \pm 0.15
10	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1973	19.41	239.23694	239.23669	1.04	1.32 \pm 1.03	1.75 \pm 1.97	1.44 \pm 1.07	0.86 \pm 1.62
11	Unknown	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	2085	20.46	-	237.16347	-	1.36 \pm 0.41	2.02 \pm 0.12	1.37 \pm 0.43	1.39 \pm 0.94
12	Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2156	21.13	181.15869	181.15831	2.10	0.1 \pm 0.16	ND	0.03 \pm 0.02	ND
13	Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2168	21.25	263.23694	263.23776	3.12	0.15 \pm 0.06	ND	0.11 \pm 0.08	ND
14	Docosano	C ₂₂ H ₄₆	2203	21.59	131.08548	131.08556	0.61	2.73 \pm 1.05	4.35 \pm 0.23	2.94 \pm 0.6	2.16 \pm 2.1
15	Unknown	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	2253	22.05	-	284.29517	-	1.77 \pm 0.69	2.94 \pm 0.89	1.89 \pm 0.70	2.35 \pm 1.88
16	Unknown	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	2346	22.96	-	315.23309	-	1.41 \pm 0.70	2.55 \pm 0.99	1.32 \pm 0.69	1.64 \pm 1.93
17	Unknown	-	2388	23.40	-	193.10112	-	1.54 \pm 0.48	2.37 \pm 0.20	1.45 \pm 0.47	1.71 \pm 1.25
18	Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	2700	28.44	71.08553	71.08553	0.00	10.36 \pm 5.94	5.27 \pm 1.05	8.72 \pm 2.47	5.14 \pm 2.10
19	Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	2900	34.44	71.08553	71.08542	1.55	4.84 \pm 2.87	ND	4.08 \pm 1.27	ND

* Índice de retención (RI) calculado utilizando la columna DB-5MS.

Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes.

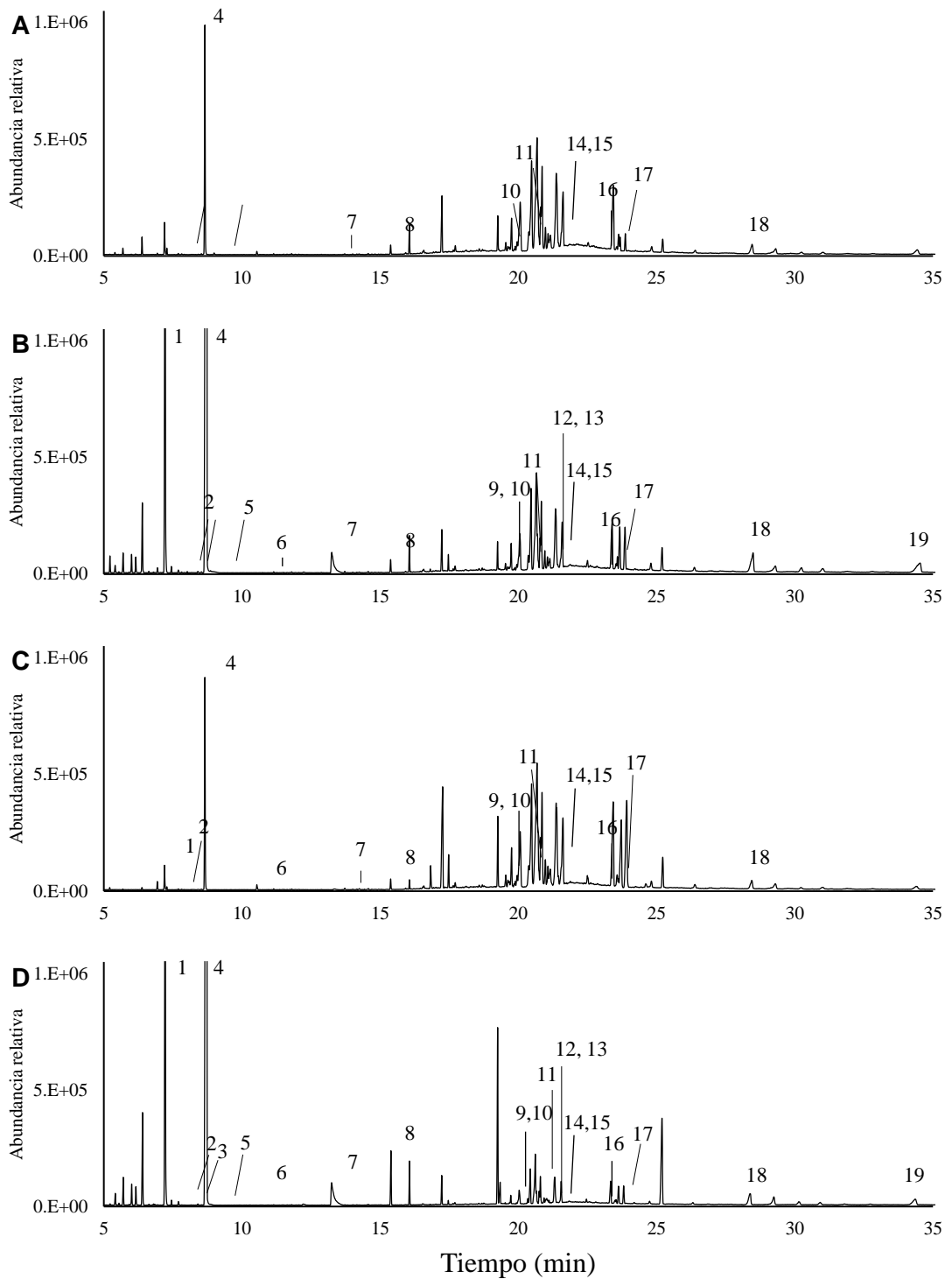


Figura 14. Cromatogramas GC-MS (CI) de señales químicas de corto alcance en adultos de *Alphitobius diaperinus* según su sexo y condición sexual. (A) Fv, (B) Fexp, (C) Mv, (D) Mexp. Los números en la gráfica (picos) representan los compuestos descritos en la Tabla 5. Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes.

La similitud del perfil químico de corto alcance entre los grupos de experiencia sexual de machos y hembras de *A. diaperinus* se mostró visualmente mediante el análisis NMDS (Figura 15), el cual fue coherente con el PCA graficado (Figura 13). Efectivamente, el análisis PERMANOVA no mostró diferencias significativas en los perfiles químicos de corto alcance según su sexo (es decir, machos vs. hembras; Pseudo- $F_{(1,35)}=0,757$; $p=0,459$), o dentro de los grupos de experiencia sexual (es decir, entre vírgenes, entre adultos experimentados o ambos $p=0,687$). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los perfiles químicos de corto alcance según la experiencia sexual como factor anidado (Pseudo- $F_{(2,35)}=14,399$; $p<0,001$). Específicamente, el perfil químico de corto alcance de Fexp es diferente al de Fv ($p<0,01$) y Mv ($p<0,01$), pero no al de Mexp ($p>0,05$). De manera similar, el perfil químico de Fv fue diferente al de Mexp ($p<0,01$) pero no al de Mv ($p>0,05$), mientras que Mexp fue químicamente diferente al de Mv ($p<0,01$).

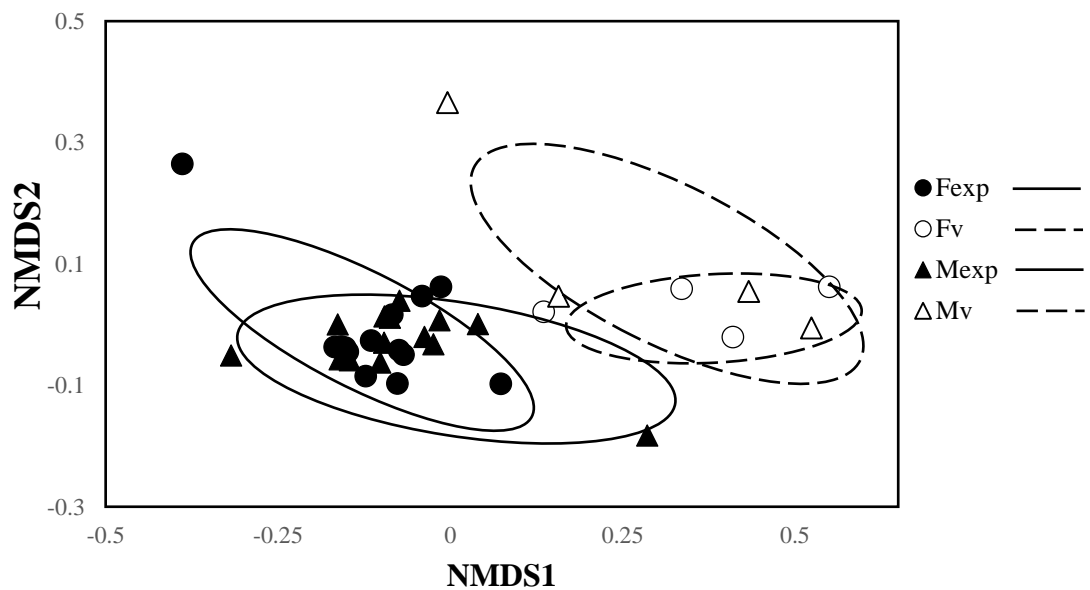


Figura 15. Escalamiento no multidimensional (NMDS) de señales químicas de corto alcance de adultos de *Alphitobius diaperinus* clasificados por sexo y experiencia sexual. NMDS basada en similitudes de Bray-Curtis (estrés = 0,08036). Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes.

iii. Identificación de compuestos electrofisiológicamente activos

La antena de machos de *A. diaperinus* respondieron a treinta y nueve señales químicas del total de señales detectadas en modo positivo mediante GC-MS (EI) y GC-FID. Veintiséis compuestos químicos detectados por el GC-EAD pertenecían a los alcanos, quinonas, ácidos grasos, éster y terpenos (Tabla 6 y Figura 16). 38 compuestos se detectaron en ambos sexos, aunque en diferentes concentraciones relativas, mientras que solo eicosano se detectó en Fv (Tabla 6).



Tabla 6. Compuestos electrofisiológicamente activos detectados por antenas de Mexp en Fexp, Fv y Mv de *Alphitobius diaperinus*

Pico	Compuesto químico	Fórmula molecular	RI_GC-FID calculado *1
E1	1,4-Benzoquinona	C ₆ H ₄ O ₂	916
E2	2-Metil-1,4-benzoquinona	C ₇ H ₆ O ₂	1018
E3	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	1032
E4	2-Etil-1,4-benzoquinona	C ₈ H ₈ O ₂	1111
E5	2,5-Dimetil-1,4-benzoquinona	C ₈ H ₈ O ₂	1124
E6	Unknown	-	1425
E7	Palmitato de etilo	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1994
E8 *2	Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	2002
E9	Unknown	-	2135
E10	Unknown	-	2142
E11	Estearato de etilo	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	2194
E12	Docosano	C ₂₂ H ₄₆	2202
E13	Unknown	-	2410
E14	Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	2603
E15	Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	2706
E16	Unknown	-	2744
E17	3-Metilheptacosano	C ₂₈ H ₅₈	2778
E18	Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	2804
E19	Metiloctacosano *3	C ₂₉ H ₆₀	2833
E20	2-Metiloctacosano	C ₂₉ H ₆₀	2861
E21	3-Metiloctacosano	C ₂₉ H ₆₀	2870
E22	Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	2908
E23	Unknown	-	2934
E24	Dimetilnonacosano *4	C ₃₁ H ₆₄	2955
E25	3-Metilnonacosano	C ₃₀ H ₆₂	2982
E26	Triacotano	C ₃₀ H ₆₂	3005
E27	Metiltriacontano *5	C ₃₁ H ₆₄	3032
E28	3-Metiltriacontano	C ₃₁ H ₆₄	3061
E29	Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	3104
E30	13-Metilhentriacontano	C ₃₂ H ₆₆	3120
E31	Unknown	-	3133
E32	Unknown	-	3158
E33	13-Metilhentriacontano	C ₃₂ H ₆₆	3179
E34	Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	3204
E35	Unknown	-	3329
E36	Unknown	-	3554
E37	Unknown	-	3570
E38	Unknown	-	3626
E39	Unknown	-	3649

Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mv, machos vírgenes; Mexp, machos experimentados.

*1 Índice de retención (RI) calculado utilizando la columna DB-5MS.

*2 Compuesto detectado solo en Fv.

*3 Mezcla de 10-, 11-, 12-, 13-, y 14-metiloctacosano.

*4 Mezcla de 8,12-, 10,14-, 11,15-, 12,16- y 13,17-dimetilnonacosano.

*5 Mezcla de 11-, 12-, 13-, 14-, y 15-metiltriacontano.

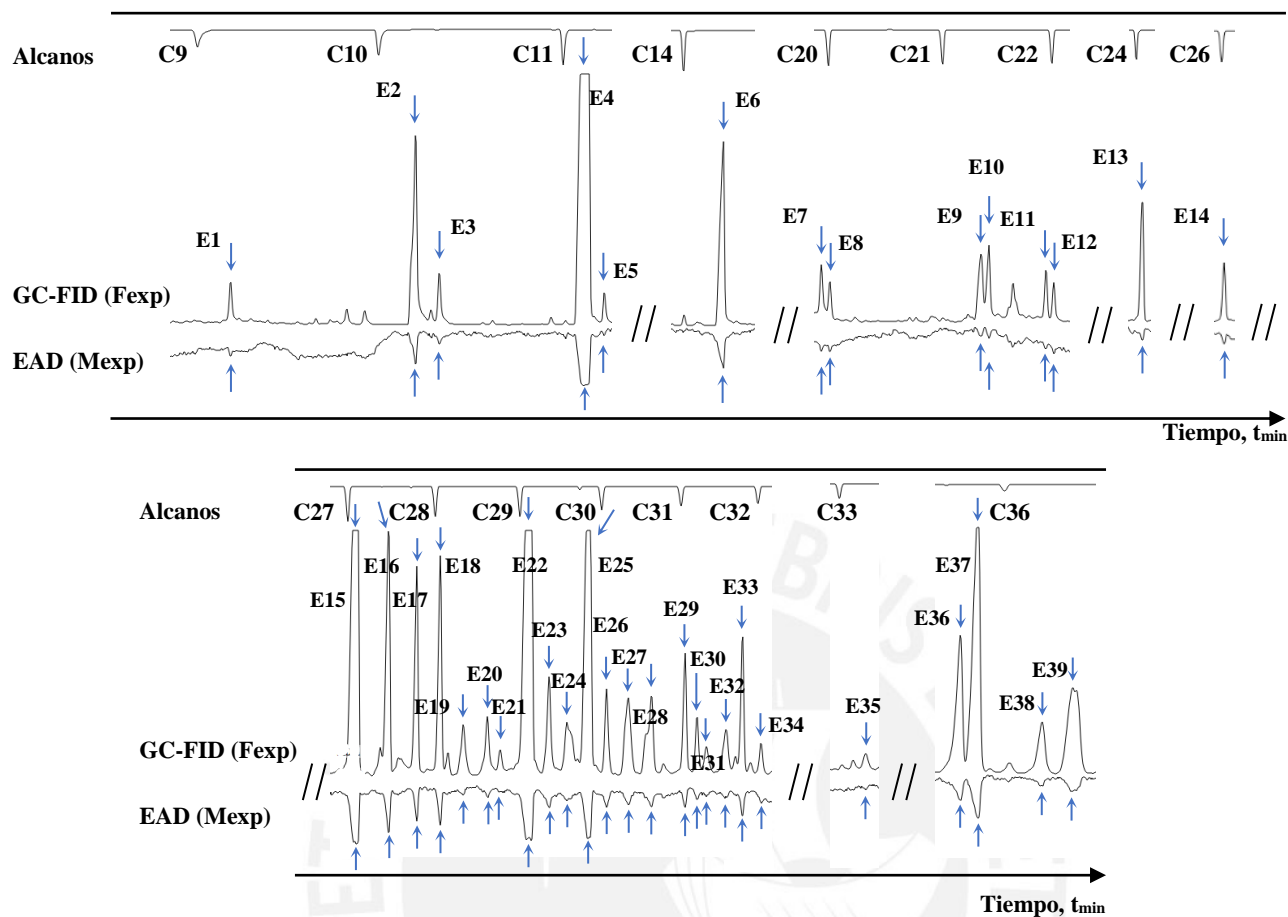


Figura 16. Respuestas de las antenas de Mexp por GC-EAD frente a señales químicas de Fexp detectadas por GC-FID obtenidas de los extractos de adultos de *Alphitobius diaperinus*. Las flechas indican compuestos electrofisiológicamente activos. Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

3.4. Discusiones

Anteriormente investigadores se han enfocado en la composición química de machos vírgenes de *A. diaperinus*, demostrando la atracción de estas señales para ambos sexos vírgenes y desarrollando biotrampas con estas feromonas de atracción para capturar esta plaga en ensayos de laboratorio y campo (Bartelt et al., 2009; Cossé & Zilkowski, 2015; Hassan & Shakir, 2008; Hassemer et al., 2015, 2016; Verschut et al., 2019). Sin embargo, en esos estudios no evaluaron la diferencia de la composición química de los adultos según factores como sexo y/o

experiencia sexual, los cuales permiten evaluar y predecir el comportamiento en el campo de estas plagas, para posteriormente diseñar y desarrollar biotrampas avanzadas efectivas que permitan su captura (Adamski et al., 2019; Hassan & Shakir, 2008; Müller & Buchbauer, 2011; Yew & Chung, 2015). En este sentido, los resultados proporcionan evidencia que sugieren un comportamiento complejo en la atracción y apareamiento basado en señales olfativas de corto y largo alcance que se ven afectadas por el sexo y la experiencia sexual en adultos de *A. diaperinus*. Específicamente, se demostró que las señales químicas de largo alcance emitidas por cualquier adulto pueden ser atractivas para otros machos, independientemente de su sexo y experiencia sexual, a diferencia del atractivo femenino que puede depender de ambos factores. Además, las respuestas conductuales de cópula se ven afectadas debido al sexo y la experiencia sexual de los adultos, demostrando que la transformación de la experiencia sexual lleva a modificar la respuesta de apareamiento de los adultos a señales químicas de corto alcance. Con respecto a las señales químicas detectadas, se presumen que existen 28 señales químicas de largo alcance específicas por sexo y 39 señales generalizadas que emiten ambos sexos. Mientras que las 19 señales químicas de corto alcance están relacionadas a su experiencia sexual. Finalmente, se demostró que ciertas señales de corto alcance son electrofisiológicamente activas para los machos, de las cuales su función biológica se propone por lo ya reportado para adultos de *A. diaperinus* u otros coleópteros de la familia de Tenebrionidae como benzoquinonas (reportadas como feromonas de alarma para esta especie), limoneno (reportado como feromona de agregación para esta especie), alcanos, ácidos grasos y ésteres (reportados como feromona de agregación para otras especies de la familia Tenebrionidae).

Atracción de largo alcance para el reconocimiento de pareja

Los resultados demuestran que las señales químicas de largo alcance emitidas por cualquier adulto pueden ser atractivas para otros machos, independientemente de su sexo y experiencia sexual. Hassemer et al. (2016) reportaron que las señales químicas de largo alcance de Fv no son atractivos para otros Fv o Mv; sin embargo, los resultados obtenidos demuestran lo contrario, lo cual podría estar asociado a diferencias en las adaptaciones químicas entre poblaciones geográficamente

distantes (Bartelt et al., 2009; Hassemer et al., 2016) o el tiempo de aclimatación de 1 h usado en el olfatómetro durante los ensayos, causando estrés en los adultos los cuales posiblemente liberarían señales no atractivas. Una excepción parece ser Fexp, cuyas señales químicas no son atractivas para otras hembras, Fv o Fexp, pero sí lo son para los machos, Mv o Mexp. Ello se puede relacionar con las emisiones de señales químicas de concentraciones distintas, discutidos en el último apartado. Un fenómeno bastante similar fue reportado para escarabajos adultos de *Tribolium confusum*, en el cual los Mv son atractivos para otros machos, pero no para las hembras (Ó'Ceallacháin & Ryan, 1977). Estas señales olfativas atractivas emitidas constantemente por los adultos de *A. diaperinus* pueden estar actuando presumiblemente tanto como feromonas de agregación y feromonas sexuales. En general, se sabe que las feromonas de agregación de los escarabajos pueden ser emitidas y atraídas por cualquier sexo (Chen et al., 2014; Fedina & Lewis, 2008; Kamiya et al., 2015; Vanderbilt et al., 1998). En consecuencia, las señales olfativas atractivas de *A. diaperinus*, que actúan como feromonas de agregación, parecen ser liberadas por difusión ya que los adultos utilizados en los experimentos no recibieron ninguna condición favorable (por ejemplo, comida) durante su empleo en los olfatómetros, lo cual puede promover su emisión. Por lo tanto, los resultados indican que las señales olfativas de largo alcance de los adultos de *A. diaperinus* funcionan como atrayentes para otros machos, a diferencia del atractivo femenino que puede depender de ambos factores. Estos resultados evidencian una posible aplicación de las señales químicas de largo alcance de ambos sexos como herramientas químicas en la manufactura de biotampas avanzadas.

Evaluación cercana de parejas potenciales para el apareamiento

La localización de la pareja y la discriminación sexual en los escarabajos, los primeros pasos del apareamiento (fase pre-copulatoria), generalmente se asocian con una combinación de reconocimiento físico y químico por parte de las antenas y las patas (Crook et al., 2004). Después de la atracción de una pareja potencial, los escarabajos muestran un comportamiento antenal (Font & Desfilis, 2003; Kamiya et al., 2015; Wojcik, 2013) donde se requieren señales químicas de corto alcance (feromonas de contacto) para provocar el apareamiento (Crook et al., 2004; Geiselhardt, Schmitt, et al., 2009; Qadir et al., 2021; Spikes et al., 2010; Tanigaki et

al., 2007). En base a las observaciones, se presume que tanto las hembras como los machos de *A. diaperinus* emiten señales de corto alcance que permiten que el sexo opuesto reconozca a la pareja durante el contacto. En algunas especies de la familia Tenebrionidae, una cópula rápida es una estrategia para lidiar con el apareamiento frecuente de las hembras, siendo que los machos pueden tener más posibilidades en transferir el espermátforo durante la cópula (Fedina & Lewis, 2008; Font & Desfilis, 2003; Wojcik, 2013). Aunque este comportamiento también fue mostrado por los machos de *A. diaperinus*, se esperaba que ellos se aparearan con cualquier hembra; sin embargo, las respuestas de apareamiento fueron muy bajas (tiempo de monta y cópula) de Mexp en comparación con Mv. Por un lado, se ha reportado que las hembras suelen aparearse varias veces con machos para seleccionar al mejor candidato, así los machos posteriores tienen más posibilidades de tener éxito (Monceau & van Baaren, 2012; Nahrung & Allen, 2004; Parker, 1979; Wilson & Tomkins, 2015). Por ello, dado que los Mexp de *A. diaperinus* ya se han apareado, presumiblemente en las cajas de crecimiento, estos pueden ser más selectivos para aparearse. Sin embargo, no podemos asegurar que su baja actividad de apareamiento pueda deberse a que ya estaban apareados el día del experimento, debido que los Mexp fueron aislados una hora antes de los experimentos, o tener menos deseo sexual, ya que algunos escarabajos machos suelen aparearse una vez al día debido a las limitaciones en la producción del espermatozoide (Bell et al., 2007; Fedina & Lewis, 2008; Wojcik, 2013). Por otro lado, a diferencia del Mexp, el Mv tiene una necesidad natural-sexual de copular (Akinyemi & Kirk, 2019; Dukas, 2005; Fedina & Lewis, 2008; Jennions & Petrie, 2000); por lo tanto, se comprende que Mv monte y copule durante más tiempo con Fv y Fexp en comparación con Mexp. Sin embargo, el tiempo de cópula puede depender no solo del comportamiento del macho sino también de la hembra. En efecto, se registró que algunas Fexp facilitaron la monta de los machos, lo que acorta el tiempo en las respuestas de apareamiento. Estas respuestas conductuales diferenciales debidas al sexo y la experiencia sexual de los adultos también se han registrado en otros insectos (Dion et al., 2020; Robledo et al., 2018). Por ejemplo, en algunas especies de Tenebrionidae, los adultos experimentados tienen respuestas conductuales de apareamiento contrastantes en comparación con los adultos vírgenes debido a interacciones sociales previas o experiencias previas con señales olfativas

particulares (Carazo et al., 2004; Dion et al., 2019). En este sentido, los resultados destacan que la transformación de la experiencia sexual (es decir, de vírgenes a adultos experimentados) conlleva a modificar la respuesta de apareamiento de los adultos a señales químicas de corto alcance en *A. diaperinus*. Finalmente, al final de la cópula se observó un posible comportamiento de apareamiento conocido como vigilancia post-copulatoria. Se ha reportado que muchos insectos protegen a la pareja, lo que evita que las hembras se vuelvan a aparear, esto para aumentar la capacidad del macho en fertilizar los huevos de la hembra (Fedina & Lewis, 2008; Font & Desfilis, 2003; Kamiya et al., 2015; Simmons & Siva-Jothy, 1998). Este comportamiento observado es útil al elaborar una estrategia de conformación de las biotrapas en el campo que permita la captura de esta plaga, ver Capítulo 2. En general, se evidencia que la evolución de la experiencia sexual genera un comportamiento de apareamiento distinto de los adultos en función de las señales químicas de corto alcance que detectan. Además, para describir con precisión la atracción y el comportamiento de apareamiento de *A. diaperinus* y el rol de las señales olfativas, es necesario identificar sus compuestos químicos de largo y corto alcance, es decir, compuestos volátiles y cuticulares, según los dos factores evaluados (es decir, sexo y experiencia sexual).

Señales químicas de largo y corto alcance de adultos de *A. diaperinus* y su función biológica

En base a los resultados químicos obtenidos, la diferencia en los perfiles químicos de largo alcance entre adultos de *A. diaperinus* están relacionadas con su sexo. Estos resultados se pueden explicar por los compuestos de largo alcance reportados únicos por sexo, siendo estos presumiblemente los responsables en la discriminación sexual de este sexo. En efecto, se ha demostrado que la variación de la composición feromonal en varias especies de insectos es un factor importante para el aislamiento reproductivo y especiación (Heuskin et al., 2014; Nieberding et al., 2008). Por tanto, considerando los 39 compuestos atractivos generalizados a los de largo alcance presentes en ambos sexos experimentados, se proponen a los compuestos únicos por sexo (26 compuestos para Fexp y 2 para Mexp), como aquellas señales químicas específicas para la discriminación sexual. Por otro lado, según los resultados químicos, las diferencias en los perfiles químicos de corto

alcance entre adultos de *A. diaperinus* están relacionadas con el estado de su experiencia sexual, pero no con el sexo. Esto se puede explicar por el tiempo de contacto durante los experimentos de apareamiento, el cual fue similar para Mv y Mexp, independientemente del sexo de sus parejas. Sin embargo, Mv interactuó con más frecuencia en la fase copulatoria (monta y cópula) en comparación con Mexp, ya sea con hembras o entre ellos (observaciones personales de Calla-Quispe). En efecto, el comportamiento homosexual se ha registrado en diversas especies de escarabajos (Biljana Stojković et al., 2010; Engel et al., 2015; Yutaka Iguchi, 1996), por lo tanto, se presume que las señales químicas de corto alcance que provocan el comportamiento sexual deberían estar presentes tanto en machos como en hembras en estas especies. De esta manera, se presume que las señales químicas de corto alcance asociadas a la experiencia sexual en adultos pueden servir como una señal de apareamiento específica de la especie (Stoffolano et al., 1997).

Con respecto a la función biológica de los compuestos electrofisiológicamente detectados por las antenas de machos, 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona forman parte de las señales de defensa (feromonas de alarma) en adultos de *A. diaperinus*. Efectivamente, Hassemmer et al., (2016) y Tseng et al., (1971) demostraron que las secreciones defensivas provenientes de la glándula abdominal de *A. diaperinus* se liberan en respuesta directa a cualquier perturbación y por ambos sexos. Además, Hassemmer et al., (2015) demostraron que las antenas de ambos sexos de *A. diaperinus* arrojaron una respuesta electrofisiológica a las tres benzoquinonas, y la mezcla mostró una actividad conductual como feromona de alarma para ambos sexos en bioensayos olfatométricos de cuatro brazos. En este sentido, los resultados demuestran que los adultos de *A. diaperinus* desarrollaron una mayor producción de 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona como parte de su composición química de corto alcance, arrojando éstas y 1,4-benzoquinona respuestas electrofisiológicamente activas en machos experimentados. Ello sugiere que esos compuestos son secreciones defensivas en adultos de *A. diaperinus* que además muestra una amplia distribución como feromonas de alarma en la familia Tenebrionidae (Attygalle et al., 1991, 2020; Rork & Renner, 2018). Por otro lado, respecto a las feromonas de agregación ya reportadas para machos vírgenes de esta especie, su composición química fluctúa conforme se estudian poblaciones de

distribución geográfica distinta (Bartelt et al., 2009; Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2015, 2016; Singh & Johnson, 2012). En base a los resultados publicados por otros autores, el R-limoneno es una de las señales químicas de largo alcance electrofisiológicamente activo, el cual en combinación con algunas de las señales de respuesta antenal reportada, formaría parte de la composición de feromonas de agregación de adultos de *A. diaperinus*. Con respecto a los otros compuestos electrofisiológicamente activos reportados, ciertos alcanos, metilalcanos y ácidos grasos actúan como señales químicas atrayentes en coleópteros de la familia Tenebrionidae (Heuskin et al., 2011; Zhang et al., 2014). Mientras que m-cresol, forma parte de la composición de señales químicas precursoras de compuestos de defensa (Attygalle et al., 1991, 2020; Cortez et al., 2017; Drilling & Dettner, 2010; Rocha et al., 2013). El benzotiazol es un compuesto antifúngico (Luo et al., 2018), se encuentra en la composición química de volátiles de algunas especies de Erotylidae, Plataspidae y Trogidae (Cortez et al., 2017; Onnink et al., 2017), además es un químico defensivo de *Tritoma bipustulata* contra las hormigas (Drilling & Dettner, 2010) y presenta una actividad tóxica contra *T. castaneum* en granjas avícolas (Cui et al., 2020). Por lo tanto, se propone que los adultos de *A. diaperinus* secretan este compuesto para protegerse de los microorganismos presentes en las granjas avícolas (Agabou & Alloui, 2010; Alves et al., 2004; da Soares et al., 2018; de Las Casas et al., 1972; Goodwin & Waltman, 1996; Hazeleger et al., 2008; Leffer et al., 2010; McAllister et al., 1995; Roche et al., 2009), así como para repeler las poblaciones de *T. castaneum* que cohabitan con adultos de *A. diaperinus* en granjas avícolas. En general, el análisis del perfil químico de adultos en función de los factores de sexo y experiencia sexual permite corroborar los resultados obtenidos en ensayos de atracción y cópula. Por un lado, se determinó la presencia de señales químicas de largo alcance específicas por sexo y señales químicas generalizadas que emiten ambos sexos. Mientras que las señales químicas de corto alcance están relacionadas a su experiencia sexual. Finalmente, se identificaron que ciertas señales de corto alcance son electrofisiológicamente activas, confirmando las funciones biológicas ya demostradas para esos compuestos en adultos de *A. diaperinus* de distribución geográfica distinta y otros coleópteros de Tenebrionidae.

4. Capítulo 2. Diseño de trampas avanzadas

4.1. Evaluación de criterios para el diseño y desarrollo de biotrampas avanzadas

Los semioquímicos son compuestos químicos implicados en la comunicación entre seres vivos. Debido a esta función son útiles para manejar el comportamiento de las plagas agrícolas. En el caso de plaga de insectos, la implementación de las biotrampas en campo permite: (i) detectar la plaga y eliminarla de la zona, (ii) establecer periodos de emergencia de adultos y su distribución en la zona y (iii) evaluar la abundancia de la población para una posterior optimización de su control (Adamski et al., 2019; Jiménez Martínez, 2009; Vacas González, 2011; Yew & Chung, 2015).

4.1.1. Estrategias de control

En la implementación de las biotrampas en campo principalmente se utilizan cuatro estrategias de control que se describen a continuación (Adamski et al., 2019; Alvarez Costa, 2019; Tewari et al., 2014; Vacas et al., 2009, 2012; Yew & Chung, 2015).

i. Captura masiva por atracción (sistemas “pull”)

La captura o trapeo masivos se basa en usar numerosas biotrampas por hectárea a desinfectar, para así atraer la plaga a alguna biotrampa usando una herramienta química (por ejemplo, señales atrayentes de agregación u oviposición o señales sexuales). Las ventajas que presentan son por ser altamente selectivos por el componente feromonal específico de la plaga a controlar y eficaces por la captura de ambos sexos o preferentemente alguno de ellos. Sin embargo, las desventajas que prevalecen son por ser altamente costosas, debido a la necesidad de usar numerosas biotrampas en campo y la posible saturación de las herramientas químicas por la captura de adultos en las biotrampas por tanto comportamiento críptico de la plaga no capturada.

ii. Repulsión y atracción (sistemas “push-pull”)

Esta estrategia consiste en dirigir los insectos mediante biotrampas push con herramientas repelentes hacia biotrampas pull con herramientas atractivas para así controlar su distribución y abundancia en el campo.

iii. Atracción y muerte o infección

En la estrategia de atraer y matar se requiere de dos herramientas químicas dentro de biotrapas por separado, una señal atrayente que permita atraer la plaga hacia las biotrapas y en la otra, una señal tóxica como el insecticida que mate a los insectos atrapados o un agente infeccioso que convierta a la plaga en un vector infeccioso para su población al salir de la biotrampa. La ventaja de esta estrategia es que permite atraer y desinfectar a corto (mata inmediatamente) o largo plazo (infecta a su población al ser un vector infeccioso) la zona de la plaga capturada. Sin embargo, la desventaja que presenta es diseñar una conformación ideal de las herramientas químicas que permita usar una señal tóxica, pero ésta de por sí presenta desventajas de toxicidad hacia las aves frente al uso de semioquímicos además que requieren de condiciones ambientales (temperatura y humedad) estables en campo.

iv. Confusión sexual

Esta estrategia se basa en usar como herramienta química altas concentraciones de señales sexuales, con el fin de reducir, inhibir y/o retrasar la cópula entre hembra y macho al interferir en la comunicación química, y por tanto prevenir la reproducción de la plaga. La principal desventaja es encontrar la concentración óptima que permita no desarrollar un comportamiento críptico del sexo a capturar.

La implementación de cualquier estrategia mencionada requiere de un estudio previo de los factores ambientales (temperatura, humedad, iluminación, entre otros) y del comportamiento de la plaga en campo para así optimizar los parámetros de liberación controlada y concentración de las herramientas químicas.

4.1.2. Dispositivos emisores

Dependiendo de la estrategia a usar en el control de la plaga, se requiere de un determinado dispositivo que libere de manera controlada las herramientas químicas de la biotrampa (Athanassiou et al., 2009; Bradley et al., 1995; Domínguez-Ruiz et al., 2008; McDonough, 1997; Muñoz-Pallares et al., 2001). En este sentido, el diseño de estos dispositivos emisores depende de:

i. Naturaleza del dispositivo

Los dispositivos que se desarrollan y comercializan se pueden distinguir como dispositivos de matriz sólida impregnados con las herramientas químicas, con reservorios para las herramientas químicas o con formulaciones líquidas a pulverizar en un tiempo determinado (Heuskin et al. 2011). En la fabricación de dispositivos de matriz sólida se emplea polímeros por su costo reducido y facilidad de procesamiento. Por ejemplo: tubos de polietileno, cloruro de polivinilo u otro polímero en forma de espiral, p. ej. Isomate®, NoMate CM® Spiral (Tomaszewska et al., 2005); bolsitas de polietileno (Torr et al., 1997); viales de polietileno (Johansson et al., 2001; Zhang et al., 2014); membranas (materiales que permiten la liberación controlada por sus paredes semipermeables, p. ej. CheckMate® CM-XL; Welter et al., 2005); películas de polímero adsorbente (contiene la feromona, cubierta por ambos lados con láminas de plástico semipermeables); septa de goma, caucho o silicona (permite la retención y liberación de las feromonas, Heuskin et al., (2011); Kuenen & Siegel (2015); McDonough (1991)); fibras huecas o microcápsulas (micropolímeros con feromonas adsorbidas; Golub et al., (1983)); matrices dispensadoras tipo gel (Atterholt et al., 1999); entre otros (Heuskin et al., 2011).

ii. Cinética de emisión

Las herramientas químicas se deben liberar controladamente a una tasa requerida para el control de la plaga. Para ello, la velocidad de emisión ideal de las herramientas químicas tiene que ser constante o evitando que la tasa de liberación disminuya con el tiempo, las cuales pueden variar días o semanas dependiendo de los factores ambientales, dispositivo, la capacidad de liberación y las propiedades químicas de las feromonas (Tomaszewska et al., 2005; Welter et al., 2005).

iii. Factores ambientales

La emisión de las herramientas químicas depende en gran medida de los factores ambientales (temperatura, humedad, iluminación, velocidad del viento, entre otros) de la plaga en el campo a desinfectar. Dependiendo cuales sean los parámetros ambientales, la emisión se debe adaptar a las

necesidades que requieren las herramientas químicas para ser estables y eficientes en el control de la plaga.

La implementación de cualquier estrategia mencionada requiere de un estudio previo de los factores ambientales (temperatura, humedad, iluminación, entre otros) y del comportamiento de la plaga en campo para así optimizar los parámetros de liberación controlada y concentración de las herramientas químicas. Sin embargo, de los dispositivos más rentables y mayormente empleados en control de plaga se encuentran las septa de caucho (Heuskin et al., 2011; Mweresa et al., 2020; Valverde Rodríguez & Curkovic Sekul, 2021).

4.2. Revisión de métodos basados en semioquímicos para el control de *A. diaperinus*

4.2.1. Estrategias de atracción (sistemas “pull”)

Bartelt et al. (2009) realizaron ensayos en campo con sistemas de atracción, usando volátiles de Mv ((*E*)- β -ocimeno, (*R*)-(+)-dauceno, 2-nonanona, (*S*)-(+)-linalool y (*R*)-(+)-limoneno) como herramientas de atracción, para el control de adultos de *A. diaperinus* en granjas avícolas, ver Figura 17. La mezcla de estas señales químicas de largo alcance demostró ser atractiva, permitiendo la captura de adultos. Sin embargo, no demostraron si se necesita del conjunto de señales para que actúen como feromonas de agregación o solo alguna de ellas. Posteriormente, Singh & Jhonson (2012) confirmaron los resultados ya obtenidos mediante ensayos en campo (Figura 17) confirmando que la mezcla de las 5 señales químicas atrae a adultos y larvas de *A. diaperinus*, permitiendo su captura en las biotrampas. Además, ellos demostraron en ensayos de laboratorio que de la producción de volátiles de Mv, linalool y (*R*)-(+)-limoneno no mostraron una atracción en adultos y larvas de *A. diaperinus*, respecto al control. Ello sugirió que solo la mezcla de (*E*)- β -ocimeno, (*R*)-(+)-dauceno, 2-nonanona y (*S*)-(+)-linalool actúan como feromonas de agregación. Asimismo, señalaron que la mezcla de las 5 señales químicas con estiércol fresco de aves aumenta la atracción de adultos y larvas de *A. diaperinus* en ensayos de laboratorio. Con el tiempo, Cossé &

Zilkowski (2015) confirmaron, mediante ensayos en laboratorio, que solo la mezcla de (*E*)- β -ocimeno, (*R*)-(+)-dauceno, 2-nonanona y (*S*)-(+)-linalool son necesarios para que adultos de *A. diaperinus* exhiban un comportamiento de atracción.

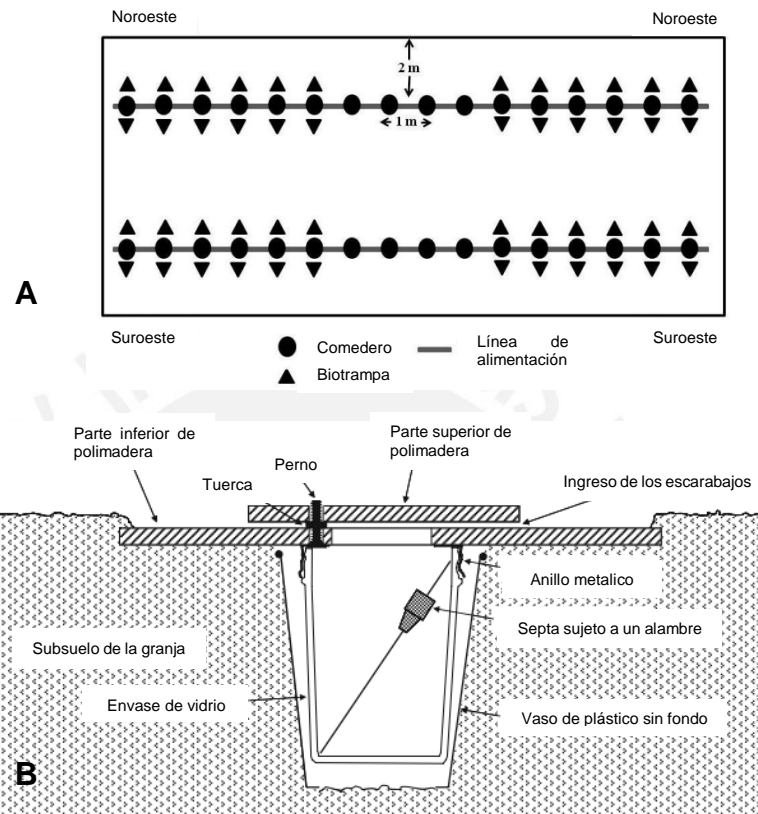


Figura 17. Conformación “pull” de las biotrapas en campo para el control de *Alphitobius diaperinus*. (A) Posiciones de las biotrapas a lo largo de la granja. (B) Diseño de la biotrapa. Adaptado de Bartelt et al. (2009), Singh & Jhonson (2012).

Asimismo, Hassemer et al., (2019) demostraron a través de ensayos en campo que el uso de sistemas de atracción, usando feromonas de agregación ((*R*)-limoneno, 2-nonanona, (*E*)-ocimeno, (*S*)-linalool, (*R*)-dauceno y (*E,E*)- α -farneseno) como herramientas de atracción, permite la desinfección de adultos de *A. diaperinus* en granjas avícolas, ver Figura 18. Ellos demostraron que estas biotrapas atractivas permitía la captura de adultos de ambos sexos a comparación con trampas control en granjas a diferentes condiciones de temperatura, aunque mostraron que no hay una preferencia de alguno de los sexos por las biotrapas atractivas. Asimismo, mostraron que cuando se

combina este sistema con un método físico previo (limpieza de las camas) el número de insectos en las granjas disminuye, sin embargo, las biotrapas mantienen su propósito de captura.

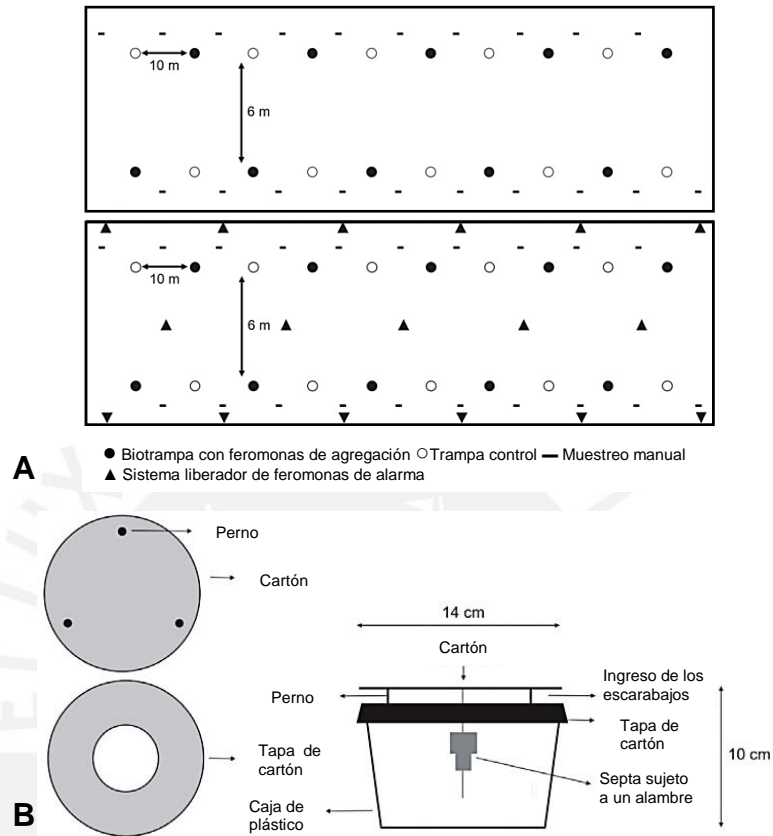


Figura 18. Conformación “pull” y “push-pull” de las biotrapas en campo para el control de *Alphitobius diaperinus*. (A) Posiciones de las biotrapas a lo largo de la granja. (B) Diseño de la biotrampa. Adaptado de Hassemer et al. (2019).

4.2.2. Estrategias de repulsión y atracción (sistemas “push-pull”)

Hassemer et al. (2019) realizaron ensayos en campo aplicando sistemas de repulsión y atracción, usando feromonas de alarma (1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona) como herramientas repelentes y feromonas de agregación ((*R*)-limoneno, 2-nonanona, (*E*)-ocimeno, (*S*)-linalool, (*R*)-dauceno y (*E,E*)- α -farneseno) como herramientas químicas de atracción, ver Figura 18. Ellos demostraron que este sistema permite una mayor captura de adultos a comparación que el sistema “pull”, ver sec. 4.2.1. Efectivamente, las biotrapas con repelentes direccionaron a

los adultos hacia las biotrampas de atracción aledañas, permitiendo la captura de ellas, aunque mostraron que no hay una preferencia en la captura de alguno de los sexos. Sin embargo, mostraron que los adultos cayeron en mayor proporción en trampas control de este sistema respecto a trampas control de sistemas de atracción, revelando un comportamiento crítico de los adultos, ya que al sentir esas señales de alarma ellos muestran una respuesta de huida y se alojan en cualquier depósito aledaño, aunque significativamente más en biotrampas de atracción que trampas control.

4.2.3. Estrategias de atracción e infección

Hassemer et al. (2020) realizaron ensayos en campo aplicando sistemas de atracción e infección, usando microorganismos entomopatógenos (hongos *Beauveria bassiana*) como agentes de infección y feromonas de agregación ((*R*)-limoneno, 2-nonanona, (*E*)-ocimeno, (*S*)-linalool, (*R*)-dauceno y (*E,E*)- α -farneseno) como herramientas químicas de atracción, ver Figura 19. Ellos demostraron que estas biotrampas eran inocuas para los animales y respetuosas con el medio ambiente en comparación con los insecticidas usados rutinariamente. En efecto, *B. bassiana* es un hongo entomopatógeno de amplio rango de insectos. Por tanto, posee un gran potencial como control biológico, ocasionando altas tasas de mortalidad en larvas y adultos. Sin embargo, la acción de estos hongos entomopatógenos es lenta, necesitando condiciones ambientales estables para mantener su viabilidad y patogenicidad, las cuales son difíciles de mantener en campo como lo demostrado por Alexandre et al. (2006), Alves et al. (2004), Rezende et al. (2009) y Rohde et al. (2006) en ensayos de laboratorio usando hongos *B. bassiana*, *Cladosporium* sp., *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma* sp. sobre larva y adultos de *A. diaperinus*.

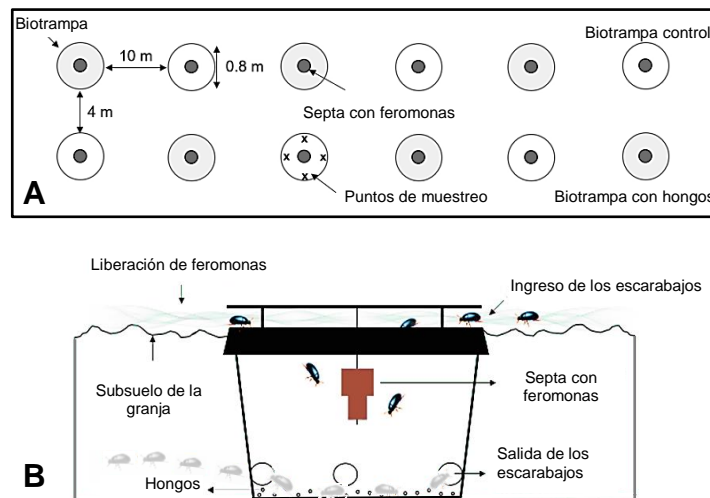


Figura 19. Conformación de las biotrampas de atracción e infección en campo para el control de *Alphitobius diaperinus*. (A) Posiciones de las biotrampas a lo largo de la granja. (B) Diseño de la biotrapa. Adaptado de Hassemer et al. (2020).

Por otro lado, (Alves et al. (2004), Alves et al. (2005) y Alves et al. (2012) reportaron en ensayos de laboratorio que los nemátodos *Steinernema glaseri*, *S. carpocapsae*, *S. arenarium* y *Heterorhabditis* sp. actúan como patógenos preferentemente ante larvas que adultos de *A. diaperinus*. Sin embargo, la mortalidad de esta plaga decrece al aumentar la temperatura a 30 °C, lo cual afectaría su posible aplicación en campo debido que las condiciones de crecimiento de las aves son en promedio superior a esa temperatura. Por ello, la aplicación de solo esta estrategia en campo es inviable, pero posiblemente la combinación con algún método físico ayude con el control de esta plaga en su estado pupal y larval.

En general, estos estudios demuestran que la composición feromonal de *A. diaperinus* varía con respecto a la distribución geográfica que presenta. Además, que las feromonas de agregación (señales químicas de largo alcance de Mv) son útiles como herramientas químicas en sistemas de atracción para la captura de larva y adultos de *A. diaperinus*, mientras que las feromonas de alarma (señales químicas de glándulas abdominales de ambos sexos) actúan como herramientas químicas en sistemas de repulsión. Por tanto, su aplicación en campo como herramientas químicas en biotrampas depende de la composición de la mezcla

feromonal, conformación de las biotrampas y condiciones de ambientales y físicas que presenten los galpones. Por otro lado, aunque las estrategias de atracción e infección muestren óptimos resultados, su aplicación en campo demanda de un control de las condiciones ambientales.

4.3. Métodos de control existentes en el mercado para el control de *A. diaperinus* en galpones

Los métodos usados para la desinfección de la plaga de *A. diaperinus* es mediante la aplicación periódica de métodos físicos y uso de insecticidas al realizar una limpieza de las camas en la producción de aves. Sin embargo, existen productos alternativos como “DARWIN 250” o “DARWIN 2500” que contiene nematodos del género *Steinernema* sp. que permiten la desinfección de *A. diaperinus* al infectarlos y matarlos mediante la aplicación de este producto por toda la cama en los galpones (Control Bío, 2022a). Sin embargo, sus desventajas ya fueron detalladas en la sec. 4.2.3. Asimismo, la misma empresa Control Bio promocionan “TENEDROP®” una trampa física para la captura de *A. diaperinus*, la cual se debe activar con insectos previamente capturados y colocados en el interior de la trampa (Control Bío, 2022b). Aunque, el diseño de la trampa física permita que los insectos queden atrapados en el interior de la trampa, la inserción de insectos hembra o machos, sin un estudio previo de la concentración y función de su composición feromonal, no garantiza el efecto atractivo de la trampa y por tanto la captura de *A. diaperinus* en los galpones. Por otro lado, se comercializa “CAPT 7” una trampa física que contiene en su interior un polvo atrayente que actúa como feromona de agregación, permitiendo la captura de adultos y larvas de *A. diaperinus* en los galpones (CAPT 7, 2016). Sin embargo, el diseño ovalado de la trampa (Figura 20) es incongruente con el tamaño de los adultos (entre 5–8 mm de largo y 2,5–4 mm de ancho). Sus orificios son de 1 cm de diámetro más grande que el tamaño del insecto. Por tanto, las desventajas que presenta su uso son: (i) los insectos podrían escapar fácilmente del interior, (ii) se puede desperdiciar el polvo atrayente ya que solo está esparcido en su interior y (iii) aun cuando los insectos queden atrapados, estos se pueden estresar debido al continuo movimiento de la trampa por el galpón. Por tanto, las herramientas químicas en su interior se pueden apantallar por las

señales de alarma que emitan los insectos atrapados, resultando en una trampa no apta en la captura de esta plaga.

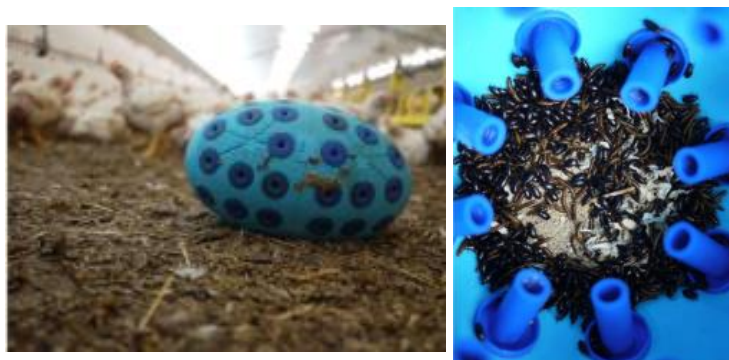


Figura 20. Trampa “CAPT 7” actuando como sistema de atracción para el control de *Alphitobius diaperinus* en granjas avícolas. Tomado de (CAPT 7, 2016).

4.4. Diseño de biotrapas avanzadas

De acuerdo al estudio bibliográfico realizado y evaluando las trampas físicas existentes en el mercado para plagas de *A. diaperinus* u otros coleópteros, se determinó que el diseño de la trampa física debe contar con (i) una abertura superior o inferior no mayor al tamaño del insecto (entre 5–8 mm de largo y 2,5–4 mm de ancho), (ii) permitir el ingreso del insecto mediante una superficie exterior rugosa, pero no permitir su salida usando una superficie interior lisa, (iii) un compartimiento interior que permita colocar un septo de caucho a usar como dispositivo emisor de las herramientas químicas y (iv) el material de la trampa física tiene que ser resistente, reutilizable, fácil de armar y desarmar, para la evaluación posterior de la validación de las trampas. Evaluando estas condiciones, se escogió la trampa “Xlure MST” disponible en el mercado por las características físicas que presenta y para facilitar su manufactura, ver Figura 21 (Hassan & Shakir, 2008; JF Oakes, 2022). Además, que se han estudiado su aplicación en plagas de grano como las especies de escarabajos *T. castaneum*, *T. confusum*, *Lasioderma serricorne*, *Trogoderma granarium*, *T. variable*, *Oryzaephilus mercator*, *O. surinamensis*, *Sitophilus granaries*, *S. oryzae* y *Stegobium paniceum* (Hassan & Al-zaidi 2008). En efecto, esta trampa permite la captura de un amplio espectro de insectos, y debido a su diseño, la base de la trampa, donde quedarán atrapados los insectos, está separado del cuerpo exterior de la trampa física por donde ingresarán los insectos,

lo que permite poder usarla para otras plagas de escarabajos incorporando el septo con las herramientas químicas a usar.

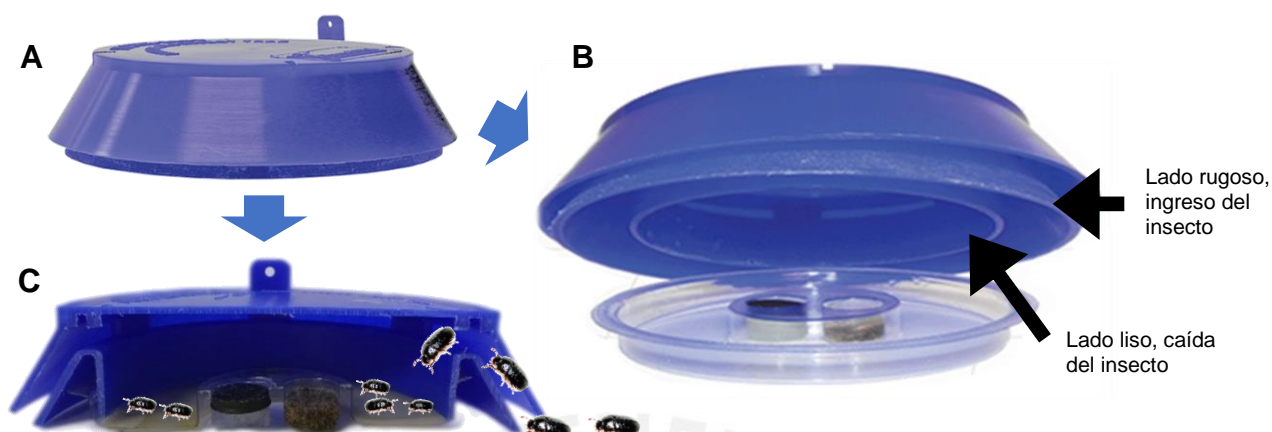


Figura 21. Imágenes de la trampa XLURE disponible en el mercado. (A) Parte superior, (B) base removible y (C) vista frontal de la trampa. Adaptado de JF Oakes (2022).

En el presente trabajo de tesis, las trampas físicas se diseñaron basándose en las características óptimas descritas anteriormente. Para ello, se usó la parte superior de la trampa física Xlure MST, las medidas se muestran en la Figura 22. En cada trampa se colocó, en la parte superior interna, un septo de caucho (8 mm, Sigma-Aldrich), el cual estaría impregnado posteriormente con herramientas químicas de largo alcance de adultos de *A. diaperinus*. Este septo se sujetó con una aguja de jeringa (14G x 2") por uno de los espacios superiores abiertos. En la base de la trampa se colocó una placa Petri de 13 cm de diámetro, el cual permitiría contener la captura de los insectos, ver Figura 23. La parte superior de la trampa física Xlure MST está diseñada de tal forma que mantiene un espacio de 5 mm entre dos compartimientos (rugoso y liso), lo suficiente para permitir que los insectos ingresen y queden atrapados en ella. Antes de la manufactura y validación de las biotrapas, las trampas físicas se probaron en el laboratorio para determinar si los adultos podrían escapar después de caer en ellas. Para ello, se colocaron 100 insectos dentro de una trampa física, la cual estaba ubicada dentro la cama de los adultos experimentados ($n = 3$). Después de 24 h, se contaron los insectos y ninguno había escapado.

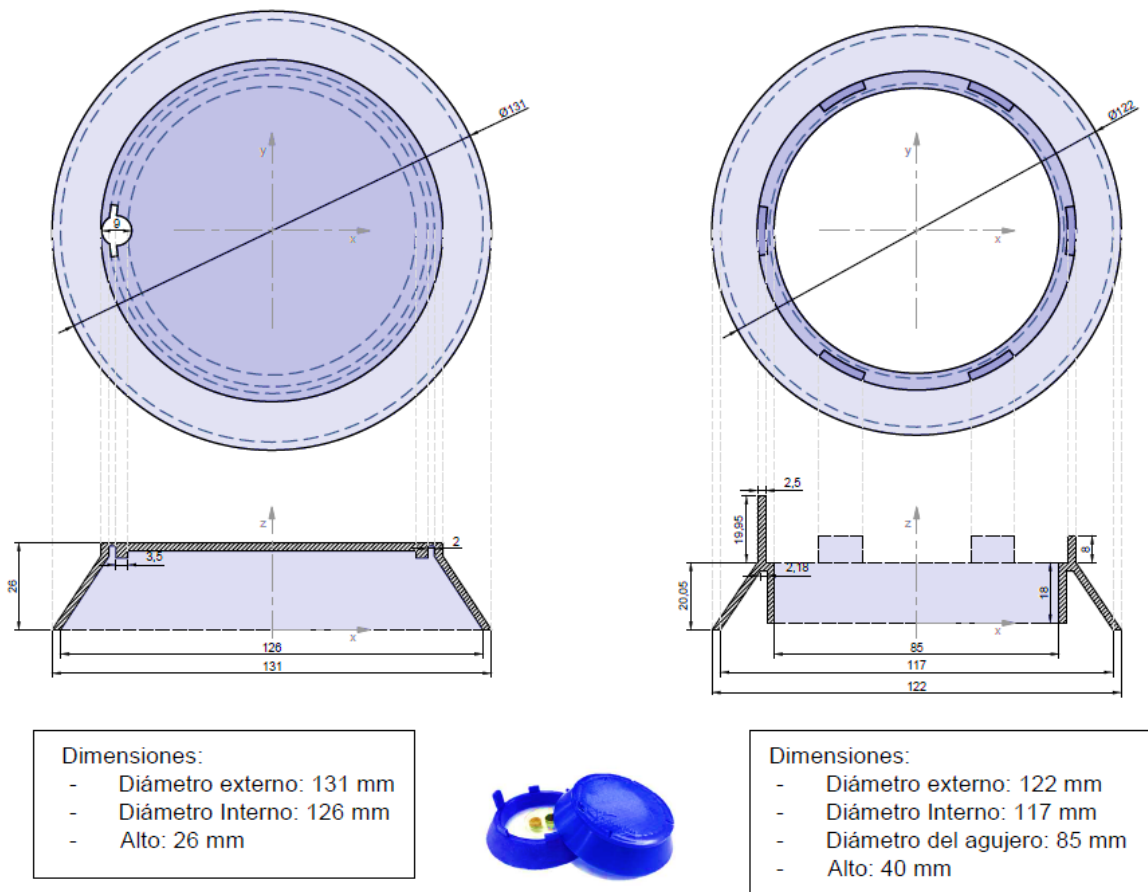


Figura 22. Dibujo mecánico de la trampa XLURE MST. Las medidas presentes están en mm.

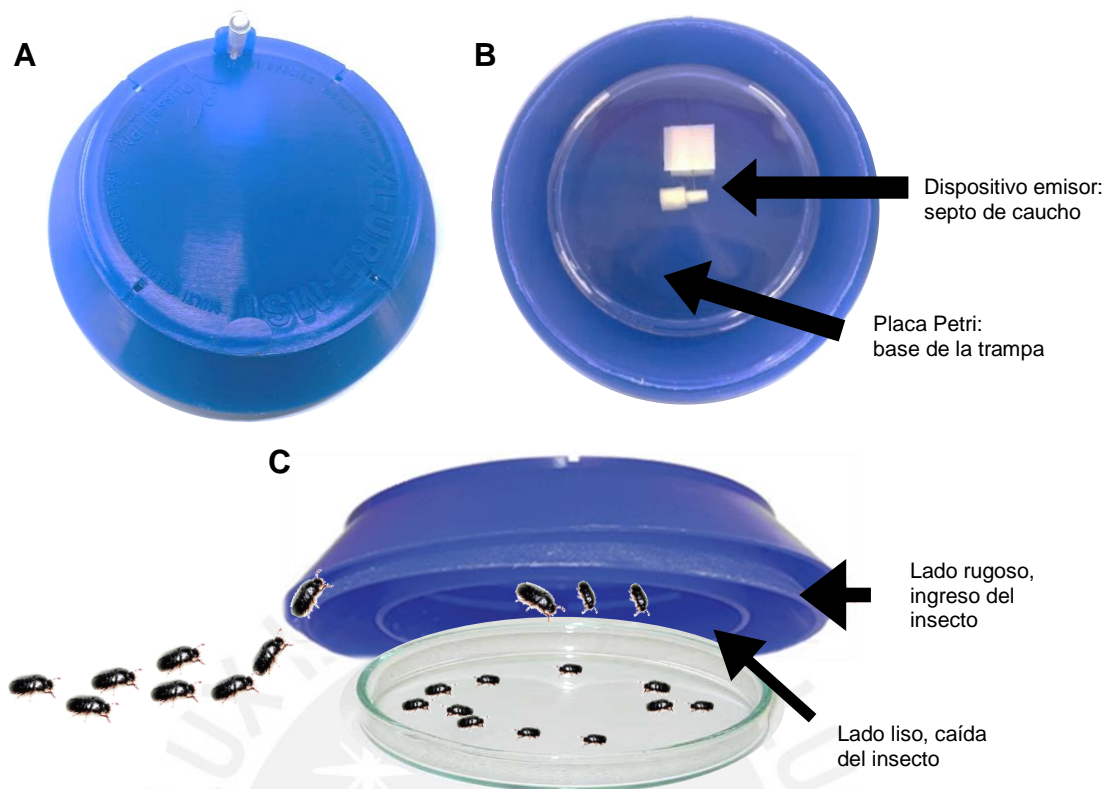


Figura 23. Diseño de la trampa física para la captura de *Alphitobius diaperinus*. (A) Vista superior e (B) inferior de la trampa física. (C) Esquema del ingreso y captura de la plaga.

5. Capítulo 3. Manufactura y validación en laboratorio de biotrapas avanzadas para el control de *Alphitobius diaperinus*

5.1. Introducción

Entre las plagas de insectos existentes en la Industria avícola, los escarabajos *A. diaperinus* son una de las plagas más importantes a nivel mundial (Adamski et al., 2019; Denux & Zagatti, 2010). Existen dos sistemas comúnmente usados en campo para el control de esta plaga, mediante la implementación de biotrapas usando semioquímicos para el control de plagas agrícolas. Las estrategias de atracción implementan herramientas químicas de atracción (por ejemplo, feromonas de agregación o sexuales) en el interior de trampas físicas, influenciando así la atracción de los adultos hacia las trampas y su posterior captura (Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2019, 2020; Singh & Johnson, 2012). Adicionalmente, existen otras estrategias que usan herramientas químicas repelentes (por ejemplo, feromonas de alarma), esto permite manipular la ubicación de los insectos alejándolos de zonas como los comederos de las aves, debido a que los estímulos repelentes causan un empuje de los insectos direccionándolos a otro rumbo. En algunas ocasiones estas estrategias se pueden combinar para maximizar la captura de las plagas (Bhattacharyya, 2017; Cook et al., 2007; Hassemer et al., 2018, 2019, 2020; Khan et al., 2010; Lindgren & Borden, 2011).

Aunque en los últimos años, se ha propuesto métodos biológicos alternativos al método químico mediante el uso de insecticidas para el control de la plaga de *A. diaperinus*, se ha demostrado que los métodos químicos alternativos, como son los semioquímicos, son los más eficientes para controlar la población de insectos. Debido a que la inserción de patógenos (hongos o nemátodos) en las granjas avícolas - métodos biológicos - puede ser contraproducente en mejorar la calidad sanitaria de estas (Alexandre et al., 2006; Alves et al., 2004; Alves et al., 2005; Hassemer et al., 2020; Rezende et al., 2009; Rohde et al., 2006). Por otro lado, la aplicación de semioquímicos como herramientas químicas para la fabricación de biotrapas ha demostrado ser una herramienta efectiva para controlar la población de insectos en el galpón. Sin embargo, su implementación necesita más estudios debido al comportamiento críptico de los insectos. Por ejemplo, los insectos adultos de una zona geográfica determinada pueden emitir diferentes señales químicas

dependiendo del tipo de dieta, las condiciones ambientales de crecimiento, entre otros factores (Bartelt et al., 2009; Cossé & Zilkowski, 2015; Crippen & Esquivel, 2012; Ferveur, 2005; Hassemer et al., 2016, 2019; Rumbos et al., 2019; Singh & Johnson, 2012; Yew & Chung, 2015), por lo que la transferencia de esta tecnología de una zona geográfica a otra puede ser poco factible.

El objetivo de este capítulo fue (i) evaluar el potencial de las señales químicas de largo alcance de adultos experimentados como herramientas químicas de atracción en biotampas avanzadas, además de (ii) verificar su uso en sistemas de atracción en laboratorio.

5.2. Metodología

5.2.1. Cría de insectos

Los escarabajos adultos experimentados de *A. diaperinus* colectados se mantuvieron a las mismas condiciones controladas de crecimiento (30 °C, 50% HR) como lo descrito en el Capítulo 1, sec. 3.2.1. Todos los ensayos descritos a continuación se realizaron bajo condiciones controladas (30 °C, 50% HR) y durante la actividad de apareamiento, ver Capítulo 1.

5.2.2. Colecta de herramientas químicas

Previo al uso de las trampas diseñadas se procedió a verificar si las señales químicas de largo alcance identificadas en el Capítulo 1 serían funcionales como herramientas atractivas que permitan la captura de adultos en las biotampas, debido a que se demostró que estas señales emitidas por cualquier adulto pueden ser atractivas para otros machos, independientemente de su sexo y experiencia sexual, a diferencia del atractivo femenino que puede depender de ambos factores.

Para ello, adultos experimentados de cada sexo fueron acondicionados en cámaras de vidrio por 4h. Pasado el tiempo de acondicionamiento, los volátiles fueron colectados por 3 min, activando la bomba eléctrica para impulsar el flujo de aire dentro de las cámaras a una velocidad constante de 0,3 L/min a través de filtros de carbón activado (malla 20–40, Sigma-Aldrich). Los volátiles (VOC) liberados de los adultos en las cámaras fueron atrapados en filtros

adsorbentes conteniendo una mixtura de 5 mg de Tenax TA (malla 60–80, Sigma-Aldrich) y 5 mg de Carbotrap B (malla 20–40, Sigma-Aldrich). Cada filtro se eluyó con 300 μ L de hexano en un vial de vidrio para remover los compuestos químicos que fueron adsorbidos. Luego, los volátiles recuperados se concentraron a 20 μ L usando una corriente suave de nitrógeno y se almacenaron a -20 °C para su posterior ensayo. Las muestras control se obtuvieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin colocar adultos en el interior de las cámaras de vidrio.

Una vez confirmado la efectividad del extracto químico que contiene las señales químicas de largo alcance de *A. diaperinus* (ver sec. 5.2.3.), se utilizó este mismo extracto para la manufactura de las biotrapas, siguiendo el diseño presentado en el Capítulo 2, sec. 4.4. Para ello, veinte, cincuenta y cien adultos experimentados de cada sexo fueron acondicionados en cámaras de vidrio por 4 h. Las muestras C se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Pasado el tiempo de acondicionamiento, los volátiles fueron colectados, concentrados y almacenados para su posterior ensayo usando la misma metodología descrita anteriormente.

5.2.3. Verificación de herramientas químicas mediante ensayos olfatométricos

Para verificar la actividad atrayente del extracto químico, se usó un olfatómetro de tubo en Y (tubo de vidrio de 8 mm de diámetro, 10 cm de longitud del tronco seguido de dos brazos de 5 cm de longitud) para probar el atractivo de las señales químicas emitidas por machos y hembras experimentados. Cada brazo de tubo en Y se conectó a un tubo de vidrio (1 cm de diámetro y 15 cm de longitud). Uno de los tubos de vidrio contenía uno de los siguientes tratamientos: (i) VOC de 20 Fexp o (ii) VOC de 20 Mexp; mientras que el otro tubo quedó vacío para ser utilizado como control. Se colocó un individuo perteneciente a una de las cuatro categorías (Fv, Fexp, Mv, Mexp) dentro del tronco del olfatómetro. Luego se activó la bomba eléctrica para impulsar el flujo de aire dentro del olfatómetro a una velocidad constante de 0,3 L/min a través de filtros de carbón activado (malla 20–40,

Sigma-Aldrich). La respuesta se registró por un tiempo de 5 minutos y se consideró finalizada cuando el escarabajo ingresó totalmente al brazo de tratamiento o control. Se realizaron al menos 30 repeticiones por cada tratamiento. Después de cada prueba, se giró 180° todo el olfatómetro para evitar efectos de iluminación y posición. Todos los escarabajos probados se usaron solo una vez, mientras que los escarabajos dentro de las cámaras se les permitió aclimatarse durante 1 h antes de las pruebas para evitar la producción de posibles compuestos poco atractivos (por ejemplo, feromonas de disuasión o alarma). Todos los ensayos se realizaron en el pico de la actividad de apareamiento de los escarabajos en función su ritmo circadiano. Las respuestas de los adultos de *A. diaperinus* frente a los tratamientos se analizaron mediante prueba binomial (50 % de probabilidad de seleccionar cada brazo), realizadas con el paquete *stats* del software R, versión 3.6.1 (R Core Team, 2017).

5.2.4. Validación de las biotrampas avanzadas

Previo a cada experimento, se realizó un censo para determinar las tasas de hembras y machos adultos dentro de la población de insectos experimentados. Para esto se colectaron 5 muestras de 20 adultos, y se calculó la distribución de hembras y machos en las camas. Las poblaciones censadas de insectos adultos experimentados (F_{exp} y M_{exp}) se aislaron en placas Petri 24 h previo al ensayo. Es preciso mencionar, que en la manufactura de las biotrampas no se enfocó en un sistema de atracción con herramientas químicas de adultos vírgenes, porque la condición sexual del adulto en campo rápidamente trasciende. Por tanto, se consideró que no tendría éxito esas biotrampas a no ser que se coloquen cercanas a los puntos de reproducción de estos insectos en campo.

Como se describió en el Capítulo 2, sec. 4.2.1., los sistemas de atracción “pull” consisten en utilizar semioquímicos de atracción para que los insectos ingresen a una biotrampa de la cual no puedan salir. Primero se realizaron experimentos en laboratorio para evaluar la eficacia de la biotrampa para atraer poblaciones de adultos experimentados de *A. diaperinus*. Para ello, los ensayos se realizaron en cajas de plástico (74 x 35 x 20 cm) cubiertas con

telas de polipropileno (malla de 2 mm) para permitir el intercambio de aire, las cuales se mantuvieron en una cámara de clima controlado (Memmert HPP750, Memmert GmbH, Schwabach, Alemania) bajo condiciones controladas (fotofase, 30 °C, 50% HR), para evitar que variables adicionales como temperatura y humedad afecten la interpretación de los resultados. En esquinas opuestas del interior de las cajas se colocaron una trampa control (C) y una biotrampa, ambas con septa de caucho (8 mm, Sigma-Aldrich) en su interior, armadas como lo descrito en el Capítulo 2, sec. 4.2.1. La septa en la trampa control contenía la muestra control obtenida como lo descrito en la sec. 5.2.2., mientras que la septa en la biotrampa contenía uno de los siguientes tratamientos obtenidos como lo descrito en la sec. 5.2.2.: (i) VOC–0,1 EQ (Fexp), (ii) VOC–0,1 EQ (Mexp), (iii) VOC–12 EQ (Fexp) o (iv) VOC–12 EQ (Mexp). El número de equivalentes (EQ) de VOC de insectos colocados en el septo se calculó comparado los volátiles extraídos con los volátiles que emiten los insectos en la caja de plástico, ver Tabla 7. En cada ensayo, la posición de las biotrapas se cambió de manera aleatoria a una de las cuatro esquinas de la caja para evitar efectos de iluminación y posición. Después de impregnar los septos con uno de los tratamientos, se evaporó el solvente aproximadamente por 1 min usando una corriente suave de nitrógeno, ver Figura 24.

Tabla 7. Parámetros usados en la colecta de herramientas químicas y validación de biotrapas

Número de insectos usados en la extracción de volátiles (VOC)	60	100	60
t _{extracción} (h) de VOC	4	4	4
Número de insectos en la caja de plástico	100	100	20
t _{ensayo} (h) de validación de las biotrapas	24	1	1
Número de equivalentes (EQ)	0,1 EQ	4 EQ	12 EQ
Código de la muestra	VOC–0,1 EQ	VOC–4 EQ	VOC–12 EQ

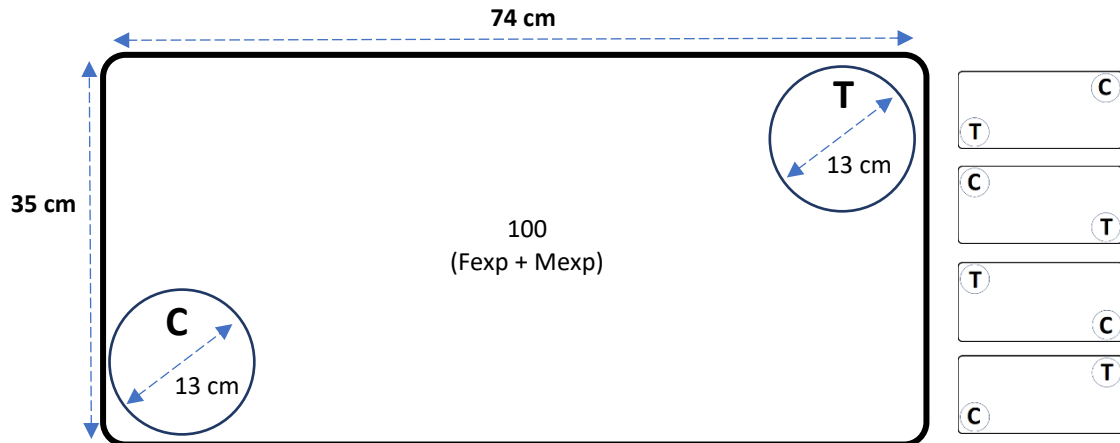


Figura 24. Diseño de la distribución de biotampas en sistemas de atracción “pull” en la caja de plástico y rotación de las posiciones de las biotampas. C: trampa control. T: biotrapa con VOC–0,1 EQ (Fexp); VOC–0,1 EQ (Mexp); VOC–12 EQ (Fexp); VOC–12 EQ (Mexp); VOC–4 EQ (Mexp); VOC– [0,1 EQ (Fexp) + 0,1 EQ (Mexp)] o VOC–[12 EQ (Fexp) + 12 EQ (Mexp)]. Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

El experimento inició al colocar en el centro de la caja de plástico 100 adultos experimentados de *A. diaperinus* y finalizó 1h después. Finalizado el ensayo, se contabilizó y sexaron los insectos atrapados en las biotampas, ver Figura 25. Se realizaron al menos 6 repeticiones por cada tratamiento. Todos los escarabajos probados se usaron solo una vez. Todos los ensayos se realizaron en el pico de la actividad de apareamiento de los escarabajos, de acuerdo al Capítulo 1, sec. 3.2.1. Finalmente, para facilitar la comparación entre los diferentes experimentos, el número de adultos atrapados en cada trampa se estandarizó utilizando una escala de porcentaje (es decir, el número total de adultos atrapados en ambas trampas se transformó en 100%). Las diferencias en el porcentaje de adultos atrapados en cada trampa, entre todos los tratamientos probados, se compararon realizando pruebas Kruskal-Wallis no paramétricas. Además, se llevaron a cabo comparaciones por pares mediante pruebas de Mann-Whitney-U seguidas de correcciones de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron utilizando los paquetes *stats* (R Core Team, 2017) en R.



Figura 25. Adultos experimentados atrapados en las biotrapas después de los ensayos de su validación. Vista inferior (A, sin placa Petri; B, con Placa Petri en la base) y (C) superior de la biotrampa.

Posteriormente, las concentraciones de las herramientas químicas a utilizar se optimizaron de manera individual. Para ello se realizaron experimentos siguiendo la conformación de la Figura 24, colocando dentro de las biotrapas una septa con VOC-4 EQ (Mexp), VOC-[0,1 EQ (Fexp) + 0,1 EQ (Mexp)] o VOC-[12 EQ (Fexp) + 12 EQ (Mexp)]. Estos experimentos finalizaron 1 h después de iniciado el ensayo. Luego se contabilizó y sexaron los insectos atrapados de manera similar a lo realizado anteriormente.

Subsecuentemente, se modificó el experimento anterior para evaluar el posible efecto sinérgico de tener adicionalmente una señal de repulsión dentro de la caja. Para ello se realizaron experimentos siguiendo la conformación con 2 biotrapas, ver Figura 26, usando como atractor dentro de las biotrapas

“T” una septa con VOC–4 EQ (Mexp) y como repelente dentro de las biotrampas “R” una septa con VOC–[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)].

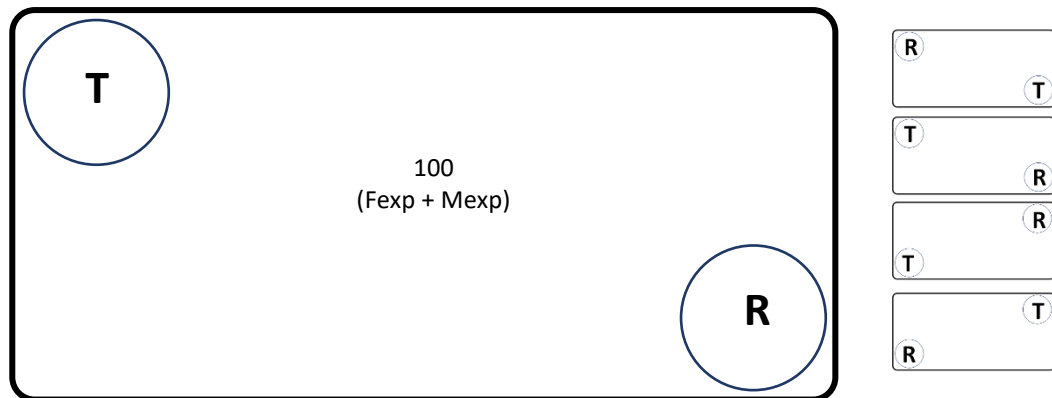


Figura 26. Diseño con dos biotrampas, una conformación alternativa al sistema de atracción “pull”. T: biotrampa con VOC–4 EQ (Mexp). R: biotrampa con VOC–[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)]. Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

Finalmente, y con el fin de replicar un modelo similar a los galpones, donde los insectos se puedan esconder en muchos lugares, se usó un sistema con 4 trampas, ver Figura 27, usando como atractor dentro de las biotrampas “T” una septa con VOC–4 EQ (Mexp) y como repelente dentro de las biotrampas “R” una septa con VOC–[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)]. Estos experimentos finalizaron 1 h después de iniciado el ensayo. Luego se contabilizó y sexaron los insectos atrapados en las biotrampas de manera similar a lo realizado anteriormente.

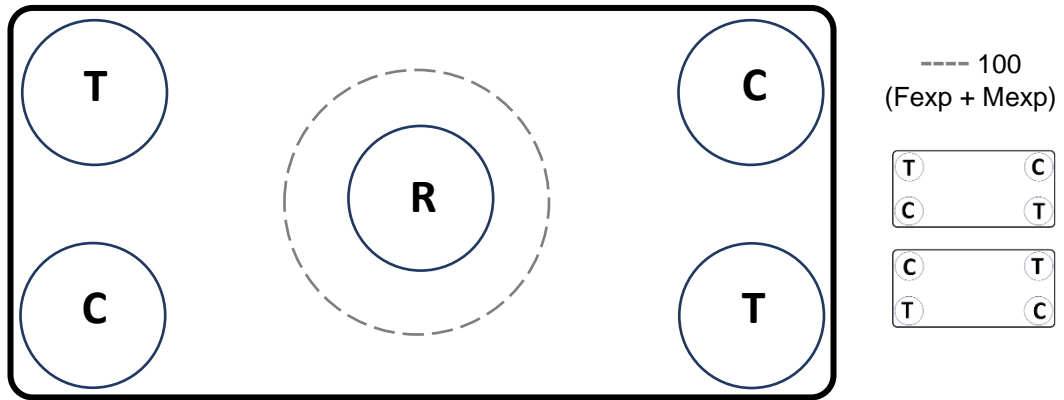


Figura 27. Diseño de simulación de un galpón con diversas trampas y posibles lugares donde los insectos pueden esconderse. C: trampa control. T: biotrapa con VOC-4 EQ (Mexp). R: biotrapa con VOC-[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)]. Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

5.3. Resultados

5.3.1. Evaluación de herramientas químicas

Los resultados de la evaluación de las herramientas químicas a emplear en las biotrampas mostraron que Fv y Fexp no se sintieron atraídas por las señales olfativas emitidas por machos y hembras experimentados sobre el control (para todos $p > 0,05$), ver Figura 28. Por otro lado, Mv se sintieron significativamente atraídos por las señales químicas de largo alcance producidos por Fexp sobre el control ($p < 0,05$), ver Figura 28. Sin embargo, Mv no mostró ninguna preferencia cuando se probó los VOC de Mexp contra la trampa control ($p > 0,05$). Asimismo, Mexp se sintieron significativamente atraídos por los VOC producidos por Mexp sobre el control ($p < 0,05$), pero no por Fexp contra el control ($p > 0,05$), ver Figura 28.

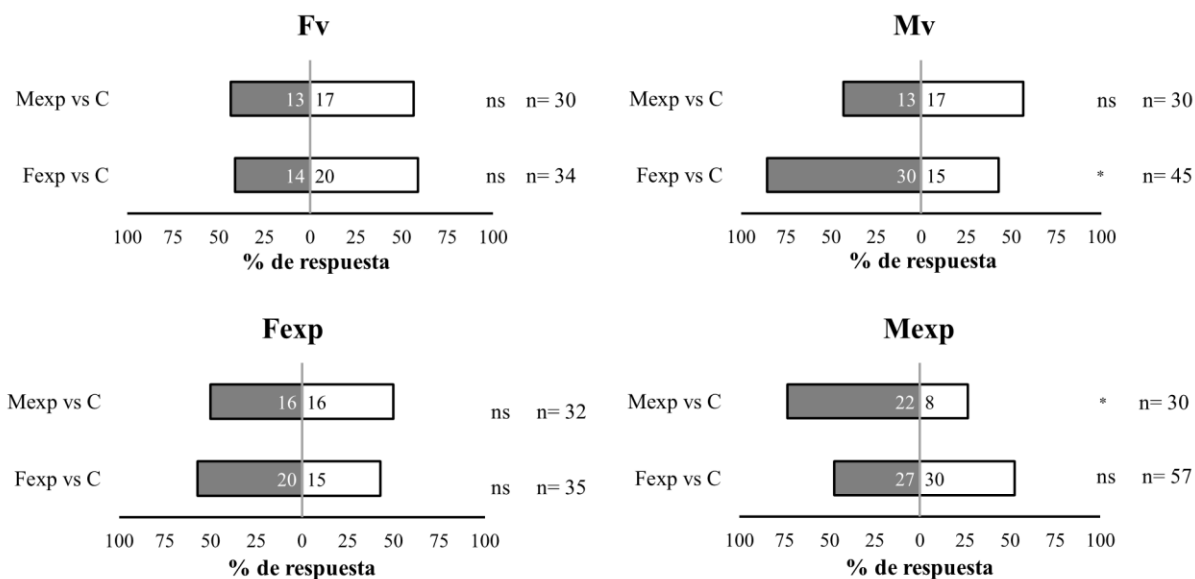


Figura 28. Atracción de los adultos de *Alphetobius diaperinus* hacia las señales químicas de larga distancia obtenidas de otros adultos, clasificados según su sexo y experiencia sexual. Se muestran diferencias significativas (* $p < 0,05$) y no significativas (ns $p > 0,05$) según la prueba binomial exacta. C, muestra control. Fexp, hembras experimentadas; Fv, hembras vírgenes; Mexp, machos experimentados, Mv, machos vírgenes.

5.3.2. Validación de biotrapas avanzadas

Las herramientas químicas que se emplearon en las biotrapas fueron los volátiles producidos por Mexp y Fexp para atraer un número significativo de insectos. Esta elección se determinó en función de los resultados obtenidos en la sección anterior y la experiencia sexual de los adultos a evaluar en los ensayos. En el primer ensayo usando el sistema de atracción “pull”, no se encontró diferencias significativas entre el número de insectos que quedan atrapados en la biotrampa con VOC–0,1 EQ (Mexp) frente a la trampa control ($p > 0,05$; $n=12$; Figura 29). Sin embargo, si se aumenta la concentración a VOC–12 EQ (Mexp), se encontró mayor número de adultos experimentados en las biotrapas que en la trampa control ($p < 0,05$; $n=12$; Figura 29). Por otro lado, al evaluar biotrapas con VOC–0,1 EQ (Fexp) o VOC–12 EQ (Fexp), no se encontró diferencias entre el número de insectos que caen en cualquiera de esas biotrapas a diferentes concentraciones frente a la trampa control (para todos $p > 0,05$; $n=6$; Figura 29), confirmando que los volátiles producidos

por Fexp no presentan ningún efecto atrayente sobre la población de estudio, ver Figura 29.

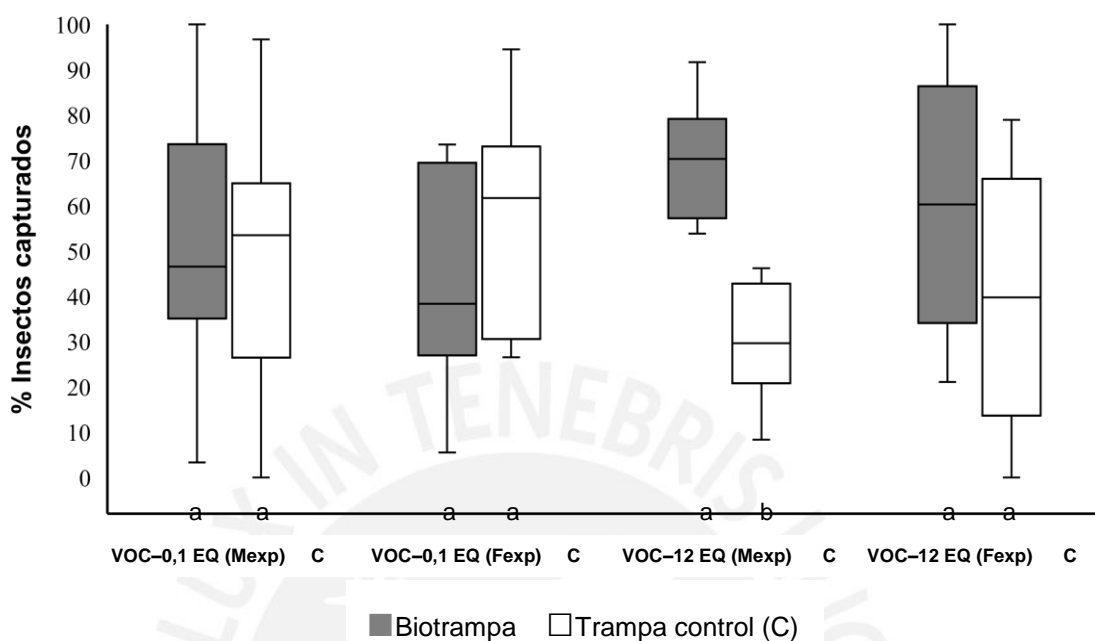


Figura 29. Respuestas atractivas de adultos experimentados de *Alphitobius diaperinus* hacia biotrampas en sistemas de atracción “pull”. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

En consecuencia, se eligió herramientas químicas funcionales de atracción a los VOC de Mexp. Sin embargo, se decidió determinar la mínima concentración necesaria de VOC de Mexp para atraer un número significativo de insectos, encontrándose un mayor número de adultos experimentados en biotrampas con VOC-4 EQ (Mexp) que en trampas control ($p < 0,05$; $n=6$; T2 vs C, ver Figura 30). Por ello, se eligió herramientas químicas de atracción a los VOC-4 EQ (Mexp).

Adicionalmente, al evaluar la respuesta de los adultos hacia biotrampas con el mix de VOC de Fexp y Mexp se encontró que los adultos experimentados mostraban una respuesta no atractiva hacia las biotrampas con VOC-[0,1 EQ (Fexp) + 0,1 EQ (Mexp)] o VOC-[12 EQ (Fexp) + 12 EQ (Mexp)]

en comparación con las trampas control ($p < 0,05$; $n = 6$; Figura 30). Por ello, al verificar que incrementar la concentración no afecta el sistema no atractivo ni mejora el número de insectos repelidos, se determinó como herramientas químicas de repulsión a los VOC-[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)], debido a que es la misma concentración usada en las herramientas de atracción.

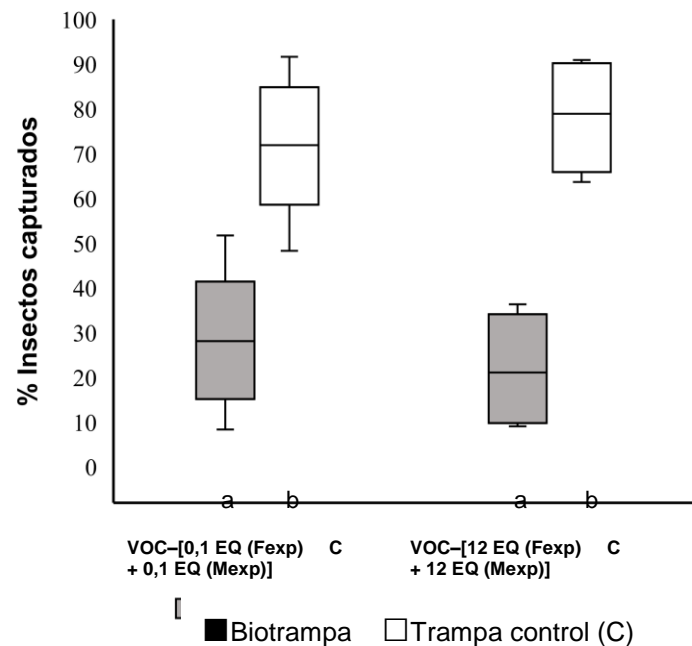
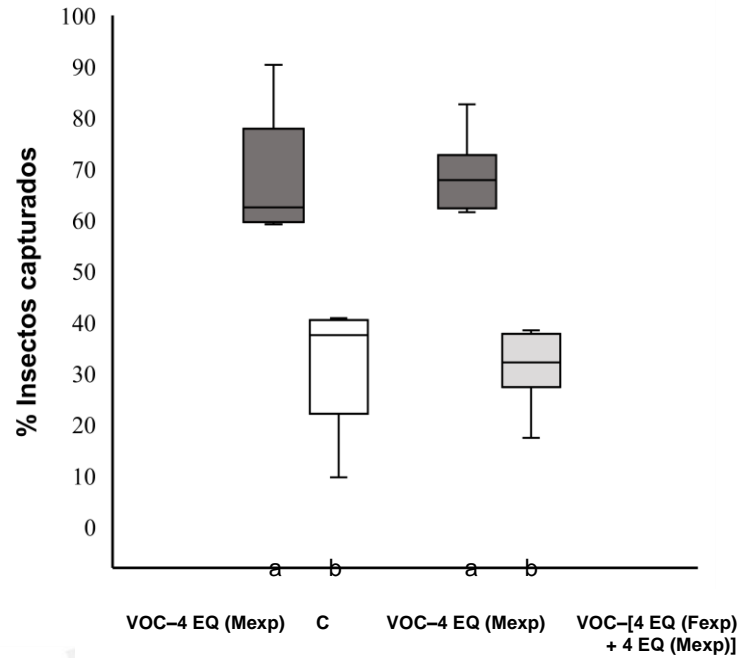


Figura 30. Respuestas no atractivas de adultos experimentados de *Alphitobius diaperinus* hacia biotrampas. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

En base a las herramientas químicas de atracción y repulsión determinadas, se diseñó nuevas conformaciones de biotrampas (Figura 26 y 27). Los resultados presentados en la Figura 31 mostraron que el uso del VOC-[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)] como repelente permite disminuir la variación entre los diferentes ensayos. Sin embargo, no hay una mejora significativa en la captura de insectos en esta conformación frente a la anterior, ver Figura 31.



Biotrampa con herramienta de ■ atracción y de ■ repulsión □ Trampa control (C)

Figura 31. Respuestas atractivas de adultos experimentados de *Alphitobius diaperinus* hacia biotrapas en sistemas de atracción. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Fexp, hembras experimentadas; Mexp, machos experimentados.

Inesperadamente, el agregar una biotrampa adicional en el área de medición (Figura 27) no mejora la eficiencia total de insectos atrapados. Específicamente, cuando se añade una biotrampa con VOC-[4 EQ (Fexp) + 4 EQ (Mexp)] en el medio de la caja no existe diferencia en el número de insectos atrapados al comparar el número de insectos atrapados en las biotrapas con VOC-4 EQ Mexp (con herramientas atractores) frente a las trampas control ($p > 0,05$; $n=3$; Figura 32).

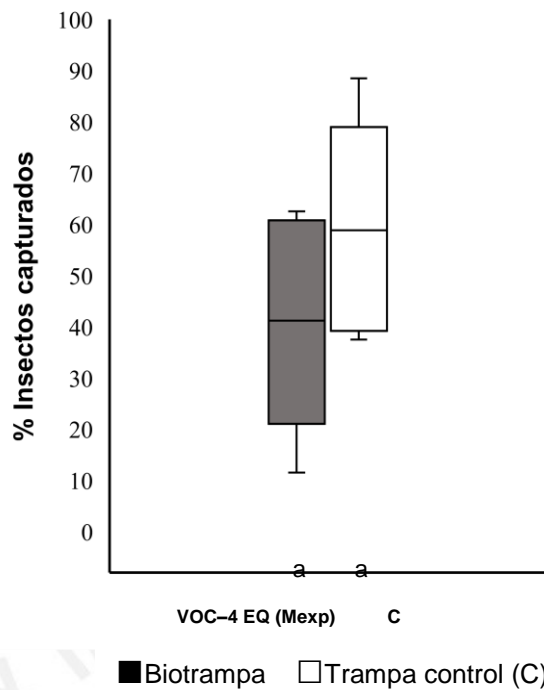


Figura 32. Respuestas atractivas de adultos experimentados de *Alphitobius diaperinus* hacia biotrampas en simulación de un galpón con diversas trampas. Letras diferentes debajo de las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Mexp, machos experimentados.

5.4. Discusiones

En general, las validaciones de las biotrampas en laboratorio fueron una etapa relevante de validaciones tecnológicas, indicando el potencial uso de las señales químicas de largo alcance de machos experimentados para mejorar el control biológico por atracción de adultos de *A. diaperinus*.

Específicamente, los resultados obtenidos proporcionan evidencia de un comportamiento atractivo de los VOC de Mexp sobre ambos sexos de adultos experimentados de *A. diaperinus*. Esto indica que pueden ser usados como herramientas químicas atractivas en la manufactura de biotrampas avanzadas que permitan la captura de estos adultos en ensayos en laboratorio. Asimismo, se evidenció un comportamiento no atractivo de los VOC de Fexp y Mexp sobre adultos de *A. diaperinus*, permitiendo ejecutar en futuras investigaciones otras estrategias de conformación de biotrampas en las validaciones en laboratorio.

Manufactura de biotrapas de atracción

Con respecto a las validaciones en laboratorio de las biotrapas de atracción, demostramos que las herramientas químicas de los machos experimentados son útiles como señales atractivas para adultos de ambos sexos de *A. diaperinus*. En efecto, la función atractiva de estas señales químicas puede deberse a la mezcla de los compuestos conductualmente activos identificados en el Capítulo 1. Entre ellos, las señales químicas de largo y corto alcance como alcanos, ácidos grasos y terpeno pueden estar actuando como componentes atractivos individuales o en sinergia para atraer ambos sexos. Estos resultados son similares a lo reportado en ensayos en campo usando como herramientas químicas a los VOC de machos vírgenes de *A. diaperinus* por (Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2019; Singh & Johnson, 2012), los cuales demostraron que los Mv poseen feromonas de agregación (los componentes atractivos depende de la ubicación geográfica de adultos de *A. diaperinus* como (*R*)-(+)-limoneno, (*E*)- β -ocimeno, (*R*)-(+)-dauceno, 2-nonanona, (*S*)-(+)-linalol y (*E,E*)- α -farnesene) útiles para atraer adultos vírgenes o experimentados en campo. Comparando las feromonas de agregación reportadas (Cossé & Zilkowski, 2015; Hassemer et al., 2019; Singh & Johnson, 2012) y las señales químicas electrofisiológicamente activas identificadas (Capítulo 1) sugerimos que al menos el limoneno, identificado en adultos de *A. diaperinus*, desempeña la función de agregación en estos insectos.

Manufactura de biotrapas de repulsión

Con respecto a las validaciones en laboratorio de las biotrapas de repulsión, demostramos que la mezcla de las herramientas químicas de machos y hembras experimentados son útiles como señales no atractivas para adultos de ambos sexos de *A. diaperinus*, por tanto, estas señales actúan probablemente como repelentes. Efectivamente, la conducta repelente de los adultos puede deberse a la producción de benzoquinonas electrofisiológicamente activas identificadas en adultos de ambos sexos (ver Capítulo 1). Entre estas señales químicas de largo y corto alcance se encuentran 1,4-benzoquinona, 2-metil-1,4-benzoquinona y 2-etil-1,4-benzoquinona, previamente reportadas como señales químicas de defensa (feromonas de alarma, Hassemer et al. (2015), (2016); Tseng et al. (1971)) para ambos sexos. Además, los resultados obtenidos en la validación de biotrapas

repelentes son similares a los obtenidos por Hassemer et al. (2019) en el cual evaluó exitosamente el uso de estas tres benzoquinonas como herramientas químicas repelentes insertadas en biotrapas de repulsión en ensayos en laboratorio y campo. Sin embargo, al existir otros compuestos electrofisiológicamente activos detectados en estos insectos (ver Capítulo 1), se sugiere realizar ensayos para confirmar y evaluar las funciones biológicas de estas señales químicas.

Evaluación de diferentes configuraciones de biotrapas usando herramientas químicas de atracción y repulsión

Los resultados demuestran que incorporar biotrapas con herramientas de repulsión no incrementan la eficiencia de captura con respecto a la conformación inicial de atracción; a pesar de que estas pueden reducir la variabilidad del sistema. Esto demuestra que su efecto sobre los insectos es difícil de predecir.

Este aspecto se mostró con mayor claridad cuando se incorporan más trampas en la zona de medición. Aunque se ha demostrado que en los sistemas “push-pull”, las biotrapas “push” con feromonas de alarma son útiles para direccionar al insecto hacia las biotrapas “pull” con feromonas de agregación, en este caso las señales de alarma sobresaturan a los insectos que buscan un espacio donde esconderse. Esto se puede explicar debido a la competencia feromonal que ocurre en la conformación diseñada, es decir, competencia entre la liberación natural de las señales químicas de los adultos en las cajas con respecto a las herramientas químicas de las biotrapas de atracción y repulsión (p. ej., para el control de *A. diaperinus* en campo Hassemer et al., 2019). En consiguiente, se sospecha que (i) las trampas de atracción pierden su eficacia debido a la competencia de señales químicas, (ii) las señales repelentes son muy intensas y generan un comportamiento conductual críptico en los adultos, (iii) la conformación de la distancia entre las biotrapas de atracción y repulsión son muy cercanas o (iv) las señales de ambos sexos tienen señales atrayentes y repelentes, lo cual no genera una acción completamente repelente en los adultos. Por lo tanto, se recomienda estudios posteriores en campo para mejorar la distribución de estas biotrapas estudiando los siguientes parámetros: (i) distancia de las biotrapas de atracción y repulsión en las conformaciones evaluadas en laboratorio y (ii) tasa de liberación controlada de las herramientas químicas atrayentes y repelentes en los septos.

6. Conclusiones generales

El presente trabajo de tesis muestra la manufactura de biotrapas avanzadas para la captura de adultos de *Alphitobius diaperinus* en ensayos validados a nivel de laboratorio, usando como herramientas químicas las señales olfativas de machos experimentados de la misma especie.

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados durante esta investigación doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

Capítulo 1: Estudio de señales olfativas

- i. Esta investigación muestra por primera vez una comprensión integral de la ecología química y de comportamiento en adultos de *A. diaperinus* en base a dos factores, sexo y experiencia sexual, lo cual permite desarrollar una estrategia de control efectiva al desarrollar biotrapas avanzadas utilizando las señales de largo alcance de machos como herramientas químicas para el control de *A. diaperinus*.
- ii. Las señales químicas de largo alcance emitidas por machos o hembras experimentadas se proponen como señales específicas por sexo, mientras que las que emiten ambos sexos son señales generalizadas para adultos. Además, las señales químicas de corto alcance están relacionadas a su experiencia sexual.
- iii. Teniendo en cuenta las respuestas conductuales en el comportamiento de apareamiento, estas se ven afectadas debido al sexo y la experiencia sexual de los adultos, demostrando que la transformación de la experiencia sexual lleva a modificar la respuesta de apareamiento de los adultos a señales químicas de corto alcance.
- iv. Como se ha podido observar, existen señales de corto alcance que son electrofisiológicamente activas para la antena de los machos, además que su función biológica se puede proponer en base a la información publicada para adultos de *A. diaperinus* u otros coleópteros de la familia de Tenebrionidae.

Capítulo 2. Diseño de trampas avanzadas

- i. Se identificó los parámetros físicos para el desarrollo de biotrapas como (a) tamaño de abertura de la trampa para el ingreso de los insectos, (b) tipo de superficie interior y exterior de la trampa, (c) compartimiento interno para colocar

el señuelo químico y (d) tipo de material de la trampa física y del dispositivo emisor de las señales químicas.

- v. Evaluando los diferentes parámetros físicos, métodos químicos de control usando semioquímicos y el aspecto ecológico de esta plaga se propuso el diseño de biotrapas, el cual estuvo compuesto de una trampa física Xlure MST con dimensiones externas de 131 mm de diámetro y 26 mm de alto, con un espacio de abertura de 5 mm para el ingreso de los insectos, con dos compartimientos de superficie interior lisa y exterior rugosa y una septa de caucho de 8 mm como dispositivo emisor de las herramientas químicas.

Capítulo 3. Manufactura y validación en laboratorio de biotrapas avanzadas

- i. Considerando que las señales químicas de largo alcance podrían ser aplicables como herramientas químicas en la manufactura de biotrapas, se logró verificar su aplicación mediante ensayos olfatométricos, en los cuales adultos de *A. diaperinus* mostraron una atracción hacia las señales químicas de largo alcance de machos experimentados, indicando su potencial uso como herramientas químicas.
- ii. Finalmente, en función al diseño de biotrapas avanzadas y las diversas estrategias de control para plagas se optó por la conformación de sistemas de atracción, validando en laboratorio la manufactura de biotrapas avanzadas con señales químicas atractivas que permite la reducción de la población de hembras y machos experimentados de *A. diaperinus*.

Perspectivas futuras

- i. Se sugiere que los próximos estudios relacionados con el comportamiento de *A. diaperinus* podrían abordar la evaluación de las funciones biológicas de las señales químicas electrofisiológicamente reportadas para identificar y confirmar las funciones que presenta.
- ii. Adicionalmente, se sugiere optimizar las proporciones de las señales químicas de corto alcance, largo alcance o combinaciones de ellas empleadas en las biotrapas tomando en cuenta la estrategia de control a emplear y los factores ambientales en campo como el fotoperiodo, humedad, temperatura, entre otros, para obtener una formulación de herramientas químicas que permita la captura de esta plaga en campo.

- iii. Se sugiere que las próximas investigaciones relacionadas a la manufactura de la biotrampa y estrategia de control contemplen (a) la optimización del diseño de la biotrampa para evaluar tasas de saturación de las señales químicas en la trampa, (b) optimizar el diseño de la conformación de las biotrapas en el sistema de atracción o atracción y repulsión evaluadas en laboratorio para luego reproducirlos en campo y (c) evaluar la tasa de liberación controlada de las herramientas químicas atraentes y repelentes en los septos.
- iv. Se necesitan más estudios para comprender completamente la función de las señales químicas en el atractivo y la mejora de las respuestas de apareamiento de machos y hembras de *A. diaperinus*.



7. Referencias bibliográficas

- Acevedo, F. E. (2020). Ecología química de interacciones entre plantas, insectos y controladores naturales de plagas herbívoras. In P. Benavides Machado & C. E. Góngora (Eds.), *El Control Natural de Insectos en el Ecosistema Cafetero Colombiano* (pp. 106–141). Cenicafé.
- Adamski, Z., Bufo, S. A., Chowański, S., Falabella, P., Lubawy, J., Marciniak, P., Pacholska-Bogalska, J., Salvia, R., Scrano, L., Słocińska, M., Spochacz, M., Szymczak, M., Urbański, A., Walkowiak-Nowicka, K., & Rosiński, G. (2019). Beetles as model organisms in physiological, biomedical and environmental studies - A review. *Frontiers in Physiology*, *10*, 319.
- Agabou, A., & Alloui, N. (2010). Importance of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) as a reservoir for pathogenic bacteria in Algerian broiler houses. *Veterinary World*, *3*(2), 71–73.
- Akinyemi, A. O., & Kirk, W. D. J. (2019). Experienced males recognise and avoid mating with non-virgin females in the western flower thrips. *PLoS ONE*, *14*(10), e0224115.
- Alencar, R. V. (2015). *Associação de pós vegetais e Bacillus thuringiensis para o controle de Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. [Tesis de maestría], Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Alexandre, T. M., Alves, L. F. A., Neves, P. M. O. J., & Alves, S. B. (2006). Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, *35*(1), 75–82.
- Alvarez Costa, A. (2019). *Caracterización del comportamiento de Aedes aegypti y Anopheles pseudopunctipennis frente a estímulos naturales y sintéticos para el desarrollo de estrategias de control de bajo impacto ambiental*. [Tesis doctoral], Universidad de Buenos Aires.
- Alves, L. F. A., Alves, V. S., Bressan, D. F., Neves, P. M. O. J., & Alves, S. B. (2004). Natural occurrence of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. on adults of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in poultry houses in Cascavel, PR, Brazil. *Neotropical Entomology*, *33*(6), 793–795.
- Alves, L. F. A., Rohde, C., & Alves, E. V. S. (2005). Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *MG Neotropical Entomology*, *34*(1), 139–141.
- Alves, V. S., de O Neves, P. M. J., Alves, L. F. A., Alcides, M., & Holz, N. (2012). Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. *Revista Colombiana de Entomología*, *38*(1), 76–80.

- Arena, J. S., Omarini, A. B., Zunino, M. P., Peschiutta, M. L., Defagó, M. T., & Zygadlo, J. A. (2018). Essential oils from *Dysphania ambrosioides* and *Tagetes minuta* enhance the toxicity of a conventional insecticide against *Alphitobius diaperinus*. *Industrial Crops and Products*, *122*, 190–194.
- Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., & Mazomenos, B. E. (2009). Effect of trap type, trap color, trapping location, and pheromone dispenser on captures of male *Palpita unionalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, *97*(2), 321–329.
- Atterholt, C. A., Delwiche, M. J., Rice, R. E., & Krochta, J. M. (1999). Controlled release of insect sex pheromones from paraffin wax and emulsions. *Journal of Controlled Release*, *57*(3), 233–247.
- Attygalle, A. B., Blankespoor, C. L., Meinwald, J., & Eisner, T. (1991). Defensive secretion of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Chemical Ecology*, *17*(4), 805–809.
- Attygalle, A. B., Xu, S., Moore, W., McManus, R., Gill, A., & Will, K. (2020). Biosynthetic origin of benzoquinones in the explosive discharge of the bombardier beetle *Brachinus elongatulus*. *Science of Nature*, *107*(26).
- Bartelt, R. J., Zilkowski, B. W., Cossé, A. A., Steelman, C. D., & Singh, N. (2009). Male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Chemical Ecology*, *35*, 422–434.
- Batalha, M. de M. C., Goulart, H. F., Santana, A. E. G., Barbosa, L. A. O., Nascimento, T. G., da Silva, M. K. H., Dornelas, C. B., & Grillo, L. A. M. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of cuticular and internal lipids of the insect *Rhynchophorus palmarum*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *105*(1), e21723.
- Bell, W. J., Roth, L. M., & Nalepa, C. A. (2007). Cockroaches: ecology, behavior, and natural history. In *Cockroaches*. Johns Hopkins University Press.
- Bhattacharyya, M. (2017). The push-pull strategy: a new approach to the eco-friendly method of pest management in agriculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *5*(3), 604–607.
- Biljana Stojković, Darka Šešlija Jovanović, Branka Tucić, & Nikola Tucić. (2010). Homosexual behaviour and its longevity cost in females and males of the seed beetle *Acanthoscelides obtectus*. *Physiological Entomology*, *35*(4), 308–316.
- Bradley, S. J., Suckling, D. M., McNaughton, K. G., Wearing, C. H., & Karg, G. (1995). A temperature-dependent model for predicting release rates of pheromone from a polyethylene tubing dispenser. *Journal of Chemical Ecology*, *21*, 745–760.
- Brezolin, A. N., Martinazzo, J., Kunkel Muenchen, D. K., de Cezaro, A. M., Rigo, A. A., Steffens, C., Steffens, J., Blassioli-Moraes, M. C., & Borges, M. (2018). Tools for detecting insect semiochemicals: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(17), 4091–4108.
- Calibeo-Hayes, D., Denning, S. S., Stringham, S. M., & Watson, D. W. (2005). Lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) emergence after mechanical incorporation of poultry litter into field soils. *Journal of Economic Entomology*, *98*(1), 229–235.

- Calla-Quispe, E., Fuentes-Rivera, H. L., Ramírez, P., Martel, C., & Ibañez, A. J. (2020). Mass spectrometry: a rosetta stone to learn how fungi interact and talk. *Life*, 10(6).
- Calla-Quispe, E., Martel, C., & Ibañez, A. J. (2022). Chemical signals associated with gender and sexual experience affect mating and the attractiveness of the poultry pest, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, toac101.
- CAPT 7. (2016). *Sistema eficaz y ecológico para monitorizar y controlar el escarabajo de la cama en explotaciones avícolas*. <https://www.panachlor.com>
- Carazo, P., Sanchez, E., Font, E., & Desfilis, E. (2004). Chemosensory cues allow male *Tenebrio molitor* beetles to assess the reproductive status of potential mates. *Animal Behaviour*, 68(1), 123–129.
- Castillo, M. (2017). *El estado de la manufactura avanzada: Competencia entre las plataformas de la Internet industrial*. Serie desarrollo productivo. Santiago: Comisión económica para América Latina (CEPAL), Naciones Unidas.
- Chen, G., Song, Y., Wang, P., Chen, J., Zhang, Z., Wang, S., Huang, X., & Zhang, Q.-H. (2014). Semiochemistry of *Dendroctonus armandi* Tsai and Li (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): both female-produced aggregation pheromone and host tree kairomone are critically important. *Chemoecology*, 25(3), 135–145.
- Chernaki-Leffer, A. M., Almeida, L. M., Sosa-Gómez, D. R., Anjos, A., & Vogado, K. M. (2007). Populational fluctuation and spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera; Tenebrionidae) in a poultry house, Cascavel, Parana state, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67(2), 209–213.
- Control Bío. (2022a). *DARWIN 2500 enemigo natural de Alphitobius*. <https://controlbio.es/es/comprar-nematodos-steinernema-carpocapsae/1334-darwin-2500-enemigo-natural-de-alphitobius>
- Control Bío. (2022b). *TENEDROP trampa Alphitobius*. <https://controlbio.es/es/tenebrio-de-las-granjas-avicolas-alphitobius/1335-tenedrop-trampa-alphitobius>
- Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52, 375–400.
- Cortez, V., Verdú, J. R., Ortiz, A. J., & Halffter, G. (2017). Identification and evaluation of semiochemicals for the biological control of the beetle *Omorgus suberosus* (F.) (Coleoptera: Trogidae), a facultative predator of eggs of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *PLoS ONE*, 12(2).
- Cossé, A. A., & Zilkowski, B. W. (2015). Behavioral responses of lesser mealworm beetles, *Alphitobius diaperinus*, (Coleoptera: Tenebrionidae) to pheromone components using a wind tunnel dual choice walking bioassay. *Journal of Insect Behavior*, 28(2), 202–210.
- Crippen, T. L., & Esquivel, J. F. (2012). Improved visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) - part II: Alimentary canal components and measurements. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.
- Crook, D. J., Hopper, J. A., Ramaswamy, S. B., & Higgins, R. A. (2004). Courtship behavior of the soybean stem borer *Dectes texanus texanus* (Coleoptera:

- Cerambycidae): Evidence for a female contact sex pheromone. *Annals of the Entomological Society of America*, 97(3), 600–604.
- Cui, K., He, L., Zhang, Z., Zhang, L., Mu, W., & Liu, F. (2020). Effects of benzothiazole on survival for reduced reproduction and development in *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Management Science*, 76(9), 3088–3095.
- da Soares, C. E. S., Weber, A., Moecke, E. H. S., de Souza, C. K., Reiter, M. G. R., & Scussel, V. M. (2018). Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. *Chemical Engineering Transactions*, 64, 589–594.
- de Las Casas, E., Harein, P. K., & Pomeroy, B. S. (1972). Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. *Environmental Entomology*, 1(1), 27–30.
- del Valle, E. E., Frizzo, L. S., Malmierca, M., Zbrun, M. v., Lax, P., & Doucet, M. E. (2016). Biological control of *Alphitobius diaperinus* with *Steinernema rarum* CUL and *Heterorhabditis bacteriophora* SMC and feasibility of application in rice hull. *Journal of Pest Science*, 89, 161–170.
- Denux, O., & Zagatti, P. (2010). Coleoptera families other than Cerambycidae, Curculionidae *sensu lato*, Chrysomelidae *sensu lato* and Coccinelidae. In A. Roques & et. al (Eds.), *BioRisk* (1st ed., Vol. 4, pp. 315–406). Pensoft Publishers.
- Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1), 74–100.
- Díaz, W. C., Anteparra, M. E., & Hermann, A. (2008). *Dermestidae* (Coleoptera) en el Perú: revisión y nuevos registros. *Revista Peruana de Biología*, 15(2), 15–20.
- Dinev, Iv. (2013). The darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*) – a health hazard for broiler chicken production. *Trakia Journal of Sciences*, 11(1), 1–4.
- Dion, E., Monteiro, A., & Nieberding, C. M. (2019). The role of learning on insect and spider sexual behaviors, sexual trait evolution, and speciation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 225.
- Dion, E., Pui, L. X., Weber, K., & Monteiro, A. (2020). Early-exposure to new sex pheromone blends alters mate preference in female butterflies and in their offspring. *Nature Communications 2020 11:1*, 11(1), 1–8.
- Domínguez, I. (2012). *Alphitobius diaperinus* ¿Un problema bajo el control o bajo los comederos? *Selecciones Avícolas*, 23–27.
- Domínguez-Ruiz, J., Sanchis, J., Navarro-Llopis, V., & Primo, J. (2008). A new long-life trimedlure dispenser for Mediterranean fruit fly. *Journal of Economic Entomology*, 101(4), 1325–1330.
- Drilling, K., & Dettner, K. (2010). First insights into the chemical defensive system of the erotylid beetle, *Tritoma bipustulata*. *Chemoecology*, 20(4), 243–253.
- Dukas, R. (2005). Learning affects mate choice in female fruit flies. *Behavioral Ecology*, 16(4), 800–804.

- Dunford, J. C., & Kaufman, P. E. (2006). *Lesser mealworm, litter beetle, Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae).
- Engel, K. C., Männer, L., Ayasse, M., & Steiger, S. (2015). Acceptance threshold theory can explain occurrence of homosexual behaviour. *Biology Letters*, *11*(1).
- Esquivel, J. F., Crippen, T. L., & Ward, L. A. (2012). Improved visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) - part I: Morphological features for sex determination of multiple stadia. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.
- Falomo, A. A. (1986). *The pheromone biology of the lesser mealworm, Alphitobius diaperinus* (Panzer), (Coleoptera: Tenebrionidae) [Doctoral dissertation]. The University of Wisconsin-Madison.
- Fedina, T. Y., & Lewis, S. M. (2008). An integrative view of sexual selection in *Tribolium flour* beetles. *Biological Reviews*, *83*(2), 151–171.
- Ferveur, J. F. (2005). Cuticular hydrocarbons: their evolution and roles in *Drosophila* pheromonal communication. *Behavior Genetics*, *35*(3), 279–295.
- Font, E., & Desfilis, E. (2003). Courtship, mating, and sex pheromones in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. In *Exploring Animal Behavior in Laboratory and Field* (pp. 43–58). Academic Press.
- Galindo Acosta, C. A. (2021). *Identificación molecular por medio del Gen COI de escarabajos de importancia sanitaria en la región avícola de Fusagasugá, Cundinamarca*. [Tesis de maestría], Universidad Nacional de Colombia.
- Geiselhardt, S., Otte, T., & Hilker, M. (2009). The role of cuticular hydrocarbons in male mating behavior of the mustard leaf beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). *Journal of Chemical Ecology*, *35*(10), 1162–1171.
- Geiselhardt, S., Schmitt, T., & Peschke, K. (2009). Chemical composition and pheromonal function of the defensive secretions in the subtribe Stizopina (Coleoptera, Tenebrionidae, Opatrini). *Chemoecology*, *19*(1), 1–6.
- Giunti, G., Palmeri, V., Algeri, G. M., & Campolo, O. (2018). VOC emissions influence intra- and interspecific interactions among stored-product Coleoptera in paddy rice. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–9.
- Golub, M., Weatherston, J., & Benn, M. H. (1983). Measurement of release rates of gossypure from controlled release formulations by mini-airflow method. *Journal of Chemical Ecology*, *9*(3), 323–333.
- Goodwin, M. A., & Waltman, W. D. (1996). Transmission of Eimeria, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. *Journal of Applied Poultry Research*, *5*, 51–55.
- Hassan, N., & Shakir, A.-Z. (2008). Pheromone use in the Food Industry. *International Pest Control*, *50*(2), 83–86.
- Hassemer, M. J., Borges, M., Withall, D. M., Pickett, J. A., Laumann, R. A., Birkett, M. A., & Blassioli-Moraes, M. C. (2019). Development of pull and push–pull systems for management of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, in poultry houses using alarm and aggregation pheromones. *Pest Management Science*, *75*(4), 1107–1114.

- Hassemer, M. J., Laumann, R. A., Borges, M., Lopes, R. B., & Blassioli-Moraes, M. C. (2018). Estrat gia "Atrai-Infecta" para o manejo de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) em avi rios. *Developing Novel Sentinel-Based Cropping Systems for Sustainable Pest Resilience*, 1.
- Hassemer, M. J., Lopes, R. B., Borges, M., Alves, L. F. A., Withall, D. M., Pickett, J. A., Laumann, R. A., Birkett, M. A., & Blassioli-Moraes, M. C. (2020). Development of an attract-and-infect device for biological control of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in poultry houses. *Biological Control*, 149, 104326.
- Hassemer, M. J., Sant'Ana, J., Borges, M., Withall, D., Pickett, J. A., de Oliveira, M. W. M., Laumann, R. A., Birkett, M. A., & Blassioli-Moraes, M. C. (2016). Revisiting the male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): Identification of a six-component pheromone from a Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(36), 6809–6818.
- Hassemer, M. J., Sant'Ana, J., de Oliveira, M. W. M., Borges, M., Laumann, R. A., Caumo, M., & Blassioli-Moraes, M. C. (2015). Chemical composition of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) abdominal glands and the influence of 1,4-benzoquinones on its behavior. *Journal of Economic Entomology*, 108(4), 2107–2116.
- Hazeleger, W. C., Bolder, N. M., Beumer, R. R., & Jacobs-Reitsma, W. F. (2008). Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B Variant Java between successive broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 6887–6891.
- Hervé, M. (2021). *RVAideMemoire: testing and plotting procedures for biostatistics. R Packag version 09-79*. <http://cran.r-project.org/web/packages/RVAideMemoire/>
- Heuskin, S., Vanderplanck, M., Bacquet, P., Holveck, M.-J., Kaltenpoth, M., Engl, T., Pels, C., Taverne, C., Lognay, G., & Nieberding, C. M. (2014). The composition of cuticular compounds indicates body parts, sex and age in the model butterfly *Bicyclus anynana* (Lepidoptera). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 1–16.
- Heuskin, S., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathelet, J.-P., & Lognay, G. (2011). The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 15(3), 459–470.
- Inonán Oyola, H., & León Hinojosa, C. (2021). *Bolet n estadístico mensual de la "Producción y comercializaci n de productos avícolas". Mes: Diciembre*.
- Inonán Oyola, H., & León Hinojosa, C. (2022). *Bolet n estadístico mensual de la "Producción y comercialización de productos avícolas". Mes: Enero*.
- Jennions, M. D., & Petrie, M. (2000). Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 75(1), 21–64.
- JF Oakes. (2022). *XLure R.T.U. MST beetle floor trap*. <https://www.jfoakes.com/product/xlure-mst-beetle-floor-trap/>

- Jiménez Martínez, E. (2009). *Manejo integrado de plagas*. Universidad Nacional Agraria.
- Johansson, B. G., Anderbrant, O., Simandl, J., Avtzis, N. D., Salvadori, C., Hedenström, E., Edlund, H., & Högberg, H. E. (2001). Release rates for pine sawfly pheromones from two types of dispensers and phenology of *Neodiprion sertifer*. *Journal of Chemical Ecology* 27:4, 27(4), 733–745.
- Juárez Figueroa, R. H. (2007). *Control del escarabajo del estiércol *Alphitobius diaperinus* con *Heterorhabditis bacteriophora*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae**. Escuela Agrícola Panamericana.
- Kamiya, A. C., Silva, W. D., Leite, M. O. G., Tironi, P., Wadt, L., & Bento, J. M. S. (2015). Mating behavior and evidence for male-produced aggregation pheromone in *Cyrtomon luridus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae). *Journal of Insect Behavior*, 28(1), 55–66.
- Khan, Z. R., Midega, C. A. O., Bruce, T. J. A., Hooper, A. M., & Pickett, J. A. (2010). Exploiting phytochemicals for developing a 'push-pull' crop protection strategy for cereal farmers in Africa. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4185–4196.
- Kuenen, L. P. S., & Siegel, J. P. (2015). Measure your septa release ratios: pheromone release ratio variability affected by rubber septa and solvent. *Journal of Chemical Ecology*, 41(3), 303–310.
- Leffer, A. M., Kuttel, J., Martins, L. M., Pedroso, A. C., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira, F., & Ferreira, A. J. P. (2010). Vectorial competence of larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(5), 481–487.
- Lenth, R. v., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., & Singmann, H. (2019). *emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means*. R Package Version 1.3.1. <http://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/>
- Lindgren, B. S., & Borden, J. H. (2011). Displacement and aggregation of mountain pine beetles, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae), in response to their antiaggregation and aggregation pheromones. <https://doi.org/10.1139/X93-038>, 23(2), 286–290.
- Liu, X. P., He, H. M., Kuang, X. J., & Xue, F. sen. (2010). Mating behavior of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Science*, 17(1), 61–66.
- Lizée, M. H., Barascud, B., Cornec, J. P., & Sreng, L. (2017). Courtship and mating behavior of the cockroach *Oxyhaloa deusta* [Thunberg, 1784] (Blaberidae, Oxyhaloinae): attraction bioassays and morphology of the pheromone sources. *Journal of Insect Behavior*, 30(6), 674–694.
- Llaque Ramos, L. J. (2009). *Innovación en la industria avícola peruana de broilers para mejorar los niveles de competitividad 1986-2006*. [Tesis doctoral], Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Lockey, K. H. (1979). Cuticular hydrocarbons of adult *Alphitophagus bifasciatus* (Say.) and *Alphitobius diaperinus* (Panz.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 64(1), 47–56.

- Luo, B., Li, D., Zhang, A. L., & Gao, J. M. (2018). Synthesis, antifungal activities and molecular docking studies of benzoxazole and benzothiazole derivatives. *Molecules*, 23(10).
- Luque Zúñiga, B. G., Moreno Salazar Calderón, K. A. B., & Lanchipa Ale, T. M. (2021). Impactos del COVID-19 en la agricultura y la seguridad alimentaria. *Centro Agrícola*, 48(1), 72–82.
- Marquez, P. R. (2014). *USDA APHIS PPQ*, Bugwood.org <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5507868>
- McAllister, J. C., Steelman, C. D., Newberry, L. A., & Skeeles, J. K. (1995). Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poultry Science*, 74(1), 45–49.
- McDonough, L. M. (1991). Controlled release of insect sex pheromones from a natural rubber substrate. In P. A. Hedin (Ed.), *Naturally occurring pest bioregulators* (Vol. 449, pp. 106–124). ACS Symposium serie 449. Washington, DC, USA: American Chemical Society.
- McDonough, L. M. (1997). Release dynamics of pheromone from a pheromone dispenser. *Journal of Chemical Ecology*, 23(5), 1211–1216.
- Menzel, F., Blaimer, B. B., & Schmitt, T. (2017). How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1850), 20161727.
- Monceau, K., & van Baaren, J. (2012). Female teneral mating in a monandrous species. *Ecology and Society*, 2(7), 1426–1436.
- Müller, M., & Buchbauer, G. (2011). Essential oil components as pheromones. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(6), 357–377.
- Muñoz-Pallares, J., Corma, A., Primo, J., & Primo-Yufera, E. (2001). Zeolites as pheromone dispensers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4801–4807.
- Mweresa, C. K., Mukabana, W. R., van Loon, J. J. A., Dicke, M., & Takken, W. (2020). Use of semiochemicals for surveillance and control of hematophagous insects. *Chemoecology*, 30(6), 277–286.
- Nahrung, H. F., & Allen, G. R. (2004). Sexual selection under scramble competition: mate location and mate choice in the eucalypt leaf beetle *Chrysophtharta agricola* (Chapuis) in the field. *Journal of Insect Behavior*, 17(3), 353–366.
- Nieberding, C. M., de Vos, H., Schneider, M. v., Lassance, J.-M., Estramil, N., Andersson, J., Bång, J., Hedenström, E., Löfstedt, C., & Brakefield, P. M. (2008). The male sex pheromone of the butterfly *Bicyclus anynana*: towards an evolutionary analysis. *PLoS ONE*, 3(7), e2751.
- Ó'Ceallacháin, D. P., & Ryan, M. F. (1977). Production and perception of pheromones by the beetle *Tribolium confusum*. *Journal of Insect Physiology*, 23(10), 1303–1309.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H.,

- Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). vegan: Community ecology package. *R Package Version 2.5-7*. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/>
- Onnink, C. M., Williams, A. A., & Williams, J. S. (2017). Electrophysiological and behavioral evidence for (E)-2-hexenal as a female-attracting pheromone produced by disturbed *Megacopta cribraria* (Hemiptera: Plataspidae). *Journal of Entomological Science*, 52(1), 39–51.
- Parker, G. A. (1979). Sexual selection and sexual conflict. In M. Blum (Ed.), *Sexual selection and reproductive competition in insects* (pp. 123–166). Academic Press.
- Peterson, M. A., Dobler, S., Larson, E. L., Juárez, D., Schlarbaum, T., Monsen, K. J., & Francke, W. (2007). Profiles of cuticular hydrocarbons mediate male mate choice and sexual isolation between hybridising *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chemoecology*, 17(2), 87–96.
- Pimentel, D. (1992). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *BioScience*, 42(10), 750–760.
- Pimentel, D., Andow, D., Dyson-Hudson, R., Gallahan, D., Jacobson, S., Irish, M., Kroop, S., Moss, A., Schreiner, I., Shepard, M., Thompson, T., & Vinzant, B. (1980). Environmental and social costs of pesticides: a preliminary assessment. *Oikos*, 34(2), 140.
- Pinto, D. M., Pinto Duarte, J. L., Ribeiro, B. P., & Silveira Júnior, P. (2009). Collection of Coleoptera from a poultry farm in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, 39(2), 319–324.
- Qadir, I., Qamar, A., Paul, B., & Mir, A. H. (2021). Cuticular hydrocarbons C14-C36 are potential contact pheromonal elements modulating some behaviors in *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biologia*, 76(1), 123–132.
- R Core Team. (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. <http://www.r-project.org/>
- Retamales, J., Vivallo, F., & Robeson, J. (2011). Insects associated with chicken manure in a breeder poultry farm of central Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43, 79–83.
- Rezende, S. R. F., Curvello, F. A., Fraga, M. E., Reis, R. C. S., Castilho, A. M. C., & Agostinho, T. S. P. (2009). Control of the *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) with entomopathogenic fungi. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11(2), 121–127.
- Robinson, W. H. (2005). Urban insects and arachnids - A handbook of urban entomology. In *Cambridge University Press*.
- Robledo, N., Arzuffi, R., & Reyes-Prado, H. (2018). Modification of behavioral response in *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae) due to pre-exposure to sex pheromone and host plant volatiles. *Florida Entomologist*, 101(1), 69–73.
- Rocha, D. F. O., Wouters, F. C., Zampieri, D. S., Brocksom, T. J., Machado, G., & Marsaioli, A. J. (2013). Harvestman phenols and benzoquinones: characterisation and biosynthetic pathway. *Molecules*, 18, 11429–11451.
- Roche, A. J., Cox, N. A., Richardson, L. J., Buhr, R. J., Cason, J. A., Fairchild, B. D., & Hinkle, N. C. (2009). Transmission of Salmonella to broilers by contaminated

- larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Poultry Science*, 88(1), 44–48.
- Rodríguez, D., Xuárez, M., Merino, A., Larramendy, R., Temprana, M., Díaz, O., Morales, Y., & Rebollar, R. (2013). Evaluación en condiciones de laboratorio de la eficacia de tres insecticidas de nuevo uso en la avicultura cubana para el control de *Alphitobius diaperinus*. *Revista de Salud Animal*, 35(3), 197–200.
- Rodríguez Miranda, D., & Grillo Ravelo, H. (2019). Primer reporte de *Carcinops pumilio* en galpones avícola de la provincia de Villa Clara. *Centro Agrícola*, 46(2), 104–108.
- Rohde, C., Alves, L. F. A., Neves, P. M. O. J., Alves, S. B., da Silva, E. R. L., & de Almeida, J. E. M. (2006). Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 35(2), 231–240.
- Romero, P. E., Calla-Quispe, E., Castillo-Vilcahuaman, C., Yokoo, M., Fuentes-Rivera, H. L., Ramirez, J. L., Ampuero, A., Ibáñez, A. J., & Wong, P. (2021). From the Andes to the desert: 16S rRNA metabarcoding characterization of aquatic bacterial communities in the Rimac river, the main source of water for Lima, Peru. *PLOS ONE*, 16(4), e0250401.
- Romero-López, A. A., Arzuffi, R., Miguel, Y., & Morón, Á. (2005). Feromonas y atrayentes sexuales de coleópteros Melolonthidae de importancia agrícola. *Folia Entomológica Mexicana*, 44(2), 233–245.
- Rork, A. M., & Renner, T. (2018). Carabidae semiochemistry: current and future directions. *Journal of Chemical Ecology*, 44, 1069–1083.
- Rumbos, C. I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., & Athanassiou, C. G. (2019). The lesser mealworm *Alphitobius diaperinus*: a noxious pest or a promising nutrient source? *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1418–1437.
- Santo I Monteys, V. (2011). Control de *Alphitobius diaperinus* (Col. Tenebrionidae) en granjas avícolas. *Selecciones Avícolas*, 19–23.
- Simmons, L. W., & Siva-Jothy. (1998). Sperm competition in insects: mechanisms and the potential for selection. In T. R. Birkhead & A. P. Moller (Eds.), *Sperm competition and sexual selection* (pp. 341–434). Academic Press.
- Singh, N., & Johnson, D. T. (2012). Attractiveness of an aggregation pheromone lure and chicken droppings to adults and larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 105(6), 2196–2206.
- Soetemans, L., Gianotten, N., & Bastiaens, L. (2020). Agri-food side-stream inclusion in the diet of *Alphitobius diaperinus*. Part 2: Impact on larvae composition. *Insects*, 11(3), 190.
- Spikes, A. E., Paschen, M. A., Millar, J. G., Moreira, J. A., Hamel, P. B., Schiff, N. M., & Ginzl, M. D. (2010). First contact pheromone identified for a longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) in the subfamily Prioninae. *Journal of Chemical Ecology*, 36, 943–954.

- Sreng, L. (2006). Cockroach tergal glands producing female sex attractant pheromones and male aphrodisiacs in particular in the subfamily Blaberinae (Blattaria: Blaberidae). *European Journal of Entomology*, 103(4), 817–829.
- Stoffolano, J. G., Schaubert, E., Yin, C. M., Tillman, J. A., & Blomquist, G. J. (1997). Cuticular hydrocarbons and their role in copulatory behavior in *Phormia regina* (Meigen). *Journal of Insect Physiology*, 43(11), 1065–1076.
- Strother, K. O., & Steelman, C. D. (2001). Spatial analysis of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in broiler production facilities. *Environmental Entomology*, 30(3), 556–561.
- Tanigaki, T., Yamaoka, R., & Sota, T. (2007). The role of cuticular hydrocarbons in mating and conspecific recognition in the closely related longicorn beetles *Pidonia grallatrix* and *P. takechii*. *Zoological Science*, 24(1), 39–45.
- Tewari, S., Leskey, T. C., Nielsen, A. L., Piñero, J. C., & Rodriguez-Saona, C. R. (2014). Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones. In *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective* (pp. 141–168). Integrated pest management. Academic Press.
- Tomaszewska, E., Hebert, V. R., Brunner, J. F., Jones, V. P., Doerr, M., & Hilton, R. (2005). Evaluation of pheromone release from commercial mating disruption dispensers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2399–2405.
- Torr, S. J., Hall, D. R., Phelps, R. J., & Vale, G. A. (1997). Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87(3), 299–311.
- Tseng, Y.-C. L., Davidson, J. A., & Menzer, R. E. (1971). Morphology and chemistry of the odoriferous gland of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 64(2), 425–430.
- Uemura, D. H., Alves, L. F. A., Opazo, M. A. U., Alexandre, T. M., Oliveira, D. G. P., & Ventura, M. U. (2008). Distribuição e dinâmica populacional do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários de frango de corte. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 4(4), 429–435.
- Vacas González, S. (2011). *Uso de semioquímicos en el control de plagas. Estudios básicos y de aplicación*. [Tesis doctoral], Universidad Politécnica de Valencia.
- Vacas, S., Alfaro, C., Navarro-Llopis, V., Zarzo, M., & Primo, J. (2009). Study on the optimum pheromone release rate for attraction of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 102(3), 1094–1100.
- Vacas, S., Vanaclocha, P., Alfaro, C., Primo, J., Verdú, M. J., Urbaneja, A., & Navarro-Llopis, V. (2012). Mating disruption for the control of *Aonidiella aurantii* Maskell (Hemiptera: Diaspididae) may contribute to increased effectiveness of natural enemies. *Pest Management Science*, 68(1), 142–148.
- Valverde Rodríguez, A., & Curkovic Sekul, T. (2021). *Disrupción sexual de plagas agrícolas mediante el uso de las feromonas sexuales de la especie*. Universidad Nacional Hermilio Valdizan.

- Vanderbilt, C. F., Giblin-Davis, R. M., & Weissling, T. J. (1998). Mating behavior and sexual response to aggregation pheromone of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*, 81(3), 351–360.
- Verschut, T. A., Carlsson, M. A., & Hambäck, P. A. (2019). Scaling the interactive effects of attractive and repellent odours for insect search behaviour. *Scientific Reports*, 9(1), 1–18.
- Welter, S., Pickel, C., Millar, J., Cave, F., van Steenwyk, R., & Dunley, J. (2005). Pheromone mating disruption offers selective management options for key pests. *California Agriculture*, 59(1), 16–22.
- Wilson, C. J., & Tomkins, J. L. (2015). Female *Callosobruchus maculatus* can maximize long-term fitness through polyandry. *Behavioral Ecology*, 26(2), 502–509.
- Wojcik, D. P. (2013). Mating behavior of 8 stored-product beetles (Coleoptera: Dermestidae, Tenebrionidae, Cucujidae, and Curculionidae). *The Florida Entomologist*, 52(3), 171–197.
- Wolf, J., Potrich, M., Lozano, E. R., Gouvea, A., & Pegorini, C. S. (2015). Combined physical and chemical methods to control lesser mealworm beetles under laboratory conditions. *Poultry Science*, 94(6), 1145–1149.
- Yew, J. Y., & Chung, H. (2015). Insect pheromones: an overview of function, form, and discovery. *Progress in Lipid Research*, 59, 88–105.
- Yutaka Iguchi. (1996). Sexual behavior of the horned beetle, *Allomyrina dichotoma septentrionalis* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Japanese Journal of Entomology*, 64(4), 870–875.
- Zhang, A., Kuang, L. F., Maisin, N., Karumuru, B., Hall, D. R., Virdiana, I., Lambert, S., Purung, H. B., Wang, S., & Hebbar, P. (2014). Activity evaluation of cocoa pod borer sex pheromone in cacao fields. *Environmental Entomology*, 37(3), 719–724.
- Zorzetti, J., Constanski, K., Santoro, P. H., Fonseca, I. C. B., & Neves, P. M. O. J. (2015). Growth regulator insecticides for the control of the lesser mealworm beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(1), 24–32.

ANEXOS

Anexo 1. *Alphitobius diaperinus*

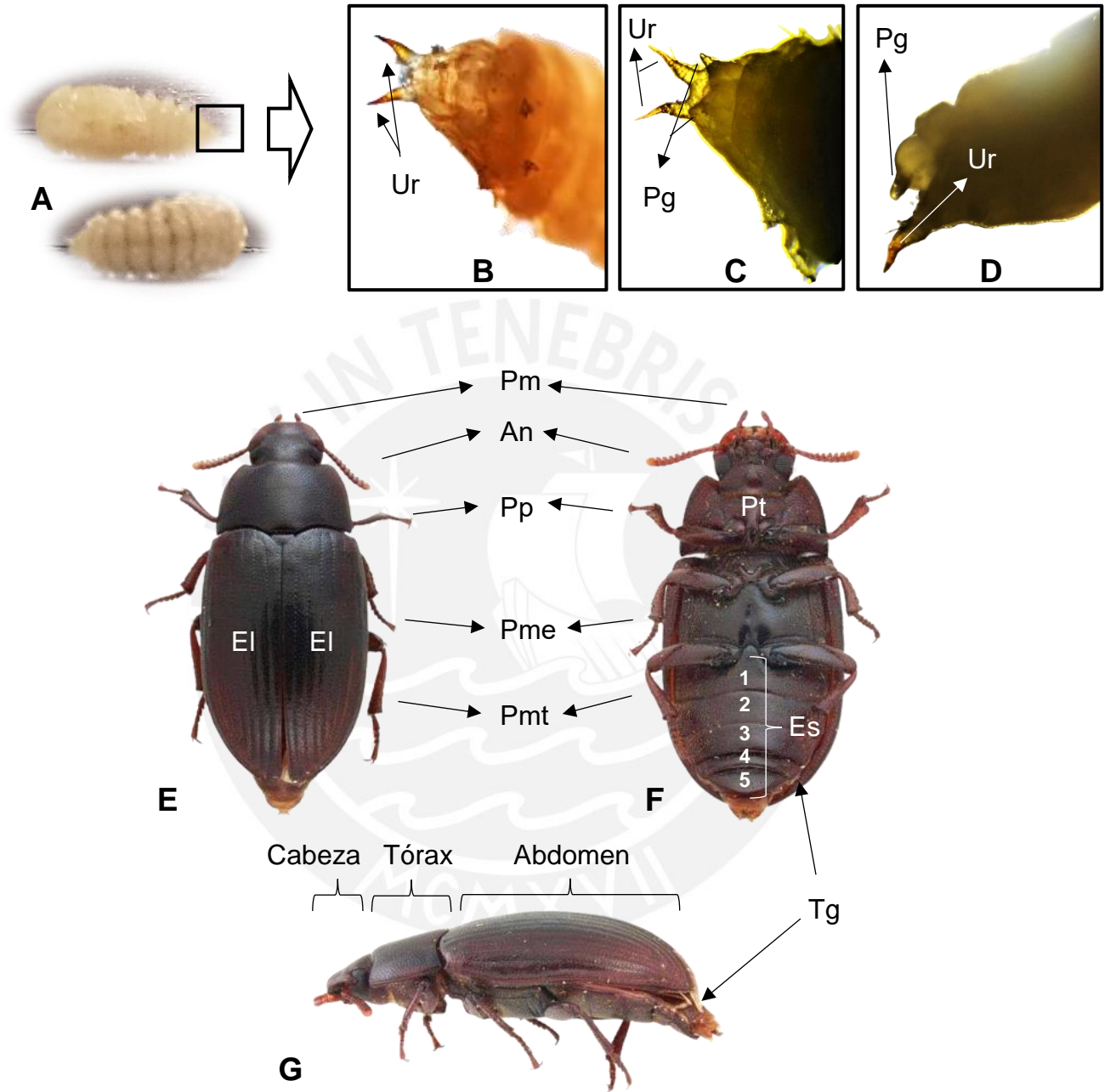


Figura 33. Características anatómicas de pupas y adultos de *Alphitobius diaperinus*. (A) Vista frontal y dorsal de pupas, vista dorsal de pupa (B) macho y (C y D) hembra. Vista (E) frontal, (F) dorsal y (G) lateral de adulto. An, antena; El, élitro; Es, estrenito; Pg, pigópodos; Pm, palpo maxilar; Pme, pata mesotorácica; Pmt, pata metatorácica; Pp, pata protorácica; Tg, tergito; Ur, urogenfo. E-G adaptado de Marquez (2014).

Anexo 2: Logros académicos

Artículos publicados

Calla-Quispe, E., Martel, C., & Ibáñez, A. J. (2022). Chemical signals associated with gender and sexual experience affect mating and the attractiveness of the poultry pest, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, toac101.

Calla-Quispe, E., Fuentes-Rivera, H. L., Ramírez, P., Martel, C., & Ibáñez, A. J. (2020). Mass spectrometry: a rosetta stone to learn how fungi interact and talk. *Life*, 10(6), 89.

Artículos publicados producto de colaboración científica

Romero, P. E., **Calla-Quispe, E.**, Castillo-Vilcahuaman, C., Yokoo, M., Fuentes-Rivera, H. L., Ramirez, J. L., et al. (2021). From the Andes to the desert: 16S rRNA metabarcoding characterization of aquatic bacterial communities in the Rimac river, the main source of water for Lima, Peru. *PloS one*, 16(4), e0250401.

Calla-Quispe E., Robles J., Areche C. & Sepulveda B. (2020) Are ionic liquids better extracting agents than toxic volatile organic solvents? A combination of ionic liquids, microwave and LC/MS/MS, applied to the lichen *Stereocaulon glareosum*. *Frontiers in Chemistry*, 8: 450.

Conferencias

Calla-Quispe, E. A closer look at the science that make biotrap against the pest *Alphitobius diaperinus* work. Presentación oral en el Encuentro Anual de Investigación, Innovación y Creación - PUCP. Lima, Perú. 27 de setiembre del 2021.

Calla-Quispe, E., Martel, C., & Ibáñez, A.J. Volatiles and cuticular compounds as a mean to combat the lesser mealworm pest, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). 16th Annual Conference hosted by the Metabolomics Society. China, 27-29 octubre del 2020.

Calla- Quispe E., Hammerly Lino, Alfredo J. Ibáñez. Fungal communities associated with species of the genus *Stereocaulon* and *Ephebe* and their metabolomic variation. Decimocuarto Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos GLAL XIV. Cuzco, Perú 2019.