

# FUENTES DE ATRACCIÓN Y PREFERENCIA DE OVIPOSICIÓN DE *Conotrachelus crataegi* Walsh (Coleoptera: Curculionidae) EN *Crataegus* spp. (Rosaceae: Maloideae)

Manolo Muñiz-Merino<sup>1¶</sup>; J. Cibrián-Tovar<sup>1</sup>; Raúl Nieto-Ángel<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Fitosanidad, Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230. MÉXICO. Correo electrónico: manolo@colpos.mx (¶Autor para correspondencia).

<sup>2</sup>Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, C.P. 56230. MÉXICO.

## RESUMEN

El tejocote, *Crataegus* spp., se cultiva en siete entidades de la República mexicana. Su fruto es afectado por *Conotrachelus crataegi*, insecto que barrena la pulpa y hueso, ocasionando daños y pérdida de calidad. En este trabajo se evaluaron diferentes partes del hospedero, machos y hembras del curculiónido, y combinaciones de ambos, como fuentes de atracción de adultos. También se estudió la preferencia de las hembras para ovipositar en frutos de ocho accesiones de cinco especies de tejocote. Los resultados de pruebas realizadas en olfatómetros de doble vía indicaron que la mejor fuente de atracción de adultos de ambos sexos fue el fruto ( $P<0.0001$ ), por lo que sus compuestos volátiles podrían ser utilizados para identificar atrayentes de *C. crataegi*. La preferencia para oviposición estuvo relacionada directamente con el tamaño de fruto e inversamente con su grado de madurez. Los frutos inmaduros, de tamaño mediano y grande, principalmente de la especie *Crataegus mexicana*, presentaron las cantidades más altas de oviposturas.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** Atrayentes, oviposturas, picudo del membrillo, tejocote.

## SOURCES OF ODOR ATTRACTIVE TO *Conotrachelus crataegi* Walsh (Coleoptera: Curculionidae) AND ITS PREFERENCE TO OVIPOSIT ON *Crataegus* spp. (Rosaceae: Maloideae)

## ABSTRACT

The hawthorn, *Crataegus* spp., is grown in seven states in Mexico. Its fruit is affected by *Conotrachelus crataegi*, an insect that bores into its flesh and stones, causing damage and loss of quality. In this research, we evaluated different parts of the host, male and female quince curculios, and combinations thereof, as potential sources of attraction for adults. We also studied female oviposition preference in eight fruit accessions from five hawthorn species. Results of bioassays in two-way olfactometers indicated that the fruits were the best adult attractant source ( $P<0.0001$ ), so we believe that attractive volatiles released from them should be tested as source material to identify potential attractant compounds for *C. crataegi*. Oviposition preference was directly related to fruit size, but inversely related to fruit maturity status. Medium and large-sized immature fruits, mainly belonging to the species *Crataegus mexicana*, were the most oviposited.

**ADDITIONAL KEYWORDS:** Attractants, egg depositions, quince curculio, hawthorn.

## INTRODUCCIÓN

El género *Crataegus*, conocido como tejocote, tiene una amplia variabilidad genética, con 140 especies en todo el mundo (Phipps *et al.*, 2003). Nueve de ellas son endémicas de México (Phipps, 1997) y 13 se distribuyen en al menos 20 de sus entidades (Núñez-Colín *et al.*, 2008a), aunque es probable que existan más (Núñez-Colín *et al.*, 2004). Tal variabilidad confiere al tejocote un gran potencial para diversos usos, entre ellos industrial, alimenticio, hortícola, ecológico, pecuario, ornamental y medicinal (Nieto-Ángel, 2007; Nieto-Ángel *et al.*, 2009), sobresaliendo por su alto contenido de pectina de excelente calidad (Aguirre-Mandujano *et al.*, 2010; Franco-Mora *et al.*, 2010).

Actualmente, el tejocote *Crataegus* spp. se cultiva a nivel comercial, semicomercial y de traspasío en siete entidades de la República mexicana (Anónimo, 2009). Sin embargo, el rendimiento y calidad de sus frutos son afectados por un curculiónido conocido como barrenador del hueso, cuyas larvas se alimentan de la pulpa y semillas. El Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Puebla (Anónimo, 2004), lo señala como una de las principales plagas del tejocote. El insecto se identificó como *Conotrachelus crataegi*, mediante las claves de Schoof (1942) y Kissinger (1964).

A *C. crataegi* se le denomina picudo del membrillo, en los Estados Unidos de América, y tiene dos hospederos principales: tejocote y membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.). También se desarrolla en pera (*Pyrus communis* L.) (Maier, 1990; Beers *et al.*, 2003; Douglas y Cowles, 2011), durazno (*Prunus persica* L. Batsch) (Slingerland, 1898) y manzana (*Malus domestica* Borkh. y *Malus* sp.) (Maier, 1980 y 1990).

Inverna como larva en el suelo, a una profundidad de 5.0-7.7 cm (Douglas y Cowles, 2011). La pupa (10-20 días) se presenta en la primavera. Los adultos emergen entre mayo y julio, después de permanecer 10 o más días en el suelo. Una semana después de emerger, comienzan a copular (Slingerland, 1898); no se conoce su comportamiento de precortejo y de cortejo. Ovipositan entre junio y agosto, en los frutos, colocando los huevecillos individualmente en pequeños agujeros hechos con sus partes bucales. Una vez que éstos eclosionan, 7 a 10 días después, las larvas barrenan el fruto, consumiendo hasta la mitad de la pulpa antes de abandonarlo, entre agosto y octubre, para introducirse en el suelo (Wellhouse, 1922; Hill, 1987; Douglas y Cowles, 2011).

La prevención del ataque del barrenador del hueso a plantas cultivadas y silvestres, requiere un monitoreo oportuno y efectivo de sus poblaciones. El muestreo tradicional de curculiónidos del género *Conotrachelus*, entre ellos *C. crataegi*, consiste en sacudir las ramas y capturar a los adultos en una manta que se coloca bajo la copa del árbol (Maier, 1980; González *et al.*, 2002). Este procedimiento resulta impráctico, porque daña los árboles y ocasiona la caída de fruta (Lafleur y Hill, 1987). Una alternativa es la colocación de trampas cebadas con semioquímicos, método que ha funcionado para el

## INTRODUCTION

The genus *Crataegus*, known as hawthorn, has a wide genetic variability, with 140 species worldwide (Phipps *et al.*, 2003). Nine of them are native to Mexico (Phipps, 1997) and 13 are distributed in at least 20 of its states (Núñez-Colín *et al.*, 2008a), although there are likely even more (Núñez-Colín *et al.*, 2004). Such variability gives the hawthorn great potential for various uses, including for industrial, food, horticultural, environmental, livestock, ornamental and medicinal purposes (Nieto-Angel, 2007; Nieto-Angel *et al.*, 2009), highlighted by its high content of high-quality pectin (Aguirre-Mandujano *et al.*, 2010, Franco-Mora *et al.*, 2010).

Today, the hawthorn, *Crataegus* spp., is grown commercially, semi-commercially and in backyards in seven Mexican states (Anonymous, 2009). However, the yield and quality of its fruits are affected by a curculio known as the stone borer, whose larvae feed on the pulp and seeds. The Puebla State Plant Protection Committee (Anonymous, 2004) has identified it as one of the main hawthorn pests. We identified the insect as *Conotrachelus crataegi* using the keys described by Schoof (1942) and Kissinger (1964).

*Conotrachelus crataegi* is called quince curculio in the United States, and has two main hosts: hawthorn and quince (*Cydonia oblonga* Mill.). It also develops in pear (*Pyrus communis* L.) (Maier, 1990; Beers *et al.*, 2003; Douglas and Cowles, 2011), peach (*Prunus persica* L. Batsch) (Slingerland, 1898) and apple (*Malus domestica* Borkh. and *Malus* sp.) (Maier, 1980 and 1990).

It overwinters as larvae in the soil at a depth of 5.0-7.7 cm (Douglas and Cowles, 2011). The pupa (10-20 days) appears in the spring. Adults emerge between May and July, after spending 10 or more days in the soil. One week after emergence, they begin to copulate (Slingerland, 1898); their pre-courtship and courtship behavior is not known. They oviposit between June and August, in the fruits, by placing the eggs individually in small holes made with their mouthparts. Once these hatch, 7 to 10 days later, the larvae bore into the fruit, consuming up to half of the pulp before leaving, between August and October, to enter the soil (Wellhouse, 1922; Hill, 1987; Douglas and Cowles, 2011).

Preventing a stone borer attack on cultivated and wild plants requires a timely and effective monitoring of their populations. Traditional sampling of curculios of the genus *Conotrachelus*, including *C. crataegi*, consists of shaking the branches and capturing the adults in a blanket placed under the tree crown (Maier, 1980; González *et al.*, 2002). This procedure is impractical because it damages the trees and causes fruit to drop (Lafleur and Hill, 1987). An alternative is the placement of traps baited with semiochemicals, which is a method that has worked for the monitoring and control of various insects of agricultural importance (Metcalf and Metcalf, 1992; García and Osorio, 2000; Osorio-Osorio *et al.*, 2003).

monitoreo y control de diversos insectos de importancia agrícola (Metcalf y Metcalf, 1992; García y Osorio, 2000; Osorio-Osorio *et al.*, 2003).

Los semioquímicos son percibidos y discriminados mediante neuronas receptoras de olores, localizadas en sénsulos antenales, capaces de reconocer estructuras moleculares individuales (Bruce y Pickett, 2011). No se conocen en detalle los tipos de estructuras sensoriales y su función en *C. crataegi*, pero posiblemente son similares a las de *C. nenuphar*, el cual tiene ocho tipos de sensilas [en forma de cabello (I-VI), de clavija (VII) y campaniforme (VIII)], cuya probable función es la quimiorrepción (I, II, IV), termorrepción (I), mecanorrepción (III, VI), degustación (V) y propiorrepción (VIII) (Alm y Hall, 1986).

Los compuestos volátiles liberados por el tejocote servirían como atrayentes en el monitoreo y/o control del insecto. Similarmente, el conocimiento de la preferencia de los adultos para oviposición, en relación con la fenología del fruto, sería de utilidad para su manejo integrado. Por lo anterior, la presente investigación se realizó con los objetivos de: 1) evaluar la atracción de los adultos hacia fuentes de olores de su hospedero y de insectos coespecíficos, y 2) cuantificar la frecuencia de oviposición del picudo en frutos de ocho accesiones de *Crataegus* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar y periodo de estudio

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, localizado en el municipio de Texcoco, Estado de México, México. La identificación del insecto y determinación de características distintivas de cada sexo se realizó en agosto de 2006, y las pruebas de atracción y de oviposición, durante junio-agosto de 2007.

### Colecta del material biológico

Los insectos para las pruebas se colectaron en árboles de tejocote localizados en los municipios de Tlalancaleca y San Salvador el Verde, estado de Puebla, 20-35 días antes de su uso, y se mantuvieron en jaulas de acrílico hexagonales (9 L de capacidad) en una cámara de cría, en el Laboratorio de Ecología Química del Colegio de Postgraduados; cada tercer día se les proporcionaron frutos frescos de tejocote y agua destilada. La cámara permaneció a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 10$  % y fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad).

Los insectos que se emplearon en el experimento de atracción se separaron por sexo al día siguiente de su colecta y se dejaron sin alimento por 30 h, previo a su uso. Las hembras destinadas a pruebas de oviposición se dejaron junto con los machos durante 10-15 días, después de lo cual se consideró que habían copulado ya que los adultos se aparean una semana después de que emergen del suelo, y enseguida las hembras inician la oviposición (Slingerland, 1898). Cada insecto se utilizó tres veces como máximo, debido a su limitada disponibilidad.

Semiochemicals are perceived and discriminated by olfactory receptor neurons, located in antennal sensilla, which can recognize individual molecular structures (Bruce and Pickett, 2011). The types of sensory structures and their function in *C. crataegi* are not known in detail, but they may be similar to those of *C. nenuphar*, which has eight types of sensilla [hairlike structures (I-VI), short plugs (VII) and campaniforms (VIII)], whose likely function is chemoreception (I, II, IV), thermoreception (I), mechanoreception (III, VI), tasting (V) and propioreception (VIII) (Alm and Hall, 1986).

Volatile compounds released by the hawthorn could serve as attractants in the monitoring and/or control of the insect. Similarly, knowledge of adult oviposition preference, in relation to the phenology of the fruit, would be useful for its integrated management. Therefore, this research was carried out with the following objectives: 1) assess the attraction of adults to odor sources of their host and conspecific insects, and 2) quantify the frequency of *C. crataegi* oviposition in eight *Crataegus* spp. fruit accessions.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area and period

The research was carried out at the Colegio de Postgraduados (Postgraduate College), Montecillo campus, located in the municipality of Texcoco, State of Mexico, Mexico. Insect identification and determination of distinctive characteristics of each sex were conducted in August 2006, and attraction and oviposition bioassays were performed during June-August, 2007.

### Collection of biological material

The insects used for testing were collected in hawthorn trees located in the municipalities of Tlalancaleca and San Salvador el Verde, state of Puebla, 20-35 days before use, and kept in hexagonal acrylic cages (9 L capacity) in a rearing chamber at the college's Chemical Ecology Laboratory; every other day they were provided with fresh hawthorn fruit and distilled water. The chamber was kept at a temperature of  $24 \pm 1$  °C, relative humidity of  $70 \pm 10$  % and a photoperiod of 14:10 h (light: dark).

The insects used in the attraction experiment were segregated by sex the day after their capture and starved for 30 h prior to use. Females intended for oviposition tests were left together with the males for 10-15 days, after which they were deemed to have copulated since adults mate a week after emerging from the soil, and then females start oviposition (Slingerland, 1898). Each insect was used a maximum of three times, due to their limited availability.

## Separación de sexos

Según Schoof (1942), los adultos de *C. crataegi* se pueden separar por sexo con base en la diferencia de longitud del pico, más largo en hembras. Sin embargo, tal característica es muy variable, por lo que se buscaron otros rasgos morfológicos externos distintivos (Figura 1). Éstos se definieron observando en un microscopio la morfología externa de hembras y machos (separados durante la cópula), cuyo sexo se corroboró al extraer su genitalia. Se determinó que los machos presentan una franja de pubescencia blanca, claramente definida, en el margen anterior del pronoto, con apariencia de V o U invertida (con los brazos dirigidos hacia la parte posterior del pronoto). Sus élitros, al igual que la región esternal del tórax, abdomen y fémures, también tienen pubescencia blanca abundante, la cual contrasta con la de color café. Por el contrario, la pubescencia de las hembras es café, uniforme en todo el cuerpo; la franja anterior del pronoto en forma de V o U es menos perceptible, ya que tiene poca pubescencia blanca; la región ventral del tórax y segmentos abdominales es de color café a café rojizo. Las hembras son más robustas que los machos, pero éstos se mueven con mayor rapidez y agilidad.

## Segregation of sexes

According to Schoof (1942), *C. crataegi* adults can be segregated by sex based on the difference in snout length, which is longer in females. However, this feature is very variable, so other distinctive external morphological features were sought (Figure 1). These were defined by examining under a microscope the external morphology of males and females (separated during mating), whose sex was confirmed by extracting their genitalia. It was determined that the males have a clearly-defined strip of white pubescence in the anterior margin of the pronotum, which looks like an inverted V or U (with the arms directed toward the rear of the pronotum). Their elytra, like the sternal region of the thorax, abdomen and femurs, also have abundant white pubescence, which contrasts with the brown. By contrast, female pubescence is brown, uniform throughout the body; the anterior strip of the pronotum, which is also shaped like an inverted V or U, is less noticeable because it has little white pubescence; the ventral region of the thorax and abdominal segments is brown to reddish brown. Females are more robust than males, but the latter move with greater speed and agility.

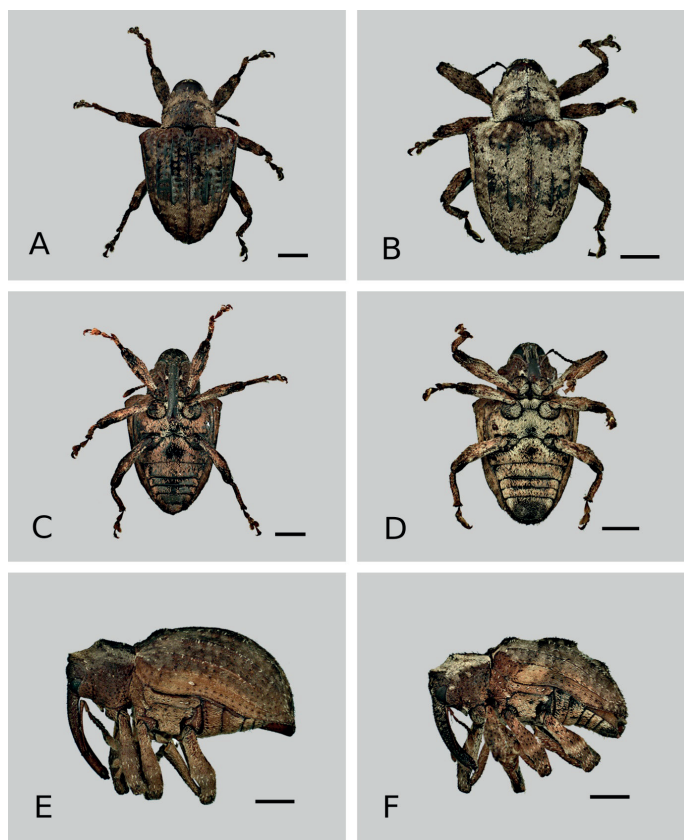


FIGURA 1. Vista dorsal, ventral y lateral de la hembra (A, C y E) y macho (B, D y F) de *Conotrachelus crataegi* Walsh. Escala: 1 mm.

FIGURE 1. Dorsal, ventral and lateral view of the female (A, C and E) and male (B, D and F) of *Conotrachelus crataegi* Walsh. Scale: 1 mm.



Las características descritas, junto con la que señala Schoof (1942), se utilizaron para separar a los insectos por sexo, previo a la realización de las pruebas de atracción. La pubescencia mantuvo las coloraciones mencionadas durante el tiempo que los insectos se usaron en los experimentos.

### Material vegetal

El material vegetal se obtuvo de árboles de ocho accesiones de un Banco de Germoplasma de tejocote *ex situ* e *in vivo*, libre de picudo, localizado en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' de latitud Norte, 98° 53' de longitud Oeste y altitud de 2,240 m), en Texcoco, Estado de México, México. Las accesiones pertenecen a cinco especies de *Crataegus* (Cuadro 1) identificadas por Núñez-Colín *et al.* (2008). En el presente estudio, se clasificaron por su época de maduración de frutos como: tempranas (septiembre-octubre), intermedias (octubre-noviembre) y tardías (noviembre-diciembre). Mayor información sobre las mismas se encuentra en Nieto-Ángel, (2007) y Núñez-Colín *et al.* (2008).

### Pruebas de atracción

Se evaluó la atracción de adultos del picudo hacia ocho fuentes de olores y un testigo sin estímulo (Cuadro 2). Todas las partes vegetales se cortaron de las ramas apicales de la zona media de los árboles (accesión 11), justo antes de la realización de cada prueba. Observaciones previas realizadas en laboratorio y campo, indicaron que los adultos son más activos durante el crepúsculo y las primeras horas de la noche, entre las 20:00 y las 23:00 h, por lo que las pruebas de atracción se establecieron a esa hora.

The features described, along with those pointed out by Schoof (1942), were used to segregate the insects by sex prior to conducting the attraction tests. The pubescence kept the colors mentioned during the time that the insects were used in the experiments.

### Plant material

The plant material was obtained from eight accessions of curculio-free, *ex situ* and *in vivo* hawthorn grown in a germplasm bank located at an experimental agricultural field belonging to the Universidad Autónoma Chapingo (19° 29' N latitude, 98° 53' W longitude and altitude 2,240 m), in Texcoco, State of Mexico, Mexico. The accessions belong to five species of *Crataegus* (Table 1) identified by Núñez-Colín *et al.* (2008). In this study, they were classified by their fruit ripening time as: early (September-October), intermediate (October-November) and late (November-December). Further information on this topic can be found in Nieto-Angel, (2007) and Núñez-Colín *et al.*, (2008).

### Attraction tests

We evaluated adult quince curculio attraction to eight odor sources and a control without stimulus (Table 2). All plant parts were cut from apical branches in the mid-area of the trees (accession 11), just before carrying out each test. Previous observations made in the laboratory and field indicated that adults are most active at dusk and the early hours of the night, between 8 and 11 p.m., so the attraction tests were established at that time.

**CUADRO 1. Especie, época de maduración de frutos y localización de los sitios de colecta de ocho accesiones de tejocote utilizadas en los experimentos de atracción y oviposición de *C. crataegi*.**

Accesión	Especie	Maduración	Origen	Latitud	Longitud	Altitud
66	<i>Crataegus gracilior</i> Phipps	Temprana	Santa Catarina del Monte, Edo de Méx.	19.48	-98.77	2700
83	<i>Crataegus stipulosa</i> (H. B. K.) Steud	Temprana	San Cristóbal de las Casas, Chis.	16.75	-92.67	2300
86	<i>Crataegus mexicana</i> Moc & Sessé	Intermedia	Huejotzingo, Pue.	19.17	-98.40	2280
48	<i>Crataegus mexicana</i> Moc & Sessé	Intermedia	Huejotzingo, Pue.	19.17	-98.40	2280
11	<i>Crataegus mexicana</i> Moc & Sessé	Intermedia	Huejotzingo, Pue.	19.17	-98.40	2280
12	<i>Crataegus nelsoni</i> Eggl.	Intermedia	Rancho Robelo, Chis.	16.67	-92.45	2250
6	<i>Crataegus stipulosa</i> (H. B. K.) Steud	Tardía	Rancho Nuevo, Chis.	16.67	-92.57	2400
42 <sup>a</sup>	<i>Crataegus</i> sp.	Tardía	San Cristóbal de las Casas, Chis.	16.75	-92.67	2300

<sup>a</sup>Esta accesión no se pudo identificar mediante las claves disponibles (Núñez-Colín *et al.*, 2008).

**TABLE 1. Species, fruit maturity period and location of collection sites of eight hawthorn accessions used in the *C. crataegi* attraction and oviposition experiments.**

Accession	Species	Maturation	Origen	Latitude	Longitude	Altitude
66	<i>Crataegus gracilior</i> Phipps	Early	Santa Catarina del Monte, Edo de Méx.	19.48	-98.77	2700
83	<i>Crataegus stipulosa</i> (H. B. K.) Steud	Early	San Cristóbal de las Casas, Chis.	16.75	-92.67	2300
86	<i>Crataegus mexicana</i> Moc & Sessé	Intermediate	Huejotzingo, Pue.	19.17	-98.40	2280
48	<i>Crataegus mexicana</i> Moc & Sessé	Intermediate	Huejotzingo, Pue.	19.17	-98.40	2280
11	<i>Crataegus mexicana</i> Moc & Sessé	Intermediate	Huejotzingo, Pue.	19.17	-98.40	2280
12	<i>Crataegus nelsoni</i> Eggl.	Intermediate	Rancho Robelo, Chis.	16.67	-92.45	2250
6	<i>Crataegus stipulosa</i> (H. B. K.) Steud	Late	Rancho Nuevo, Chis.	16.67	-92.57	2400
42 <sup>z</sup>	<i>Crataegus</i> sp.	Late	San Cristóbal de las Casas, Chis.	16.75	-92.67	2300

<sup>z</sup> This accession could not be identified using available keys (Núñez-Colin *et al.*, 2008).

**CUADRO 2. Sexo del insecto a responder según el estímulo odorífero, en el experimento de atracción de *Conotrachelus crataegi*.**

	Fuente de olor								Testigo
	Trozos de Ramas <sup>z</sup>	Hojas <sup>y</sup>	Frutos <sup>x</sup>	Hembras	Machos	Frutos con orificios <sup>w</sup>	Frutos + hembras	Frutos + machos	
<b>Sexo de los</b>	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
<b>insectos</b>	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂

<sup>z</sup> Trozos de ramas de 4 cm de longitud y 4-7 mm de diámetro. <sup>y</sup> Hojas de madurez intermedia.

<sup>x</sup> Frutos inmaduros de 14-22 mm de diámetro. <sup>w</sup> 10 orificios por fruto, de 1 mm de diámetro.

**TABLE 2. Sex of insect responding to the odorant stimulus in the *Conotrachelus crataegi* attraction experiment.**

	Odor source								Control
	Pieces of Branches <sup>z</sup>	Leaves <sup>y</sup>	Fruits <sup>x</sup>	Females	Males	Fruits with orifices <sup>w</sup>	Fruits + females	Fruits + males	
<b>Sex of</b>	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
<b>insects</b>	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂	♂

<sup>z</sup> Pieces of branches, 4 cm long and 4-7 mm in diameter. <sup>y</sup> Leaves of intermediate maturity.

<sup>x</sup> Immature fruits, 14-22 mm in diameter. <sup>w</sup> 10 orifices, 1 mm in diameter, per fruit.

Las pruebas se realizaron en olfatómetros de doble vía (previamente descritos por Calyecac-Cortero *et al.*, 2006) colocados en posición invertida, los cuales constan de un matraz central de 4 L y dos laterales de 150 ml. En uno de los matraces laterales (matraz tratamiento) se colocó la fuente de olor (25 g de ramas o frutos, 6 g de hojas y/o 15 adultos del sexo correspondiente), mientras que el otro (matraz blanco) se dejó vacío; en el tratamiento testigo, ambos permanecieron vacíos. La posición de los matraces se alternó en cada repetición. Cuando la fuente de olor correspondió a insectos, éstos se colocaron en bolsas de tul, para evitar que se movieran hacia el matraz central. Los olfatómetros se lavaron con jabón libre de fosfatos, agua destilada, alcohol etílico al 96 % y acetona, antes de las pruebas.

En cada repetición se liberaron 15 adultos hembras o machos en el matraz central, cubriendo enseguida la boca del mismo con tela de tul; no se conoció con certeza el estatus sexual de los insectos debido a que se colectaron como adultos. Mediante bombas de pecera se impulsó aire (flujo de 300 ml·min<sup>-1</sup>) hacia cada matraz lateral, a través de mangueras de plástico; en el punto de entrada de aire a cada matraz, se colocó un cartucho con adsorbente Tenax®, como filtro. El cuarto se mantuvo iluminado con una lámpara de 10 W, cuya intensidad se redujo a una quinta parte de su capacidad con un regulador automático, para simular la luminosidad crepuscular prevaleciente durante las horas de mayor actividad de los adultos. Los olfatómetros se dejaron en las condiciones descritas entre las 20:00 y las 7:00 h del día siguiente, lapso durante el cual se mantuvo en funcionamiento un extractor de aire para evacuar los volátiles del cuarto. Después de este tiempo, se contaron los insectos que eligieron el matraz tratamiento o el blanco; se consideró como elección cuando entraron completamente en alguno de los matraces.

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con dos factores (fuente de atracción y sexo de los adultos a responder) y cuatro repeticiones. Cada repetición se realizó en seis días consecutivos, aleatorizando tres tratamientos por día, de manera que el experimento se completó en un mes. Se registró el porcentaje neto de insectos atraídos hacia cada fuente de olor [(Núm. de insectos que eligieron el matraz tratamiento – Núm. de insectos que eligieron el matraz blanco) x 100 x 15<sup>-1</sup>], como variable respuesta. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SAS®, versión 9.1 (SAS Institute Inc., 2004). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias múltiple del factor que resultó significativo ( $P \leq 0.05$ ), previa comprobación de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett, respectivamente.

## Oviposición

Se evaluó la preferencia de hembras adultas para ovipositar en frutos de ocho accesiones de tejocote (66, 83, 86, 48, 11, 12, 6 y 42) provenientes del Banco de Germoplasma, mencionado anteriormente. Los frutos destinados a la evaluación se clasificaron en cuatro clases de tamaño según su diámetro ecuatorial (Cuadro 3).

The bioassays were performed in two-way olfactometers (previously described by Calyecac-Cortero *et al.*, 2006) placed upside down, which consist of a 4-L central flask and two 150-ml side ones. In one of the side flasks (treatment flask), the odor source (25 g of branches or fruits, 6 g of leaves and/or 15 adults of the corresponding sex) was placed, while the other (blank flask) was left empty; in the control treatment, both remained empty. The position of the flasks was alternated in each replicate. When the insects were the odor source, they were placed in tulle bags to prevent them from moving towards the central flask. The olfactometers were washed with phosphate-free soap, distilled water, 96 % ethyl alcohol and acetone prior to testing.

In each replicate 15 adult females or males were released into the central flask, quickly covering its mouth with tulle fabric; the sexual status of the insects was not known with certainty because they were collected as adults. Using aquarium pumps, air was sent at a rate of 300 ml·min<sup>-1</sup> into each side flask through plastic hoses; at the air intake point of each flask, a Tenax® adsorbent cartridge was placed as a filter. The room was kept illuminated with a 10-W lamp, whose intensity was reduced to a fifth of its capacity with an automatic regulator, to simulate the twilight prevailing during the peak hours of adult activity. The olfactometers were left in the conditions described between 8 p.m. and 7:00 a.m. the following day, during which time an exhaust fan was kept running to evacuate the volatiles from the room. After this time, the insects that chose the flask or blank treatment were counted; their choice was considered made when they fully entered one of the flasks.

The experiment was established in a completely randomized design with two factors (attraction source and sex of responding adults) and four replicates. Each replicate was performed in six consecutive days, randomizing three treatments per day, so that the experiment was completed in one month. The net percentage of insects attracted to each odor source [(No. of insects that chose the treatment flask – No. of insects that chose the blank flask) x 100 x 15<sup>-1</sup>] was recorded as the response variable. Statistical analyzes were performed using SAS® statistical software, version 9.1 (SAS Institute Inc., 2004). The data were subjected to analysis of variance and multiple comparison of means of the factor that was significant ( $P \leq 0.05$ ), after verification of normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively.

## Oviposition

We assessed the preference of adult females to oviposit in fruits of eight hawthorn accessions (66, 83, 86, 48, 11, 12, 6 and 42) from the afore-mentioned germplasm bank. The fruit intended for evaluation were classified into four size classes according to their equatorial diameter (Table 3).

**CUADRO 3.** Clasificación de los frutos de ocho genotipos de tejocote utilizados en el experimento de oviposición, según su tamaño, grado de madurez, dureza y contenido de azúcares.

Variable	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4
Tamaño (mm)	Grande: $\leq 16$	Mediano: 17-21	Pequeño: 22-26	Muy pequeño: $\geq 27$
Grado de madurez	Inmaduro	Madurez inicial		
Dureza (Fuerza-kg)	Baja: $\leq 15$	Alta: $> 15$		
Azúcares ( $^{\circ}$ Brix)	Bajo: $\leq 12$	Alto: $> 12$		

Se colocó un fruto de cada accesión y clase de tamaño (20 frutos en total) dentro de una jaula cilíndrica de malla de alambre, cubierta con tul, en la cual se liberaron 20 hembras de *C. crataegi* previamente apareadas. Las jaulas con los insectos se mantuvieron durante 40 h (de las 17:00 h del día del establecimiento a las 9:00 h del tercer día) en una cámara de cría a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura,  $80 \pm 10\%$  de humedad relativa y fotoperiodo de 14:10 h (luz: oscuridad). En ese lapso, una hembra oviposita aproximadamente 3.6 huevecillos (Slingerland, 1898), cantidad que se consideró apropiada para una variable ordinal. Transcurrido el tiempo señalado, los frutos se examinaron con un microscopio estereoscópico y se registró el número de huevos presentes en cada uno. Las hembras de *C. crataegi* depositan un huevo por orificio de ovipostura y no colocan un tapón en el mismo (Slingerland, 1898; Schoof, 1942), lo que generalmente permite observar el huevo sin disección del fruto; por lo anterior, el conteo se realizó con el fruto intacto o raspando superficialmente la pulpa (en los orificios de ovipostura) con una navaja. Adicionalmente, se seleccionaron al azar cuatro repeticiones del experimento; a cada fruto se le midió la resistencia a la penetración y el contenido de azúcares, con un penetrómetro Compact Gauge 200 N<sup>®</sup> (MECMESIN CE) y un refractómetro Atago 100<sup>®</sup>, respectivamente. Con dichas mediciones, se formaron las clases de dureza y contenido de azúcares del Cuadro 3.

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones. Los datos se analizaron mediante el método de Conover e Iman (1981): el número de huevos por fruto se transformó a rangos y éstos se sometieron a un análisis de varianza. Se realizaron comparaciones de medias de los rangos entre tratamientos y entre clases de las variables: accesión y especie de tejocote, época de maduración, grado de madurez, dureza y contenido de azúcares. Se ejecutó un análisis de correlación de Pearson entre los rangos del número de huevos, diámetro, resistencia a la penetración y contenido de azúcares de los frutos de las cuatro repeticiones seleccionadas.

**TABLE 3.** Classification of the fruits of eight hawthorn genotypes used in the oviposition experiment, by size, maturity status, hardness and sugars content.

Variable	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4
Size (mm)	Large: $\leq 16$	Medium: 17-21	Small: 22-26	Very small: $\geq 27$
Degree of Maturity	Immature	Initial maturity		
Hardness (force-kg)	Low: $\leq 15$	High: $> 15$		
Sugars ( $^{\circ}$ Brix)	Low: $\leq 12$	High: $> 12$		

A fruit of each accession and size class (20 fruits in total) was placed within a cylindrical, wire-mesh cage, covered with tulle, into which 20 previously-mated *C. crataegi* females were then released. The cages with insects were kept for 40 h (from 5 p.m. on the day of establishment until 9:00 a.m. of the third day) in a rearing chamber at  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  temperature,  $80 \pm 10\%$  relative humidity and a photoperiod of 14:10 h (light: dark). In that time, a female oviposits about 3.6 eggs (Slingerland, 1898), a quantity considered appropriate for an ordinal variable. After the appointed time, the fruits were examined with a stereomicroscope and the number of eggs in each was recorded. *C. crataegi* females deposit one egg per oviposition orifice and do not put a plug in it (Slingerland, 1898; Schoof, 1942), which generally allows observing the egg without dissecting the fruit; therefore, the count was performed with the fruit intact or by surface scraping the pulp (on the oviposition orifices) with a razor. Additionally, four replicates of the experiment were randomly selected; each fruit was measured for penetration resistance and sugars content with a (MECMESIN EC) Compact Gauge 200 N<sup>®</sup> penetrometer and an Atago 100<sup>®</sup> refractometer, respectively. With these measurements, the hardness and sugars content classes shown in Table 3 were formed.

The experiment was established in a completely randomized design with 10 replicates. Data were analyzed by the method described by Conover and Iman (1981): the number of eggs per fruit was transformed to ranks which were subjected to analysis of variance. Comparisons of mean ranks were performed between treatments and between classes of variables: hawthorn accession and species, maturity period, degree of maturity, hardness and sugars content. A Pearson correlation analysis was performed between the ranks of the number of eggs, diameter, penetration resistance and sugars content of the fruits used in the four selected replicates.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fuentes de atracción

El análisis de varianza mostró efectos significativos de la fuente de volátiles ( $P < 0.0001$ ,  $GL = 8$ ,  $F = 13.03$ ) en el porcentaje de adultos de *C. crataegi* atraídos. El factor sexo ( $P = 0.7448$ ,  $GL = 1$ ,  $F = 0.07$ ) y la interacción entre sexo y fuente de volátiles ( $P = 0.6989$ ,  $GL = 8$ ,  $F = 0.69$ ), no afectaron a la variable respuesta.

El fruto, tanto solo e intacto, como con hembras, machos u orificios, atrajo la mayor cantidad de insectos de ambos sexos (Cuadro 4); sin embargo, ninguna de las combinaciones superó el nivel de atracción del fruto solo. Los porcentajes de insectos atraídos hacia hojas, ramas, hembras y machos, fueron iguales a los del testigo.

Durante el experimento, hubo tres posibles estímulos sobre *C. crataegi*: los volátiles liberados por alguna parte del hospedero, compuestos producidos por hembras o machos adultos coespecíficos y la combinación de olores de los insectos con los del fruto de tejocote. Hembras y machos fueron igualmente atraídos hacia cada fuente de olores, como lo mostró el análisis de varianza, lo que sugiere un factor estimulante común para ambos sexos.

De las tres partes del hospedero evaluadas, únicamente los frutos atrajeron más adultos que el testigo, lo cual se explica porque los adultos de *C. crataegi* se alimentan y ovipositan en ellos (Slingerland, 1898; Douglas y Cowles, 2011). Durante la colecta de insectos para el presente estudio, también se les localizó con mayor frecuencia en los frutos y, en menor proporción, sobre las hojas o ramitas cercanas a éstos. Por lo tanto, es posible que la atracción de *C. crataegi* hacia los frutos esté relacionada con la búsqueda de alimento o de un lugar de reposo, y, en el caso de las hembras, de un sitio para oviposición. Dado que los insectos se dejaron sin alimento durante 30 h antes de las pruebas, la búsqueda de alimento es la opción más probable.

No existió evidencia de atracción de *C. crataegi* hacia machos o hembras de su misma especie, pues los porcentajes de adultos (de ambos sexos) que respondieron a estos estímulos, no superaron a los del testigo (Cuadro 4). En muchos casos, el efecto de los semioquímicos aumenta al conjuntar volátiles del insecto con los de su hospedero, como ocurre con la mayoría de las feromonas de agregación en especies de la familia Curculionidae (Landolt, 1997). Sin embargo, la combinación de hembras o machos de *C. crataegi* con los frutos de tejocote, no aumentó los niveles de atracción de insectos o frutos por separado (Cuadro 4). No obstante, no se descarta la posibilidad de que *C. crataegi* produzca un compuesto feromonal, ya que el estatus sexual y la edad de los insectos no se pudieron controlar, lo que quizás influyó en los resultados. Por ejemplo, las hembras apareadas del brúquido *Callosobruchus subinnotatus* (Pic) (Shu *et al.*, 1998), y probablemente también las del picudo del ciruelo *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Leskey y Prokopy, 2001), liberan menos feromona que las vírgenes;

## RESULTS AND DISCUSSION

### Sources of attraction

Analysis of variance showed significant effects of the odor source ( $P < 0.0001$ ,  $DF = 8$ ,  $F = 13.03$ ) on the percentage of *C. crataegi* adults attracted. The sex factor ( $P = 0.7448$ ,  $DF = 1$ ,  $F = 0.07$ ) and the interaction between sex and odor source ( $P = 0.6989$ ,  $DF = 8$ ,  $F = 0.69$ ) did not affect the response variable.

The fruit, both alone and intact, as with females, males or orifices, attracted the largest number of insects of both sexes (Table 4), but none of the combinations exceeded the attraction level of the fruit alone. The percentages of insects attracted to leaves, branches, females and males were equal to those of the control.

During the experiment there were three possible stimuli on *C. crataegi*: volatiles released by some part of the host, compounds produced by conspecific adult females or males and the combination of insect and hawthorn fruit odors. Males and females were equally attracted to each odor source, as shown by the analysis of variance, suggesting a stimulating factor common to both sexes.

Of the three parts of the host tested, only the fruits attracted more adults than the control, which is explained by the fact that *C. crataegi* adults feed and oviposit on them (Slingerland, 1898; Douglas and Cowles, 2011). During the collection of insects for this study, they were also more often located on the fruits and, to a lesser extent, on the leaves or branches near them. Therefore, it is possible that *C. crataegi* attraction to fruits is related to the search for food or a resting place, and, in the case of females, an oviposition site. Given that the insects were starved for 30 h before testing, the search for food is the most likely option.

There was no evidence of *C. crataegi* attraction to males or females of the same species, as the percentages of adults (of both sexes) that responded to these stimuli did not exceed those of the control (Table 4). In many cases, the effect of semiochemicals increases when combining insect volatiles with those of their host, as occurs with most aggregation pheromones in species of the family Curculionidae (Landolt, 1997). However, the combination of *C. crataegi* males or females with hawthorn fruits did not increase the attraction levels of insects or fruits separately (Table 4). However, this does not preclude the possibility that *C. crataegi* produces a pheromonal compound, as the sexual status and age of the insects could not be controlled, which may have influenced the results. For example, mated females of the bruchid *Callosobruchus subinnotatus* (Pic) (Shu *et al.*, 1998), and probably also those of the plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Leskey and Prokopy, 2001), release less pheromone than virgins; by contrast, mated females of the boll weevil *Anthonomus grandis*

en contraste, las del picudo del algodnero *Anthonomus grandis* Boheman, producen más feromona a medida que aumenta su edad (Spurgeon, 2003).

Los resultados del experimento indican que los adultos de *C. crataegi* son estimulados por compuestos volátiles liberados por los tejocotes, de igual manera que otras especies de curculiónidos, como el picudo del ciruelo (Butkewich *et al.*, 1987; Leskey y Prokopy, 2000 y 2001) y el picudo del nogal, *Curculio Caryae* (Horn) (Collins *et al.*, 1991), que son atraídos por los olores de sus frutos hospederos. Por lo tanto, es posible que los volátiles de los frutos del tejocote sirvan para identificar compuestos atrayentes de adultos de *C. crataegi*, que podrían utilizarse en el monitoreo de este insecto.

Boheman produce more pheromone with increasing age (Spurgeon, 2003).

The experiment results indicate that *C. crataegi* adults are stimulated by volatile compounds released by the hawthorn fruits, just as other species of weevils, such as the plum curculio Butkewich *et al.*, 1987; Leskey and Prokopy, 2000 and 2001) and the pecan weevil *Curculio caryae* (Horn) (Collins *et al.*, 1991), are attracted by their host-fruit odor. Therefore, it is possible that the volatiles of hawthorn fruits serve to identify attractant compounds of *C. crataegi* adults, which could be used in monitoring this insect.

**CUADRO 4. Porcentaje neto de adultos del picudo del tejocote atraídos hacia partes de su hospedero, adultos coespecíficos y combinaciones de ambos.**

Atrayente	Porcentaje de machos atraídos				Porcentaje de hembras atraídas			
	(Media ± EE <sup>2</sup> )				(Media ± EE <sup>2</sup> )			
Frutos con orificios	71.67	±	4.2	a	76.67	±	6.9	a
Frutos + hembras	70.00	±	1.4	a	75.00	±	14.5	a
Frutos + machos	71.67	±	8.3	a	63.34	±	8.4	a
Frutos	63.33	±	4.3	ab	56.67	±	6.4	ab
Ramas	30.00	±	14.0	abc	26.67	±	11.9	abc
Hojas	26.67	±	7.2	bc	25.00	±	11.0	abc
Hembras	25.00	±	10.3	bc	6.67	±	17.6	bc
Testigo	5.00	±	9.2	c	-1.67	±	5.7	c
Machos	-11.67	±	7.4	c	6.67	±	15.2	bc

<sup>2</sup> Media de cuatro repeticiones ± error estándar. Medias con distinta letra dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

**TABLE 4. Net percentage of quince curculio adults attracted to parts of their host, conspecific adults and combinations of both.**

Attractant	Percentage of males attracted				Percentage of females attracted			
	(Mean ± EE <sup>2</sup> )				(Mean ± EE <sup>2</sup> )			
Fruits with orifices	71.67	±	4.2	a	76.67	±	6.9	a
Fruits + females	70.00	±	1.4	a	75.00	±	14.5	a
Fruits + males	71.67	±	8.3	a	63.34	±	8.4	a
Fruits	63.33	±	4.3	ab	56.67	±	6.4	ab
Branches	30.00	±	14.0	abc	26.67	±	11.9	abc
Leaves	26.67	±	7.2	bc	25.00	±	11.0	abc
Females	25.00	±	10.3	bc	6.67	±	17.6	bc
Control	5.00	±	9.2	c	-1.67	±	5.7	c
Males	-11.67	±	7.4	c	6.67	±	15.2	bc

<sup>2</sup> Mean of four replicates ± standard error. Means with different letters within each column are significantly different according to Tukey's test at  $P \leq 0.05$ .

## Preferencia para oviposición

De acuerdo con el análisis de varianza, hubo efectos significativos de la accesión ( $P<0.0001$ ,  $GL=7$ ,  $F=20.82$ ) y especie de *Crataegus* ( $P<0.0001$ ,  $GL=4$ ,  $F=34.61$ ), así como de la época de maduración ( $P<0.0001$ ,  $GL=2$ ,  $F=49.92$ ), grado de madurez ( $P<0.0001$ ,  $GL=1$ ,  $F=21.06$ ), dureza ( $P<0.0001$ ,  $GL=1$ ,  $F=135.89$ ) y contenido de azúcares de los frutos ( $P<0.0001$ ,  $GL=1$ ,  $F=22.64$ ), sobre el número de huevecillos por fruto, ovipositados por *C. crataegi*.

La influencia de la accesión (Acc) fue notoria en frutos medianos y grandes, en los que las Acc's 86, 48 y 11 (de *Crataegus mexicana*) exhibieron el mayor número de oviposturas, y la Acc 66, el más bajo (Cuadro 5). En todas las Acc's, la cantidad de oviposturas aumentó en proporción directa con el tamaño del fruto, a excepción de la Acc 66, en la que disminuyó, y las Acc's 6 y 42, representadas en una sola clase (sus frutos son de ese tamaño aun en su máximo desarrollo). Los frutos medianos y grandes de la accesión 66 iniciaban su maduración al momento de la evaluación, lo cual indica que la oviposición de *C. crataegi*, en ellos, decreció conforme maduraron; la mayor frecuencia de oviposturas en frutos inmaduros, con respecto a los que se encontraban en madurez inicial (Cuadro 6), y la correlación negativa entre el número de huevos y el contenido de azúcares (Cuadro 7), apoyan esta afirmación.

La especie más ovipositada fue *Crataegus mexicana*, independientemente del diámetro del fruto. Las otras especies tuvieron igual cantidad de oviposturas en todos los tamaños (Cuadro 5).

Los frutos medianos y grandes de las Acc's intermedias tuvieron más oviposturas que los de las Acc's tempranas, posiblemente debido a que corresponden a *C. mexicana* (la especie más ovipositada por *C. crataegi* (Cuadro 5); en frutos de menor tamaño, los niveles de oviposición no difirieron entre las temporadas. Del mismo modo, la frecuencia de oviposición del picudo del ciruelo *Conotrachelus nenuphar* varía con la época de maduración de los frutos de arándano (Polavarapu *et al.*, 2004).

El número de oviposturas varió en proporción inversa al contenido de azúcares (Cuadros 6 y 7), lo que confirma la preferencia del picudo por frutos inmaduros, posiblemente porque aseguran la supervivencia de su progenie.

En todas las variables, las diferencias en la preferencia de oviposición del picudo se presentaron solamente en frutos medianos y grandes, lo que puede atribuirse a la especie de tejocote, y al tamaño y grado de madurez del fruto. El análisis de correlación reafirma la influencia de los dos últimos factores (Cuadro 7).

Es un hecho que, en frutos inmaduros, el tamaño del fruto define la frecuencia de oviposición del picudo. Por el contrario, en aquellos en proceso de maduración, el grado de madurez parece ser el factor más importante. Así, los resultados sugieren que la especie de tejocote, y el tamaño y grado de madurez del fruto, son los principales factores que determinan la preferencia de oviposición de *C. crataegi* en *Crataegus* spp. Sin embargo, es necesario dilucidar si la alta correlación entre la resistencia a la penetración y la cantidad

## Oviposition preference

According to the analysis of variance, the accession ( $P<0.0001$ ,  $DF=7$ ,  $F=20.82$ ) and species of *Crataegus* ( $P<0.0001$ ,  $DF=4$ ,  $F=34.61$ ), as well as the maturity period ( $P<0.0001$ ,  $DF=2$ ,  $F=49.92$ ), degree of maturity ( $P<0.0001$ ,  $DF=1$ ,  $F=21.06$ ), hardness ( $P<0.0001$ ,  $DF=1$ ,  $F=135.89$ ) and sugars content of the fruits ( $P<0.0001$ ,  $DF=1$ ,  $F=22.64$ ), had significant effects on the number of eggs per fruit, oviposited by *C. crataegi*.

The influence of the accession (Acc) was evident in medium and large-sized fruits, in which Accs 86, 48 and 11 (of *Crataegus mexicana*) exhibited the highest number of egg depositions, and Acc 66 the lowest (Table 5). In all accessions, the number of egg depositions increased in direct proportion to fruit size, except for Acc 66, where it decreased, and Accs 6 and 4, represented in a single class (their fruits are of that size even at their peak development). The medium to large-sized fruits of accession 66 began ripening at the time of assessment, which indicates that *C. crataegi* oviposition in them decreased as they matured; the higher frequency of egg depositions in immature fruits, compared to those in initial maturity (Table 6), and the negative correlation between the number of eggs and sugars content (Table 7), support this assertion.

The most-oviposited species was *Crataegus mexicana*, regardless of fruit diameter. The other species had the same number of egg depositions in all sizes (Table 5).

Medium and large-sized fruits of the intermediate Accs had more egg depositions than those of the early Accs, possibly because they correspond to *C. mexicana* (the most-oviposited species by *C. crataegi* (Table 5); in smaller fruits, oviposition levels did not differ between seasons. Similarly, the frequency of plum curculio (*Conotrachelus nenuphar*) oviposition varies with the maturation period of blueberries (Polavarapu *et al.*, 2004).

The number of egg depositions varied in inverse proportion to the sugars content (Tables 6 and 7), confirming the preference of the curculio for immature fruits, possibly because they ensure the survival of its progeny.

In all variables, differences in curculio oviposition preference occurred only in medium and large fruits, which can be attributed to the species of hawthorn, and the size and maturity of the fruit. Correlation analysis confirms the influence of the last two factors (Table 7).

It is a fact that, in immature fruits, fruit size defines the frequency of curculio oviposition. By contrast, for those in the maturation process, the degree of maturity seems to be the most important factor. Thus, the results suggest that the species of hawthorn and fruit size and maturity are the main factors that determine the oviposition preference of *C. crataegi* in *Crataegus* spp. However, it is necessary to de-

de oviposturas, se debe a la influencia del tamaño y grado de madurez del fruto o a un efecto independiente de su dureza.

Las diferencias en la cantidad de oviposturas entre clases de tamaño, pueden estar relacionadas con la disponibilidad de superficie en el fruto o con la existencia de algún semioquímico. Por ejemplo, varias especies de tefritidos (Nufio y Papaj, 2004; Arredondo y Díaz-Fleischer, 2006; Edmunds *et al.*, 2010) y algunos curculiónidos, como el picudo del chile *Anthonomus eugenii* (Addesso *et al.*, 2007), depositan feromonas de marcaje que disuaden o disminuyen la oviposición subsecuente. En otros casos, las heridas de alimentación u oviposición en el fruto inducen la producción de compuestos que atraen a otras hembras (Butkewich *et al.*, 1987), lo que podría favorecer la colocación de un número más alto de huevos en frutos grandes, aun cuando ya estén ovipositados, por contar con mayor superficie libre.

termine whether the high correlation between penetration resistance and the number of egg depositions is due to the influence of fruit size and maturity or to an effect independent of its hardness.

Differences in the number of egg depositions among size classes may be related to fruit surface availability or the existence of a semiochemical. For example, several species of tephritids (Nufio and Papaj, 2004; Arredondo and Díaz-Fleischer, 2006; Edmunds *et al.*, 2010) and some weevils, such as the pepper weevil *Anthonomus eugenii* (Addesso *et al.*, 2007), deposit marking pheromones that deter or decrease subsequent oviposition. In some cases, feeding or oviposition wounds in fruit induce production of compounds that attract other females (Butkewich *et al.*, 1987), which may facilitate the placement of a higher number of eggs in large fruits, even when they already have eggs, by having more free surface.

**CUADRO 5.** Número de huevecillos de *Conotrachelus crataegi* ovipositados en tejocote de cuatro clases de tamaño, en relación con la accesión, especie y época de maduración de los frutos.

Tamaño de fruto	Accesión				Especie de tejocote				Época de maduración			
	Código	Media ± EE <sup>z</sup>			N.C.	Media ± EE <sup>z</sup>			Época	Media ± EE <sup>z</sup>		
Grande	48	163.1	±15.3	a	<i>C. mexicana</i>	162.1	±11.33	a	Intermedia	162.1	±11.3	a
	86	161.9	±11.2	a	<i>C. gracilior</i>	34.5	± 0.0	e	Temprana	34.5	± 0.0	e
	11	161.4	± 7.1	a								
	66	34.5	± 0.0	f								
Mediano	86	139.8	±10.3	ab	<i>C. mexicana</i>	135.7	±14.5	ab	Intermedia	135.7	±14.5	ab
	48	138.5	±13.1	ab	<i>C. stipulosa</i>	84.6	±15.1	bcde	Temprana	73.28	±13.9	de
	11	128.8	±19.7	abc	<i>C. gracilior</i>	62.0	±12.3	cde				
	83	84.6	±15.1	bcde								
	66	62.0	±12.3	de								
Pequeño	86	131.1	±14.3	ab	<i>C. mexicana</i>	122.6	±13.2	ab	Intermedia	117.9	±13.9	bc
	11	130.1	± 8.6	abc	<i>C. nelsoni</i>	103.6	±15.5	bc	Temprana	92.08	±15.9	cd
	48	106.8	±15.5	abcd	<i>C. gracilior</i>	100.3	±15.4	bcd				
	12	103.6	±15.5	abcde	<i>C. stipulosa</i>	83.9	±16.8	bcde				
	66	100.3	±15.4	abcde								
	83	83.9	±16.8	bcde								
Muy pequeño	66	62.3	±10.7	cde	<i>C. gracilior</i>	62.3	±10.7	cde	Tardía	48.8	± 9.5	e
	12	59.8	±10.7	de	<i>C. nelsoni</i>	59.8	±10.7	cde	Intermedia	59.8	±10.7	de
	83	57.5	±12.0	de	<i>C. sp.</i>	57.5	±12.0	cde	Temprana	61.4	±11.2	de
	42	57.5	±12.0	def	<i>C. stipulosa</i>	48.8	± 9.5	de				
	6	40.0	± 5.5	ef								

<sup>z</sup> Media de los rangos del número de huevos por fruto ± error estándar. Medias con distinta letra dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una  $P \leq 0.05$ . N.C.: nombre científico.



**TABLE 5. Number of *Conotrachelus crataegi* eggs laid in four size classes of hawthorn fruit, in relation to the accession, species and fruit maturation period.**

Fruit size	Accession				Species of hawthorn				Maturation period			
	Code	Mean $\pm$ EE <sup>z</sup>			S.N	Mean $\pm$ EE <sup>z</sup>			Period	Mean $\pm$ EE <sup>z</sup>		
Large	48	163.1	$\pm$ 15.3	a	<i>C. mexicana</i>	162.1	$\pm$ 11.33	a	Intermediate	162.1	$\pm$ 11.3	a
	86	161.9	$\pm$ 11.2	a	<i>C. gracilior</i>	34.5	$\pm$ 0.0	e	Early	34.5	$\pm$ 0.0	e
	11	161.4	$\pm$ 7.1	a								
	66	34.5	$\pm$ 0.0	f								
Medium	86	139.8	$\pm$ 10.3	ab	<i>C. mexicana</i>	135.7	$\pm$ 14.5	ab	Intermediate	135.7	$\pm$ 14.5	ab
	48	138.5	$\pm$ 13.1	ab	<i>C. stipulosa</i>	84.6	$\pm$ 15.1	bcde	Early	73.28	$\pm$ 13.9	de
	11	128.8	$\pm$ 19.7	abc	<i>C. gracilior</i>	62.0	$\pm$ 12.3	cde				
	83	84.6	$\pm$ 15.1	bcde								
	66	62.0	$\pm$ 12.3	de								
Small	86	131.1	$\pm$ 14.3	ab	<i>C. mexicana</i>	122.6	$\pm$ 13.2	ab	Intermediate	117.9	$\pm$ 13.9	bc
	11	130.1	$\pm$ 8.6	abc	<i>C. nelsoni</i>	103.6	$\pm$ 15.5	bc	Early	92.08	$\pm$ 15.9	cd
	48	106.8	$\pm$ 15.5	abcd	<i>C. gracilior</i>	100.3	$\pm$ 15.4	bcd				
	12	103.6	$\pm$ 15.5	abcde	<i>C. stipulosa</i>	83.9	$\pm$ 16.8	bcde				
	66	100.3	$\pm$ 15.4	abcde								
	83	83.9	$\pm$ 16.8	bcde								
Very small	66	62.3	$\pm$ 10.7	cde	<i>C. gracilior</i>	62.3	$\pm$ 10.7	cde	Late	48.8	$\pm$ 9.5	e
	12	59.8	$\pm$ 10.7	de	<i>C. nelsoni</i>	59.8	$\pm$ 10.7	cde	Intermediate	59.8	$\pm$ 10.7	de
	83	57.5	$\pm$ 12.0	de	<i>C. sp.</i>	57.5	$\pm$ 12.0	cde	Early	61.4	$\pm$ 11.2	de
	42	57.5	$\pm$ 12.0	def	<i>C. stipulosa</i>	48.8	$\pm$ 9.5	de				
	6	40.0	$\pm$ 5.5	ef								

<sup>z</sup>Mean ranges of the number of eggs per fruit  $\pm$  standard error. Means with different letters within each column are different according to Tukey's test at  $P \leq 0.05$ . S.C.: scientific name.

**CUADRO 6. Número de huevecillos de *Conotrachelus crataegi* ovipositados en tejocote de cuatro clases de tamaño, en relación con el grado de madurez, dureza y contenido de azúcares de los frutos.**

Tamaño de fruto	Grado de madurez del fruto				Dureza del fruto				Contenido de azúcares del fruto			
	Grado	Media $\pm$ EE <sup>z</sup>			Dureza	Media $\pm$ EE <sup>z</sup>			Contenido	Media $\pm$ EE <sup>z</sup>		
Grande	Inmaduro	162.1	$\pm$ 11.3	a	Alta	162.1	$\pm$ 11.3	a	Bajo	162.1	$\pm$ 11.3	a
	Maduro <sup>y</sup>	34.5	$\pm$ 0.0	c	Baja	34.5	$\pm$ 0.0	f	Alto	34.5	$\pm$ 0.0	e
Mediano	Inmaduro	122.9	$\pm$ 16.1	b	Alta	135.7	$\pm$ 14.5	ab	Bajo	135.7	$\pm$ 14.5	ab
	Maduro	62.0	$\pm$ 12.3	c	Baja	73.3	$\pm$ 13.9	de	Alto	73.28	$\pm$ 13.9	cde
Pequeño	Inmaduro	109.1	$\pm$ 14.9	b	Alta	122.6	$\pm$ 14.9	bc	Bajo	111.1	$\pm$ 14.9	bc
					Baja	95.9	$\pm$ 15.6	cd	Alto	100.3	$\pm$ 15.4	bcd
Muy pequeño	Inmaduro	56.3	$\pm$ 10.4	c	Baja	56.0	$\pm$ 10.4	ef	Bajo	53.69	$\pm$ 10.3	e
									Alto	62.5	$\pm$ 10.7	de

<sup>z</sup>Media de los rangos del número de huevos por fruto  $\pm$  error estándar. Medias con distinta letra dentro de cada columna son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una  $P \leq 0.05$ .

<sup>y</sup>Frutos en madurez inicial.

**TABLE 6.** Number of *Conotrachelus crataegi* eggs laid in four size classes of hawthorn fruit, in relation to degree of maturity, hardness and sugars content of fruits.

Fruit Size	Degree of fruit maturity				Fruit hardness				Sugars content of the fruit			
	Degree	Mean ± EE <sup>z</sup>			Hardness	Mean ± EE <sup>z</sup>			Content	Mean ± EE <sup>z</sup>		
Large	Immature	162.1	±11.3	a	High	162.1	±11.3	a	Low	162.1	±11.3	a
	Mature <sup>y</sup>	34.5	± 0.0	c	Low	34.5	± 0.0	f	High	34.5	±0.0	e
Medium	Immature	122.9	±16.1	b	Alta	135.7	±14.5	ab	Low	135.7	±14.5	ab
	Mature	62.0	±12.3	c	Low	73.3	±13.9	de	High	73.28	±13.9	cde
Small	Immature	109.1	±14.9	b	Alta	122.6	±14.9	bc	Low	111.1	±14.9	bc
					Low	95.9	±15.6	cd	High	100.3	±15.4	bcd
Very small	Immature	56.3	±10.4	c	Low	56.0	±10.4	ef	Low	53.69	±10.3	e
									High	62.5	±10.7	de

<sup>z</sup> Mean ranges of the number of eggs per fruit  $\pm$  standard error. Means with different letters within each column are different according to Tukey's test at  $P \leq 0.05$ . S.C.: scientific name.

<sup>y</sup> Fruits in initial maturity.

**CUADRO 7.** Coeficientes de correlación de Pearson entre cuatro variables de frutos inmaduros y en madurez inicial, evaluadas en el experimento de oviposición de *Conotrachelus crataegi* en tejocote.

	Frutos inmaduros (n=72)			Frutos en madurez inicial (n=8)		
	Dureza	Azúcares	Huevos	Dureza	Azúcares	Huevos
Diámetro (mm)	0.8195***	-0.2541*	0.5915***	-0.4108 <sup>ns</sup>	0.6766 <sup>ns</sup>	-0.4783 <sup>ns</sup>
Dureza (Fuerza-kg)		-0.4424***	0.5758***		-0.6533 <sup>ns</sup>	0.5985 <sup>ns</sup>
Contenido de azúcares (° Brix)			-0.3364**			-0.2905 <sup>ns</sup>
Núm. de huevos (rangos)			—			—

<sup>ns</sup>, \*, \*\*, \*\*\*: no significativo y significativo a una  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  y  $P \leq 0.001$ , respectivamente.

**TABLE 7.** Pearson correlation coefficients between four variables of immature fruits and fruits in initial maturity, evaluated in *Conotrachelus crataegi* oviposition in hawthorn.

	Immature fruits (n=72)			Fruits in initial maturity (n=8)		
	Hardness	Sugars	Eggs	Hardness	Sugars	Eggs
Diameter (mm)	0.8195***	-0.2541*	0.5915***	-0.4108 <sup>ns</sup>	0.6766 <sup>ns</sup>	-0.4783 <sup>ns</sup>
Hardness (force-kg)		-0.4424***	0.5758***		-0.6533 <sup>ns</sup>	0.5985 <sup>ns</sup>
Sugars content (°Brix)			-0.3364**			-0.2905 <sup>ns</sup>
No. of eggs (ranks)			—			—

<sup>ns</sup>, \*, \*\*, \*\*\*: nonsignificant and significant at  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.001$ , respectively.

El grado de madurez del fruto afecta de manera diferente la preferencia de oviposición del picudo del tejocote y de la mosca de la manzana *Rhagoletis pomonella*. Tanto *C. crataegi* (Maier, 1980) como *R. pomonella* (White y Elson-Harris, 1992) tienen como hospedero original a *Crataegus*, y las larvas de ambas especies se desarrollan en el interior de sus frutos. Sin embargo, el principal factor que determina la susceptibilidad del tejocote a la oviposición por *R. pomonella* es la disminución drástica de la firmeza del fruto, que ocurre cuando éste inicia su maduración (Messina y Jones, 1990). En contraste, el número de oviposiciones de *C. crataegi* fue más alto en frutos inmaduros, de mayor dureza.

La preferencia de *C. crataegi* por *C. mexicana* podría deberse a una coadaptación del insecto, ya que ésta es una de las especies más antiguas de *Crataegus* (Phipps, 1984) y sus frutos son los más grandes en el género (Phipps *et al.*, 2003). Lo anterior representa una desventaja de las accesiones de *C. mexicana*, principal fuente de material superior para mejoramiento genético del tejocote (Nieto-Ángel *et al.*, 1997; Nuñez-Colín *et al.*, 2004). Puesto que el inicio de la maduración propicia una disminución en los niveles de oviposición del picudo, la precocidad es una característica agronómica esencial, que se debe considerar en los programas de mejoramiento del tejocote.

### CONCLUSIONES

El presente estudio permitió determinar que la mejor fuente de atracción de adultos de *Conotrachelus crataegi* fue el fruto del tejocote, por lo que podría utilizarse para identificar volátiles atrayentes de este insecto.

Asimismo, se encontró que el tamaño y grado de madurez del fruto de tejocote fueron los principales factores que determinaron el nivel de oviposición del picudo, y que las frecuencias de oviposición más altas ocurrieron en frutos inmaduros, de tamaño mediano y grande, de la especie *Crataegus mexicana*.

### LITERATURA CITADA

- ADESSO, K. M.; MCAUSLANE, H. J.; STANSLY, P. A.; SCHUSTER, D. J. 2007. Host marking by female pepper weevils, *Anthonomus eugenii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 125: 269-276.
- AGUIRRE-MANDUJANO, E.; NIETO-ÁNGEL, R.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L.; SÁNCHEZ-GUZMÁN, M.; PÉREZ-ALONSO, C.; CUEVAS-BERNARDINO, J.C. 2010. Caracterización de pectinas de tejocote (*Crataegus* spp). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. 69 p.
- ALM, S. R.; HALL, F. R. 1986. Antennal sensory structures of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 79: 324-333.
- ANÓNIMO, 2004. El Cultivo del Tejocote en Puebla. OPF-RE-01 edición 001. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Puebla (CESAVEP). Puebla, México. 25 p.
- ANÓNIMO, 2009. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Sistema de Información y Estadística Agrícola y Pesquera (SIAP), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. En línea: [http://www.siap.gob.mx/aagricola\\_siap/icultivo/index.jsp](http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp)
- ARREDONDO, J.; DÍAZ-FLEISCHER, F. 2006. Oviposition deterrents for the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) from fly faeces extracts. *Bulletin of Entomological Research* 96: 35-42.
- BEERS, E. H.; KLAUS, M. W.; HEBHARD, A.; COCKFIELD, F.; ZACK, R.; O'BRIEN, C. W. 2003. Weevils attacking fruit trees in Washington. Proceedings of the 77<sup>th</sup> Annual Western Orchard Pest and Disease Management Conference. Washington State University. Pullman, Washington, USA. 35 p.
- BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A. 2011. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects-finding the right mix. *Phytochemistry* 72: 1605-1611.
- The degree of fruit maturity affects differently the oviposition preference of the quince curculio and the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. Both *C. crataegi* (Maier, 1980) and *R. pomonella* (White and Elson-Harris, 1992) have *Crataegus* as their original host, and the larvae of both species develop inside the fruit. However, the main factor that determines the susceptibility of hawthorn to oviposition by *R. pomonella* is the drastic decrease in fruit hardness that occurs when it begins its maturation (Messina and Jones, 1990). By contrast, the number of *C. crataegi* egg depositions was higher in immature fruits of greater hardness.
- The preference of *C. crataegi* for *C. mexicana* could be due to a coadaptation of the insect, as it is one of the oldest species of *Crataegus* (Phipps, 1984) and its fruits are the largest in the genus (Phipps *et al.*, 2003). This represents a disadvantage of the *C. mexicana* accessions, the main source of superior material for hawthorn breeding (Nieto-Ángel *et al.*, 1997; Nuñez-Colín *et al.*, 2004). Since the onset of ripening promotes a decrease in curculio oviposition levels, earliness is an essential agronomic characteristic that must be considered in hawthorn breeding programs.

### CONCLUSIONS

This study determined that the best source of attraction for *Conotrachelus crataegi* adults was hawthorn fruit, so it could be used to identify attractant volatiles of this insect.

We also found that hawthorn fruit size and degree of maturity were the main factors that determined the level of quince curculio oviposition, and that the highest oviposition frequencies occur in immature fruits, both medium and large-sized, of the species *Crataegus mexicana*.

### End of English Version

- BUTKEWICH, S.; PROKOPY, R. J.; GREEN, T. A. 1987. Discrimination of occupied host fruit by plum curculio females (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Chemical Ecology* 13(8): 1833-1841.
- CALYECAC-CORTERO, H. G.; CIBRIÁN-TOVAR, J.; LÓPEZ-COLLADO, J.; GARCÍA-VELAZCO, R. 2006. Emisores de los volátiles de atracción de *Trichobaris championi* Barber. *Agrociencia* 40 (5): 655-663.
- COLLINS, J. K.; MULDER, F. G.; GRANTHAM, R. A.; REID, W. R.; SMITH, M. W.; EIKENBARY, R. D. 1991. Assessing feeding preference of pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae) adults using a hardie olfactometer. *Journal of the Kansas Entomological Society* 70(3): 181-188.
- CONOVER, W. J.; IMAN, R. L. 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35(3): 124-133.
- DOUGLAS, S. M.; COWLES, R. S. 2011. Plant pest handbook, a guide to insects, diseases and other disorders affecting plants. Pear (*Pyrus*). Quince (*Cydonia*) The Connecticut Agricultural Experiment Station. Connecticut, USA. En línea: <http://www.ct.gov/caes/cwp/view.asp?a=2826&q=378182&caesNav=1>
- EDMUNDS, A. J.; ALUJA, M.; DÍAZ-FLEISCHER, F.; PATRIAN, B.; HAGMANN, L. 2010. Host marking pheromone (HPM) in the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. *Chimia (Aarau)* 64(1-2): 37-42.
- FRANCO-MORA, O.; AGUIRRE-ORTEGA, S.; MORALES-ROSALES, E. J.; GONZÁLEZ-HUERTA, A.; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, F. 2010. Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana* DC.) de Lerma y Ocoyoacac, México. *CIENCIA Ergo Sum* 17(1): 61-66.
- GARCÍA, R. M. J.; OSORIO, R. O. 2000. El uso de semioquímicos en el control de plagas de hortalizas. In: *Temas Seleccionados en Fitosanidad y Producción de Hortalizas*, pp. 76-82. Bautista, M. N.; Suárez-V, A. D.; Morales-G, O. (eds.) Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Estado de México, México.
- GONZÁLEZ-GAONA, E.; PADILLA-RAMÍREZ, J. S.; REYES-MURO, L.; PERALES-DE LA CRUZ, M. A.; ESQUIVEL-VILLAGRANA, F. 2002. Guayaba, su Cultivo en México. Libro técnico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, México. 182 p.
- HILL, D. S. 1987. Agricultural insect pests of temperate regions and their control. Cambridge University Press. New York, USA. p. 566.
- KISSINGER, D. G. 1964. Curculionidae of America North of Mexico, a Key to the Genera. Taxonomic Publications. South Lancaster, Massachusetts, USA. 143 p.
- LAFLEUR, G.; HILL, S. B. 1987. Spring migration, within-orchard dispersal, and apple-tree preference of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Southern Quebec. *Journal of Economic Entomology* 80(6): 1173-1187.
- LANDOLT, P. J. 1997. Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. *American Entomologist* 43: 12-21.
- LESKEY, T. C.; PROKOPY, R. J. 2000. Sources of apple odor attractive to adult plum curculios. *Journal of Chemical Ecology* 26(3): 639-653.
- LESKEY, T. C.; PROKOPY, R. J. 2001. Adult plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) attraction to fruit and conspecific odors. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94(2): 275-288.
- MAIER, C. 1980. Quince curculio, *Conotrachelus crataegi* Walsh (Coleoptera: Curculionidae), developing in apple, a new host, in southern New England. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 82(1): 59-62.
- MAIER, C. T. 1990. Native and exotic rosaceous hosts of apple, plum and quince curculio larvae (Coleoptera: Curculionidae) in Northeastern United States. *Journal of Economic Entomology* 83:1326-1332.
- MESSINA, F. J.; JONES, V. P. 1990. Relationship between fruit phenology and infestation by the apple maggot (Diptera: Tephritidae) in Utah. *Annals of the Entomological Society of America* 83(4): 742-752.
- METCALF, R. L.; METCALF, E. R. 1992. Plant Kairomones in Insect Ecology and Control. Chapman & Hall Inc. New York, USA. 177 p.
- NIETO-ÁNGEL, R. 2007. Colección, conservación y caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). En: *Frutales nativos, un recurso fitogenético de México*. Nieto-Angel, R. (Ed.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. pp. 25-118.
- NIETO-ÁNGEL, R.; ORTÍZ, J.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; BORYS, M. W. 1997. Endocarp morphology as an aid for discriminating wild and cultivated Mexican hawthorns (*Crataegus mexicana* Moc & Sessé). *Fruits* 52: 317-324.
- NIETO-ÁNGEL, R.; PÉREZ-ORTEGA, S. A.; NUÑEZ-COLÍN, C. A.; MARTÍNEZ-SOLÍS, J.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2009. Seed and endocarp traits as markers of the biodiversity of regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from Central and Southern Mexico. *Scientia Horticulturae* 121: 166-170.
- NUFIO, C. R.; PAPA, D. R. 2004. Host-marking behaviour as a quantitative signal of competition in the walnut fly *Rhagoletis juglandis*. *Ecological Entomology* 29(3): 336-344.
- NUÑEZ-COLÍN, C. A.; NIETO-ÁNGEL, R.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F.; SAHAGÚN-CASTELLANOS, J.; SEGURA, S.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2008. Variability of three regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 1159-1165.
- NUÑEZ-COLÍN, C. A.; NIETO-ÁNGEL, R.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F.; SEGURA, S.; SAHAGÚN-CASTELLANOS, J.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2008a. Distribución y caracterización ecológica del género *Crataegus* (Rosaceae subfam. Maloidea) en México. *Revista Chapingo serie Horticultura* 14: 177-184.
- NUÑEZ-COLÍN, C. A.; PÉREZ-ORTEGA, S. A.; SEGURA, S.; NIETO-ÁNGEL, R.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F. 2004. Variabilidad morfológica del tejocote (*Crataegus* spp.) en México. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 48: 144-148.
- OSORIO-OSORIO, R.; CIBRIÁN-TOVAR, J.; LÓPEZ-COLLADO,



- J.; CORTÉZ-MADRIGAL, H.; CIBRIÁN-TOVAR, D. 2003. Exploración de factores para incrementar la eficiencia de captura de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Folia Entomologica Mexicana* 42(1): 27-36.
- PHIPPS, J. B. 1984. Problems of hybridity in the cladistics of *Crataegus* (Rosaceae). In: *Plant Biosystematics*. Grant, W. F. (ed.). Acad. Press Can. Toronto, Canadá. pp. 417-438.
- PHIPPS, J. B. 1997. Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, subfam. Maloideae). *SIDA Botanical Miscellany* 15: 1-94.
- PHIPPS, J. B.; O'KENNON, R. J.; LANCE, R. W. 2003. Hawthorns and Medlars. Royal Horticultural Society Plant Collector Guide. Timber Press. Portland, USA. 139 p.
- POLAVARAPU, S.; KYRYCZENKO-ROTH, V.; BARRY, J. D. 2004. Phenology and infestation patterns of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) on four highbush blueberry cultivars. *Journal of Economic Entomology* 97(6): 1899-1905.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. North Carolina, USA. 5136 p.
- SCHOOFF, H. F. 1942. The Genus *Conotrachelus* Dejean (Coleoptera: Curculionidae) in the North Central United States. Contribution from the Entomological Laboratories of the University of Illinois No. 223. The University of Illinois Press Urbana. Illinois, USA. 170 p.
- SHU, S.; MBATA, G. N.; RAMASWAMY, S. B. 1998. Female sex pheromone in *Callosobruchus subinnotatus* (Coleoptera; Bruchidae): production and male response. *Annals of the Entomological Society of America* 91: 840-844.
- SLINGERLAND, M. V. 1898. The quince curculio. Bulletin 148. Cornell University Agricultural Station, Ithaca, N. Y. New York, USA. pp. 693-715.
- SPURGEON, D. W. 2003. Age dependence of pheromone production by the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 32(1): 31-38.
- WELLHOUSE, W. H. 1922. The Insect Fauna of the Genus *Crataegus*. Doctor of Philosophy Thesis. Reimpreso de: Cornell University Agricultural Station Memoir 56, Ithaca, N. Y. New York, USA. pp. 1045-1136.
- WHITE, I. M.; M. M. ELSON-HARRIS. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: their Identification and Bionomics. CAB International and The Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Redwood Press LTD. Melksham, UK. 624 p.