



# Aspectos químicos y biológicos de la comunicación química en *Cryptoblabe gnidiella* (Lepidoptera: Pyralidae)

Tesis de Maestría en Química

Qca. María Carolina Sellanes

Orientador Dr. Andrés González

Laboratorio de Ecología Química, Departamento  
de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR

Octubre 2011

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	9
<b>ESTRUCTURA DE LA TESIS</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1- Los insectos y la comunicación química .....	11
1.1- Feromonas sexuales en lepidópteros .....	12
1.1.1- Química .....	12
1.1.2- Producción y recepción.....	13
1.1.3- Usos en el manejo de insectos plaga .....	15
1.1.4- Uso de feromonas sexuales en Uruguay .....	19
1.2- Análogos de feromonas sexuales y su uso en el manejo de plagas .....	20
1.3- Kairomonas y su potencial en el manejo de plagas.....	23
2- <i>Cryptoblabes gnidiella</i> y el sector vitivinícola.....	29
3- Bibliografía .....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	36
Objetivo específico 1 : CAPÍTULO 1.....	36
Objetivo específico 2 : CAPÍTULO 2.....	36
Objetivo específico 3 : CAPÍTULO 3.....	36
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	37
OBJETIVO.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
1- Síntesis química .....	38
1.1- Síntesis de la feromona sexual de <i>C. gnidiella</i> .....	38
1.2- Síntesis de los análogos de la feromona sexual de <i>C. gnidiella</i> .....	38
2- Insectos.....	40

3- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de machos de <i>C. gnidiella</i> .....	41
4- Estudio de inhibición sensorial .....	42
5- Estudio de comportamiento de machos de <i>C. gnidiella</i> en túnel de viento.....	43
RESULTADOS .....	46
1- Síntesis química .....	46
1.1- Síntesis de la feromona sexual de <i>C. gnidiella</i> .....	46
1.2- Síntesis de los análogos de la feromona sexual de <i>C. gnidiella</i> .....	47
2- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de machos de <i>C. gnidiella</i> .....	48
3- Estudio de inhibición sensorial .....	49
4- Estudio de comportamiento de machos de <i>C. gnidiella</i> en túnel de viento.....	50
DISCUSIÓN .....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXO .....	58
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>70</b>
OBJETIVO.....	70
MATERIALES Y MÉTODOS .....	71
1- Evaluación de la actividad inhibitoria de los formiatos a campo .....	71
2- Evaluación de la eficiencia de los formiatos como método de control.....	73
2.1- Fecha de inicio del experimento.....	74
2.2- Diseño del experimento.....	74
2.3- Muestreo de la población de <i>C. gnidiella</i> .....	76
2.4- Evaluación de daño.....	77
RESULTADOS.....	79
1- Evaluación de la actividad de los formiatos a campo .....	79
2- Evaluación de la eficiencia de los formiatos como método de control.....	82
2.1- Fecha de inicio del experimento.....	82
2.2- Muestreo de la población de <i>C. gnidiella</i> .....	83

2.3- Evaluación de daño .....	85
DISCUSIÓN .....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	90
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>91</b>
OBJETIVO.....	91
MATERIALES Y MÉTODOS .....	92
1- Colecta de volátiles en <i>vivo</i> y preparación de muestra para análisis .....	92
2- Análisis de compuestos volátiles de uva mediante GC-MS .....	93
3- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de hembras de <i>C. gnidiella</i> .....	95
RESULTADOS .....	96
1- Análisis de compuestos volátiles de uva mediante GC-MS .....	96
2- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de hembras de <i>C. gnidiella</i> .....	99
DISCUSIÓN .....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	103
ANEXO .....	105
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>118</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de un pelo sensorial de la antena de un insecto. ....	15
<b>Figura 2.</b> <i>Cryptoblabes gnidiella</i> , lepidóptero plaga de viñedos uruguayos. A) Insecto adulto. B) Larva en un racimo de uva junto a excrementos y tela de seda. ....	29
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de racimos dañados por <i>Cryptoblabes gnidiella</i> en dos variedades de uva. Evaluación de 80 racimos/variedad, un racimo dañado contiene al menos 1 individuo de <i>C. gnidiella</i> , * indica diferencia significativa ( $P < 0.001$ , $\chi^2$ , datos de I.B. Scatoni, Facultad de Agronomía, UdelaR). ....	30
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de racimos dañados y fluctuación de la población de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> , en dos variedades de uva, durante la temporada 2006/2007. A) Ver Fig. 3. B) Monitoreo de la población de machos adultos con trampas de feromona, la flecha indica el momento de evaluación de daño, no existe diferencia significativa entre las poblaciones de adultos según ANOVA factorial (datos de I.B. Scatoni, Facultad de Agronomía, UdelaR). ....	31
<b>Figura 5.</b> Insectos colectados de un viñedo infestado en la localidad de Juanicó (Canelones, 34°34' S, 56°15' O). A) Racimos de uva remanentes en la viña, B) larva de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> , C) pupa de <i>C. gnidiella</i> . ....	40
<b>Figura 6.</b> Cromatografo de gases acoplado a un detector de electroantenograma (GC-EAD). ....	41
<b>Figura 7.</b> Antena de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> suspendida entre dos electrodos mediante gel conductor. ....	42
<b>Figura 8.</b> Sistema diseñado para estudiar el efecto de pre-exposición a formiatos, en la respuesta a ambos componentes de la feromona. ....	43
<b>Figura 9.</b> Túnel de viento. ....	44
<b>Figura 10.</b> Hembra de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> en postura de llamada dentro de un tubo de vidrio; encima del mismo se encuentra el septo conteniendo una mezcla 1:1 de formiatos. ....	45
<b>Figura 11.</b> Respuesta electrofisiológica (EAD) de la antena de un macho de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> a una co-inyección de uno de los componentes de la feromona y su correspondiente formiato análogo: A) (Z)-11-hexadecenal y formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo, y B) (Z)-13-octadecenal y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo. EAD = detector de electroantenograma; FID = detector de ionización por llama. ....	49

<b>Figura 12.</b> Comparación de la magnitud de las respuestas electrofisiológicas (EAD) de antenas de machos de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> a los componentes de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal (Z-11:16Ald) y (Z)-13-octadecenal (Z-13:18Ald), luego de la pre-exposición a vapores de formiatos análogos de la feromona (barras blancas) o al control (barras negras). Las respuestas se expresan como la altura de pico de la señal de la antena (en unidades arbitrarias). N= 10 antenas/tratamiento, provenientes de diferentes machos. Las barras de error indican error estándar de la media, P> 0.3 para ambos componentes de la feromona (test de Mann-Whitney). .....	50
<b>Figura 13.</b> Respuesta comportamental de machos de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> en túnel de viento a diferentes fuentes de olor: hexano (control), 50 µg de formiatos (1:1), 50 µg de feromona (1:1) o 50 µg de feromona más 50 µg de formiatos (ambos 1:1). N= 15 machos/tratamiento. Los asteriscos indican respuestas diferentes entre pares de tratamientos (test de $\chi^2$ ; P< 0.01). A) Vuelo en pluma y B) llegada a fuente de olor. ....	51
<b>Figura 14.</b> Comportamiento de cortejo de un macho de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> , exhibiendo el cepillo de pelos, cuando contactó un septo conteniendo feromona sexual. ....	52
<b>Figura 15.</b> Respuesta comportamental de machos de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> en túnel de viento a diferentes fuentes de olor: hexano (control, N= 15), hembras vírgenes llamando (N= 20), o hembras vírgenes llamando más un septo con 50 µg de formiatos (1:1) (N= 15). Los asteriscos indican respuestas diferentes a pares de tratamientos (test de $\chi^2$ ; P< 0.01). A) Vuelo en pluma y B) llegada a fuente de olor.....	53
<b>Figura 16.</b> Comportamiento de cortejo de macho de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> cuando alcanzó el tubo de vidrio conteniendo una hembra llamando.....	53
<b>Figura 17.</b> Estructuras químicas de los componentes de la feromona sexual de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> , (Z)-11-hexadecenal y (Z)-13-octadecenal, y sus respectivos análogos estructurales, formiato de .....	54
<b>Figura 18.</b> Trampa delta de plástico corrugado, con piso engomado; el septo cuelga de un alambre dentro de la trampa.....	71
<b>Figura 19.</b> Diseño del experimento a campo, realizado desde mediados de enero hasta principios de marzo de 2010, en un viñedo comercial de la localidad de Juanicó, con el fin de evaluar la actividad inhibitoria de los formiatos. Cada bloque incluye los 6 tratamientos de mezclas feromona:formiatos evaluadas.....	72
<b>Figura 20.</b> Capturas promedio de machos de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> durante 6 semanas del experimento realizado en el verano 2010.....	73
<b>Figura 21.</b> Dispensadores de análogos de feromona utilizados en el experimento de campo para evaluar la eficiencia de los mismos como método de control de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> .	

Izquierda: vista inferior donde se observa el septo de goma; centro: vista lateral del dispensador con su vaso protector colgado a la altura de los racimos de uva; derecha: arreglo de los dispensadores a 2.5 m de distancia en una fila de la variedad de vid Gewürztraminer.....75

**Figura 22.** Diseño del experimento a campo realizado en un viñedo comercial de la localidad de Juanico, Canelones, desde mediados de enero hasta principios de abril, con el fin de evaluar la eficiencia de análogos de feromona en el control de *Cryptoblabes gnidiella*.....75

**Figura 23.** Trampa de alimentación.....77

**Figura 24.** Evaluación de daño realizada para determinar si el tratamiento con análogos de feromona fue eficiente como método de control de *Cryptoblabes gnidiella* en vid. Izquierda: revisión exhaustiva de racimos bajo lámpara, evaluando la presencia de larvas, prepupas o pupas; derecha arriba: racimo infestado donde se observa una larva y excrementos de la misma; derecha abajo: racimo completamente desgranado.....78

**Figura 25.** Promedio de capturas semanales (seis semanas) de machos de *Cryptoblabes gnidiella* durante el experimento a campo en donde se compararon diferentes relaciones de feromona sintética y formiatos. Letras diferentes indican medias diferentes (test de Tukey;  $p < 0.05$ ). .....80

**Figura 26.** Capturas de machos de *Cryptoblabes gnidiella* en trampas con diferentes tratamientos (relaciones de feromona y formiatos). A) feromona (tratamiento 1:0). B) tratamiento 5:1. C) tratamiento 1:1. ....80

**Figura 27.** Capturas semanales (promedio de bloques) de machos de *Cryptoblabes gnidiella* durante el experimento a campo con diferentes relaciones de feromona sintética y formiatos. A) Capturas de machos a lo largo del tiempo. B) Capturas acumuladas de machos a lo largo del tiempo. Solo se muestran los tratamientos 1:0, 5:1 y 1:1 (semana 1= 27 de enero, 2010; las barras de error indican desviación estándar, \* indican diferencias entre tratamientos (test de Tukey;  $p < 0.05$ ). .....81

**Figura 28.** Muestreo de la población de machos de *Cryptoblabes gnidiella* con trampas de feromona, antes de comenzar el experimento. ....82

**Figura 29.** Grados días acumulados desde el 30 de noviembre de 2010. El día 22 de enero de 2011 se cumplieron los 570 GD. ....83

**Figura 30.** Capturas promedio de machos de *Cryptoblabes gnidiella* durante las 11 semanas del experimento (28 de enero – 7 de abril) evaluando el efecto de los formiatos liberados desde 1000 septos, en un cuadro de 0.7 hectáreas (cuadro tratamiento). Las flechas indican los momentos en los que se realizaron las evaluaciones de daño.....84

<b>Figura 31.</b> Número total de <i>Cryptoblabes gnidiella</i> (larvas, pre-pupas, pupas y exuvias de pupas) en 100 racimos, para ambos cuadros (control y tratamiento). * indica tratamientos significativamente diferentes (test de $\chi^2$ , $P < 0.001$ ).....	85
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de racimos dañados por <i>Cryptoblabes gnidiella</i> en ambos cuadros (tratamiento y control). Evaluación de 100 racimos/cuadro, un racimo dañado contiene al menos 1 individuo de <i>C. gnidiella</i> , * indica tratamientos significativamente diferentes (test de $\chi^2$ , $P < 0.025$ ) .....	86
<b>Figura 33.</b> Número de insectos <i>Cryptoblabes gnidiella</i> por racimo infestado. Las barras de error indican error estándar de la media. * indica tratamientos significativamente diferentes (test de Mann-Whitney, $P < 0.03$ ) .....	86
<b>Figura 34.</b> Sistema de colecta de volátiles en vivo .....	92
<b>Figura 35.</b> Volátiles emitidos por flores según grupos funcionales, expresados como ng equivalentes de tridecano por gramo de material vegetal muestreado, colectados durante 20 horas en la temporada 2009/2010. ....	97
<b>Figura 36.</b> Variación en la emisión de volátiles de dos variedades de uva, Gewürztraminer y Tannat, a lo largo de la temporada. A) 2009-2010 primer temporada. B) 2010-2011 segunda temporada. ....	98
<b>Figura 37.</b> Representación gráfica de los volátiles emitidos por Gewürztraminer al final de la temporada (uva madura).....	99



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero decirle a mis padres: MUCHAS GRACIAS!!! Gracias por apoyarme siempre en mis estudios y en todo lo que emprendo. Gracias por enseñarme todo para ser quien soy!

A mis hermanos, cuñados y sobrinos, porque son la mejor familia que me podría haber tocado! Gracias por estar siempre! Los quiero mucho!

A mis amigos de la vida: Romina, Natalia, Flavia, Antonela, Gonzalo y Juan Pablo; y a mis "amigas del laboratorio": María, Martina, Lucía y Paula.

Gracias a todos por apoyarme, por escucharme, por darme consejos, por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas!!! A María, un agradecimiento especial, porque ha estado estos años siempre a mi lado, ayudándome todos los días, dentro y fuera del laboratorio! Gracias por ser mi amiga!

Quiero agradecer a mi tutor Andrés, por contribuir fuertemente en mi educación y no solo en la profesional sino también en mi educación personal.

A Carmen por estar presente en todo mi laburo, dándome ideas y apoyándome.

Gracias a los dos, por darme un espacio en el laboratorio, por enseñarme, por ayudarme y por sobre todo por ser excelentes personas conmigo.

A Verónica R, Estela, Valeria, Soledad, Irene, Paola, Manuel, Nicolás, Florencia P. y todos los chicos nuevos del laboratorio. Mil gracias por todos los días compartidos, por su ayuda!!!

A Gustavo Seoane, Beatriz Scatoni y Jan Bergmann por aceptar ser miembros de mi tribunal de tesis. Especialmente a Beatriz Scatoni por responder a todas y cada una de las preguntas que surgían durante mi trabajo, por sus valiosos aportes.

A Horacio Pezaroglo por los espectros de RMN, a Ignacio Carrera y Daniela Gamenara por sus aportes en la síntesis química.

A la Facultad de Química, mi casa de estudios donde crecí, aprendí y conocí mucha gente hermosa.

Al Establecimiento Juanicó por permitirme ingresar libremente a sus viñedos, realizar los experimentos a campo y las colectas de volátiles, en particular al Ing. Agr. Gustavo Blumetto.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar mis estudios de posgrado, asistencia a cursos, pasantías en el exterior y recientemente por la financiación de un proyecto (fondo María Viñas) en esta temática.

A PEDECIBA Química por financiar mi asistencia a pasantías.

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

Ésta tesis se compone de cinco partes: una **introducción**, **tres capítulos** y las **conclusiones generales**. La **introducción** consta de conceptos y conocimientos previos vinculados al tema de la tesis, incluyendo generalidades de la comunicación química en insectos e información específica de la especie con la que se trabajó experimentalmente (*Cryptoblabes gnidiella*, Lepidoptera: Pyralidae). **Cada capítulo** comprende un objetivo específico de la tesis, incluyendo materiales y métodos, resultados, discusión y la bibliografía correspondiente. Los primeros dos capítulos tratan del estudio de análogos estructurales de la feromona sexual de *C. gnidiella*; en el primero se detallan los experimentos de laboratorio en los que se estudió la respuesta electrofisiológica y comportamental de los machos a los análogos, mientras que en el segundo se incluyen los experimentos a campo realizados en dos temporadas, donde se evaluó el potencial de los análogos en el control de dicha plaga en viñedos. El tercer capítulo comprende el estudio de compuestos orgánicos volátiles emitidos por diferentes estadios de dos variedades de uvas, y su posible vinculación a la selección de sitios de oviposición por parte de las hembras de *C. gnidiella*. Por último, se presentan las **conclusiones generales**, donde se discuten los principales resultados obtenidos.

# INTRODUCCIÓN

## 1- Los insectos y la comunicación química

La comunicación es un proceso fundamental que determina las interacciones entre los organismos en la Naturaleza. Los animales utilizan diferentes canales de comunicación como el acústico, visual, táctil, eléctrico, sísmico y químico; entre éstos, el canal químico es el más antiguo y es compartido por una gran diversidad de organismos. Los compuestos químicos que median la comunicación entre organismos son denominados semioquímicos. Estas señales químicas (o semioquímicos) tienen varias ventajas en la comunicación de largo alcance, incluyendo el hecho de tienen bajo costo de producción, son efectivas en pequeñas cantidades, no son fácilmente “espiadas” por depredadores y traspasan barreras físicas, pudiendo ser transportadas largas distancias por el viento [1]. Las señales químicas participan en muchos aspectos de la vida de los organismos y sus interacciones ecológicas. La disciplina Ecología Química trata de explicar estas interacciones, identificando y definiendo los compuestos químicos involucrados, y estableciendo cómo la percepción de estos compuestos modifica el comportamiento y la fisiología de los organismos, las interacciones con otros organismos y por último el éxito reproductivo o valor adaptativo de los procesos de comunicación química para los organismos participantes [2].

Los semioquímicos pueden ser clasificados en dos categorías, aleloquímicos y feromonas, según si participan en comunicación inter (entre organismos de diferentes especies) o intraespecífica (entre organismos de la misma especie), respectivamente. Los aleloquímicos a su vez se dividen en tres grupos dependiendo de si son beneficiosos para el emisor y/o el receptor de la señal [3, 4]. Las kairomonas son aquellos aleloquímicos cuya recepción confiere una ventaja adaptativa para el organismo receptor; incluyen atrayentes, fagoestimulantes y otras sustancias que median el encuentro de los predadores con su presa, de los herbívoros con sus plantas hospederas y de los parasitoides con sus hospederos. Las alomonas son sustancias químicas que provocan en el receptor una respuesta comportamental o fisiológica favorable adaptativamente para el emisor. Ejemplos

de alomonas incluyen sustancias tóxicas utilizadas como defensas frente a depredadores [5]. Los aleloquímicos que benefician tanto al emisor como al receptor de la señal son llamados sinomonas, y un ejemplo de éstas son las esencias de las flores que atraen a sus polinizadores [4]. Las feromonas son señales químicas producidas por un organismo que, aún en pequeñas cantidades, pueden provocar una respuesta comportamental o fisiológica en otro organismo de la misma especie [6]. Las feromonas tienen un amplio rango de funciones incluyendo, entre otras, el encuentro de los sexos para la reproducción, la atracción de con-específicos para la explotación de un recurso, la advertencia de un peligro inminente o el marcado de territorios.

El estudio de semioquímicos se ha desarrollado especialmente en insectos; el grupo de organismos más diverso a nivel de especie, y que se caracteriza por utilizar señales químicas en diversos contextos ecológicos. Asimismo, muchas especies de insectos ocasionan graves perjuicios en cultivos agrícolas o transmiten enfermedades al hombre y animales de producción, por lo que el estudio de procesos de comunicación química en insectos posee potencial en el desarrollo de métodos de manejo de insectos perjudiciales.

## **1.1- Feromonas sexuales en lepidópteros**

### **1.1.1- Química**

Las feromonas sexuales son compuestos generalmente volátiles, emitidos por individuos adultos para atraer al sexo opuesto con fines reproductivos [3, 7]. La estructura y estereoquímica de los diferentes componentes de la feromona, así como sus proporciones relativas en la mezcla, son algunos de los aspectos que determinan una característica fundamental de las feromonas: la especie-especificidad. La estereoquímica es un aspecto clave, tanto en la configuración de olefinas como en la pureza enantiomérica de compuestos quirales. Tanto es así que se han reportado especies de insectos que utilizan distintos enantiómeros de un mismo compuesto como feromona, siendo el enantiómero incorrecto antagonista de la respuesta [4, 8].

En el orden Lepidoptera (mariposas y polillas), las feromonas sexuales son en general emitidas por las hembras para atraer a los machos desde distancias que pueden alcanzar cientos de metros. Los lepidópteros conforman el segundo orden más diverso en insectos, con aproximadamente 150.000 especies descritas, muchas de ellas importantes plagas agrícolas y forestales. Las feromonas sexuales de lepidópteros han sido extensamente estudiadas, y se clasifican de acuerdo a su estructura química en tres grandes grupos: de tipo I que comprende alrededor del 75 % de las feromonas identificadas, de tipo II (15 %) y misceláneas (10 %). Las feromonas de tipo I incluyen alcoholes primarios, acetatos o aldehídos de cadena larga ( $C_{10} - C_{18}$ ), generalmente con 1 o 2 insaturaciones; las de tipo II comprenden hidrocarburos poliinsaturados y epóxidos, de cadenas más largas ( $C_{17} - C_{23}$ ) sin grupo funcional en posición terminal, y las misceláneas son aquellas que no se encuentran incluidas en ninguno de los dos grupos anteriores [7, 9].

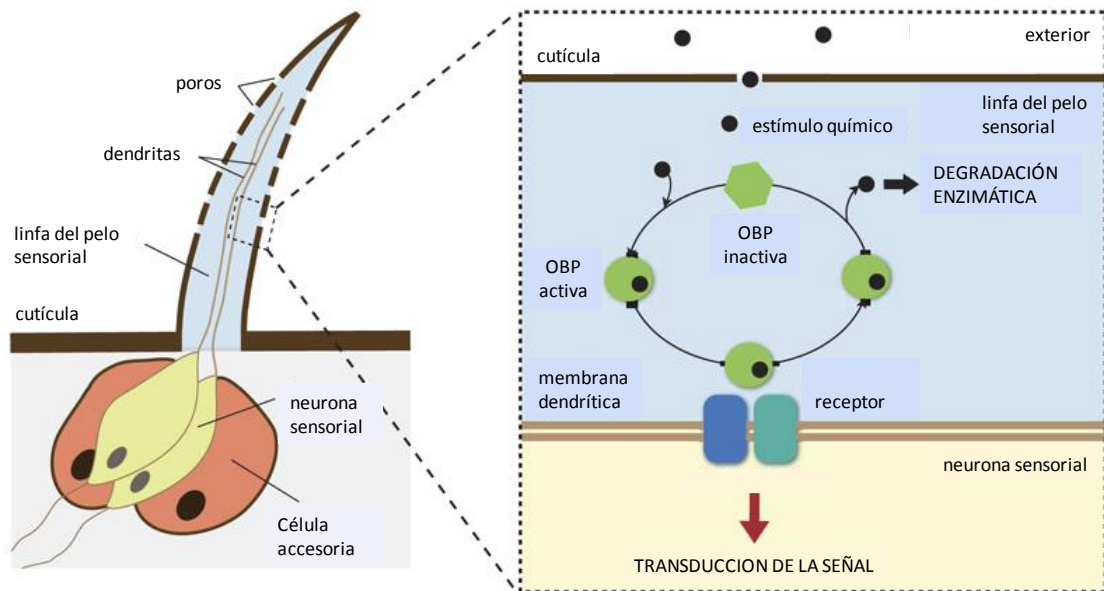
### **1.1.2- Producción y recepción**

La producción de feromonas en lepidópteros involucra estructuras glandulares especializadas localizadas en el extremo abdominal, donde ocurre la biosíntesis y emisión de la feromona al ambiente [10]. La mayoría de las feromonas sexuales de lepidópteros pueden biosintetizarse *de novo* a partir de acetato. Generalmente la biosíntesis comienza con la producción de ácido palmítico o esteárico a partir de acetil-CoA. Posteriormente actúan diferentes enzimas incluyendo  $\Delta$ -desaturasas para introducir dobles enlaces, enzimas de acortamiento de cadena y dependiendo del grupo funcional de la feromona, una reductasa, acetiltransferasa, u oxidasa [11]. Diferentes compuestos pueden ser producidos variando el largo de la cadena del ácido graso, el orden de acción de las enzimas de acortamiento e insaturación, así como la estereoquímica de la insaturación y la funcionalización de la feromona (alcohol, aldehído, acetato) [12]. La biosíntesis es controlada mediante mecanismos neuroendocrinos que son a su vez influenciados por varios factores fisiológicos y ambientales como, edad, cópulas, hormonas, temperatura, fotoperíodo y presencia de plantas hospederas. Estos factores estimulan la liberación de una neurohormona conocida como PBAN (por su sigla en inglés, Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide), cuyo

modo de acción se basa en el control de alguna de las primeras etapas de la biosíntesis de feromonas, por ejemplo estimulando la reductasa o la acetil-CoA carboxilasa [11-13]. La emisión de feromona involucra un comportamiento especializado conocido como “llamada”, que consiste en la extrusión de la glándula de feromona, usualmente con una postura estereotipada. La llamada ocurre a una determinada hora del día y su periodicidad tiene un ritmo circadiano [10]. La feromona emitida por parte de la hembra (o desde un punto fijo en el espacio) adquiere en el aire una forma característica conocida como pluma de olor a la que el macho responde a contra viento (anemotaxis positiva) con un vuelo constante en zigzag [14].

Aunque existen estructuras quimiorreceptoras en diversas partes del cuerpo de los insectos, las antenas son los órganos olfativos por excelencia. Las estructuras sensoriales en las antenas están formadas por unidades morfofuncionales denominadas sensilios o pelos sensoriales, que contienen una o varias neuronas receptoras olfativas (ORNs) que poseen únicamente dos proyecciones, una dendrita y un axón (neuronas bipolares). Las moléculas odoríferas atraviesan la cutícula de los pelos sensoriales a través de poros, y son transportadas a través de un medio acuoso (linfa del sensilio) por proteínas conocidas como proteínas de unión a las moléculas odoríferas (OBPs) hasta la membrana dendrítica de la neurona (fig. 1). Este paso es esencial dado que la mayoría de las moléculas odoríferas son compuestos volátiles, relativamente hidrofóbicos. Cuando el complejo molécula-OBP llega a la membrana dendrítica, la molécula se une a receptores transmembrana, y se desencadena una cascada de eventos que conllevan a la despolarización de la membrana. Esta despolarización da lugar a impulsos nerviosos que son transmitidos a lo largo del axón, y a través del nervio antenal, hacia el glomérulo antenal del cerebro, donde ocurre un primer proceso de integración en las interneuronas que conforman este glomérulo. La respuesta comportamental del insecto depende tanto del proceso sensorial periférico como de este proceso de integración a nivel del sistema nervioso central. Asimismo, dado que el insecto requiere un nivel de sensibilidad óptimo en todo momento, los receptores en las dendritas deben ser liberados, lo cual ocurre por degradación de las moléculas odoríferas mediante enzimas degradativas especializadas, de manera de prevenir la adaptación sensorial [14-16].

Los insectos poseen dos sistemas olfativos diferentes: un sistema olfativo de feromonas altamente específico y muy sensible, y un sistema olfativo general que detecta aleloquímicos, agua y CO<sub>2</sub>. Las neuronas correspondientes al sistema olfativo general y de feromonas están localizadas en pelos sensoriales diferentes [15].



**Figura 1. Esquema de un pelo sensorial de la antena de un insecto.**

### 1.1.3- Usos en el manejo de insectos plaga

Si bien los insecticidas poseen ciertas ventajas, como su gran eficacia y bajo costo, el impacto desfavorable sobre los organismos útiles y el medio ambiente en general, suscita cada vez más la sensibilización de la opinión pública. Es en este sentido que el desarrollo de estrategias alternativas (o complementarias) de control, menos agresivas y que permitan reducir el empleo excesivo de insecticidas, surge como una necesidad cada vez más imperiosa.

Una alternativa al uso de insecticidas es la utilización de sustancias modificadoras del comportamiento de insectos, y en particular el uso de feromonas sexuales. Las feromonas tienen claras ventajas frente a los insecticidas, ya que son especie-específicas, activas en

muy pequeñas cantidades y seguras para el trabajador rural, permitiendo obtener productos alimenticios libres de residuos de insecticidas, con impacto nulo sobre los organismos útiles y el medio ambiente [17]. Los insecticidas no logran disminuir la población de insectos plaga a largo plazo por la evolución de resistencia que generalmente ocurre en la plaga objetivo. Sin embargo, esto es posible mediante el uso sostenido de feromonas en combinación con otras estrategias integradas de manejo, ya que se recupera la fauna benéfica y a su vez ocurre una mayor eficiencia de las feromonas como método de control en bajas densidades de población de la plaga [15, 17].

Las feromonas se utilizan tanto para el monitoreo poblacional de plagas, como para el control de las mismas. La aplicación más extendida y exitosa de feromonas sexuales consiste en su uso para detección y monitoreo de la población. Se colocan en los cultivos septos impregnados con pequeñas cantidades de feromona dentro de trampas que sirven para capturar a los machos. Los datos (capturas) no solo permiten determinar cuándo la plaga está presente en el cultivo sino que también, al obtenerlos regularmente a través del tiempo, permiten estimar como fluctúa la población, determinando así los momentos precisos de aplicación de estrategias de control, lo que se decide cuando las capturas crecen por sobre ciertos umbrales preestablecidos a partir de los que se produce un perjuicio económico en el cultivo. Esta metodología permite disminuir el número de aplicaciones de insecticidas, realizándolas únicamente cuando son necesarias. Cientos de feromonas de lepidópteros han sido identificadas [18], y decenas de especies, en particular plagas de frutales y viñedos, son monitoreadas de esta manera en diferentes partes del mundo [17].

Las estrategias más utilizadas de control de plagas mediante el uso de feromonas son el trampeo masivo, los atracticidas y la confusión sexual. El trampeo masivo consiste en colocar un número importante de trampas con emisores de feromona sexual dentro de un cultivo, atrapando de esta forma a la mayoría de los machos para prevenir la reproducción y reducir la descendencia en las siguientes generaciones. Los atracticidas (attract and kill) utilizan el atrayente (en este caso la feromona sexual) combinado con un insecticida (químico, biológico o esterilizante), lo que disminuye la población de machos sustancialmente. La eficiencia de estas técnicas depende de varias características de la



biología y ecología de las especies a controlar: la duración del ciclo de vida, el número de generaciones por temporada, el radio de vuelo, la duración del período de vuelo y la tasa de crecimiento de la población. Ambas técnicas han sido más utilizadas en otros órdenes de insectos como los coleópteros (por ej. plagas forestales) o dípteros (mosca de la fruta), y son más efectivas cuando se utilizan atrayentes de hembras o de ambos sexos (feromonas producidas por machos, feromonas de agregación o volátiles de plantas que actúan como atrayentes). Una ventaja de estas estrategias es que tienen menor costo en comparación con la confusión sexual, ya que se necesita menor cantidad de feromona [17, 19].

La técnica de confusión sexual ha sido la más exitosa para el control de insectos plaga en las últimas décadas. Consiste en sobrecargar el ambiente con grandes cantidades de feromona sexual, de manera de alterar el comportamiento del macho. Esta técnica causa desorientación y interrupción de la comunicación entre los sexos, y por lo tanto retrasa, reduce o previene la fertilización de las hembras. Los mecanismos implicados en la confusión sexual han sido objeto de investigación y discusión [17, 19]. En general los mecanismos involucrados pueden ser clasificados como competitivos o no competitivos. Estos pueden actuar individualmente o en conjunto, y puede variar su importancia de acuerdo a la biología de la especie que se pretende controlar. Los mecanismos más comúnmente citados son: falsas pistas (competitivo), camuflaje, desensibilización y desbalance sensorial (no competitivos) [20]. Las falsas pistas refieren a la disminución del encuentro entre machos y hembras debido a que los machos siguen falsas plumas provenientes de fuentes discretas (dispensadores) de feromona sintética que compiten con la feromona natural emitida por las hembras. El camuflaje plantea que las plumas de feromona de las hembras quedan encubiertas por la concentración de feromona sintética en el ambiente; este mecanismo asume que la sensibilidad de los machos a la feromona no se ve afectada por una exposición continua a altas concentraciones, sino que el macho no puede localizar a la hembra porque la estructura de la pluma de olor se ve alterada por la feromona sintética en el ambiente. Por el contrario, la desensibilización se define como la disminución de la sensibilidad a la feromona debido a la exposición continua a altas concentraciones. Este mecanismo comprende dos posibles cambios sensoriales: 1) adaptación (fatiga sensorial), definida como disminución de la sensibilidad del sistema

nervioso periférico y 2) habituación, definida como disminución de la sensibilidad del sistema nervioso central. Finalmente, el desbalance sensorial ocurre porque la relación de componentes de la feromona natural se ve modificada por la presencia de grandes cantidades de uno o más componentes sintéticos; esto puede alterar la relación de impulsos sensoriales en los machos, lo que ocasiona una interrupción de la respuesta orientada [21].

La efectividad de la técnica de confusión sexual depende de varias características, entre ellas, el tamaño del área a tratar, la movilidad y la densidad de población del insecto a controlar. Dicha técnica es más efectiva en grandes áreas, debido en parte a que las áreas mayores reducen el impacto de hembras grávidas que migran hacia al área tratada, y porque se facilita una permeación homogénea del aire sobre el cultivo. La permeación incompleta con feromona, especialmente en los bordes, es un obstáculo cuya importancia disminuye cuando la relación área:borde es mayor. En plagas de alta movilidad, esta técnica puede ser difícil de evaluar porque los insectos pueden moverse libremente entre predios, limitando la posibilidad de tener replicas experimentales y controles. La efectividad de esta técnica está fuertemente relacionada a la densidad de población del insecto a controlar; siendo en general más difícil controlar altas densidades poblacionales [19].

Como regla general, se requiere la aplicación de 10 a 100 gramos de feromona por hectárea y por temporada, para lograr la interrupción de la comunicación. Este nivel de aplicación resulta en concentraciones aéreas de al menos  $1 \text{ ng/m}^3$  [17]. Se han desarrollado una gran variedad de dispensadores de feromona, incluyendo microcapsulas, fibras huecas, y los más recientes dispensadores de alta emisión "puffers". Estos últimos dispositivos se utilizan en bajo número por hectárea, pero emiten una gran cantidad de feromona, pudiendo controlarse el momento de liberación de la misma que coincidirá con el momento en el que insecto esta activo [17]. Los dispensadores deben ser aplicados temprano en la temporada, cuando la densidad de población es todavía baja ya que como se mencionó anteriormente esta técnica es efectiva a bajas densidades de población. Un aspecto importante en los experimentos de confusión sexual es medir la eficiencia del tratamiento. El parámetro más comúnmente utilizado para indicar si la confusión fue exitosa son las capturas de machos en trampas de feromona colocadas dentro del cultivo; si son bajas o

cero indican que el tratamiento fue exitoso. Sin embargo, no es poco común encontrar bajas capturas en trampas y detectar un número sustancial de hembras copuladas. Estos datos deben por lo tanto complementarse con una inspección visual del cultivo para evaluar el daño por la presencia de larvas [19].

Un inconveniente de esta técnica es el alto costo de las feromonas y las formulaciones, en comparación con el costo de los tratamientos con insecticidas convencionales. Deben combinarse esfuerzos de científicos, fabricantes y productores agrícolas para disminuir el costo de la aplicación de feromonas y semioquímicos en general [19].

Desde los años noventa hasta la primera década de este siglo, el uso de confusión sexual en ciertos cultivos ha crecido casi exponencialmente [17]. Éxitos importantes de confusión sexual incluyen el control de *Cydia pomonella* (Tortricidae) en frutales de pepita, *Cydia molesta* (Tortricidae) en durazneros, *Keiferia lycopersicella* (Gelechiidae) en hortalizas, *Pectinophora gossypiella* (Gelechiidae) en algodón, *Platynota stulana* (Tortricidae) y *Lobesia botrana* (Tortricidae) en viñedos [19].

#### **1.1.4- Uso de feromonas sexuales en Uruguay**

En Uruguay, se utilizan trampas de feromona para el monitoreo de dos tortrícidos cosmopolitas y exóticos, plagas de frutales de hoja caduca, *C. pomonella*, plaga de manzanos y perales, y *C. molesta*, plaga de durazneros. Se sintetizaron asimismo a nivel local (Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR) las feromonas de *Bonagota salubricola* (Tortricidae) y *Argyrotaenia spheropa* (Tortricidae), especies nativas que afectan principalmente manzanos y viñedos, para ser utilizadas en el monitoreo de las mismas. Más recientemente se ha comenzado a utilizar la feromona sexual de *Cryptoblabes gnidiella*, también sintetizada a nivel local, para el monitoreo de esta especie a escala experimental en un viñedo comercial. Finalmente, la feromona de otro tortrícido nativo

plaga de leguminosas, *Crociosema aporema*, se ha identificado y se ha evaluado su uso en monitoreo a escala experimental, en un cultivo de soja [22].

En cuanto a la utilización de las feromonas con fines de control, se ha implementado el método de confusión sexual en frutales de hoja caduca para el control de *C. pomonella* y *C. molesta*, con resultados promisorios [23]. Además se ha utilizado la feromona de *Tuta absoluta* (Gelechiidae) en el control mediante confusión sexual a escala experimental en un invernáculo comercial de tomate, obteniéndose muy buenos resultados [24]. Estos avances han resultado en un interés por la importación, el registro y la comercialización de dispensadores de feromona para confusión sexual disponibles internacionalmente (*C. pomonella* y *C. molesta*), lo cual representa un importante avance hacia la aplicación en gran escala de esta estrategia de control [25].

## 1.2- Análogos de feromonas sexuales y su uso en el manejo de plagas

Tan pronto como se logró la identificación de la primer feromona sexual de un lepidóptero, se sugirió la posibilidad de que compuestos estructuralmente relacionados pudieran actuar como eficientes disruptores de la comunicación [26]. Es así que surgió el término paraferomonas; compuestos químicos de origen antropogénico, no naturales, relacionados estructuralmente a los componentes de la feromona natural, y que de alguna manera afectan fisiológica o comportamentalmente el sistema de comunicación. Químicamente estos análogos consisten en variadas modificaciones a la estructura típica de una feromona de lepidóptero, e incluyen: **modificaciones de la cadena carbonada** (acortamiento o elongación de la cadena, saturación de dobles enlaces, entre otras), **modificaciones del grupo funcional polar** (formiatos, propionatos, butiratos, éteres, ácidos, cetonas, carbamatos), **ésteres halogenados** (particularmente análogos fluorados), **sustitución isostérica de la cadena** (introducción de átomos de flúor en dobles enlaces, en el grupo metilo terminal o en posición alílica, sustitución de un doble enlace por un grupo tiometileno, sustitución de un grupo metilo por un halógeno), **feromonas marcadas con**

**isótopos** ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ , entre otros), y un grupo de **compuestos misceláneos** (como por ejemplo trifluorometil cetonas) [26].

El efecto de las paraferomonas en el comportamiento de los insectos es muy variable. Estos compuestos han resultado ser mímicos con actividades generalmente inferiores a la de la feromona, sinergistas en casos excepcionales, e inhibidores o antagonistas de la feromona sexual. Se ha observado repetidamente una disminución en la actividad de una mezcla atractiva (feromona) cuando se introduce un análogo. La dosis de análogo necesaria para observar antagonismo varía considerablemente en distintos estudios, desde relaciones feromona: análogo 1: 0,001 hasta 1:10, lo que sugiere que en distintas especies, o para distintos análogos, diferentes mecanismos determinan el efecto antagonista del análogo. En algunos casos los antagonistas son compuestos emitidos naturalmente por otras especies filogenéticamente relacionadas, como componentes de su propia feromona. Esto sugiere que los compuestos operan adaptativamente como mecanismos de aislamiento reproductivo entre estas especies, previniendo cópulas erróneas entre especies simpátricas. Sin embargo, este efecto también ha sido observado cuando se agrega a la feromona sexual compuestos antropogénicos (paraferomonas) [26].

Las paraferomonas son potencialmente útiles como alternativa en el manejo integrado de plagas, particularmente cuando las feromonas naturales son costosas de producir o presentan problemas de inestabilidad. De hecho, se han usado paraferomonas en monitoreo de plagas y control mediante confusión sexual [26]. Las paraferomonas con actividad atrayente han sido utilizadas para monitoreo de varias plagas. Por ejemplo, el acetato de (*E*)-10-dodecenilo ha sido utilizado para monitorear *C. nigricana* (Tortricidae), cuya feromona sexual está constituida por el acetato de (*E,E*)-8,10-dodecadienilo, compuesto inestable en condiciones de campo debido al sistema dieno conjugado. Generalmente las modificaciones estructurales de los componentes de la feromona conllevan una reducción de la actividad a campo, sin embargo, se han reportado aumentos significativos de las capturas de machos. Por ejemplo, los análogos (*E,E*)-10,11-difluoro-8,10-dodecadienol y (*E,E*)-11-cloro-8,10-undecadienol capturaron significativamente más machos de *C. pomonella* (Tortricidae) que la propia feromona sexual [(*E,E*)-8,10-dodecadien-1-ol]

[26]. En varios experimentos de confusión sexual se han utilizado análogos de feromonas naturales, por ejemplo alcoholes cuando los componentes de la feromona son acetatos, isómeros geométricos sintéticos de la feromona, o formiatos como análogos de aldehídos [19]. Generalmente la mezcla completa de los componentes de la feromona es la mejor formulación para confusión sexual, sin embargo en el caso de *C. pomonella* (Tortricidae) análogos antagonistas resultaron ser disruptores de la comunicación más potentes que la propia feromona [19]. En el caso de *Ostrinia nubilalis* (Crambidae) la disrupción de la comunicación se logró utilizando 66.4 g/ha del análogo acetato de 11-tetradecinilo, y resultados similares se obtuvieron con el análogo 2-fluoro en concentraciones equivalentes a las necesarias de feromona [26].

De especial interés son los análogos de aldehídos, componentes principales de la feromona de varios insectos plaga; dado que son relativamente inestables en presencia de oxígeno y/o luz. Durante el almacenamiento, y más severamente bajo condiciones de campo, se producen transformaciones químicas como oxidaciones y polimerizaciones que dan lugar a productos de descomposición inactivos comportamentalmente [27]. Por lo tanto, análogos de aldehídos que sean selectivos, comportamentalmente activos, estables (de larga duración) y de bajo costo, son de interés para el manejo de insectos que utilizan aldehídos como feromona sexual [28]. En trabajos anteriores el grupo aldehído de feromonas ha sido reemplazado por grupos funcionales más estables como formiatos, metilo, metileno, nitrilos, oximas e isotiocianatos, resultando en compuestos atrayentes o inhibidores para distintas especies de lepidópteros y coleópteros [27]. Análogos fluorados como fluoruros de acilo se han sintetizado y evaluado como sustitutos de feromonas naturales, resultando ser en algunos casos hiperagonistas, causando una extrusión irreversible de los *claspers* (estructuras de los machos utilizada para sostener la hembra durante la cópula) y la genitalia de los machos, los que respondían con vuelos erráticos [29].

Los formiatos han sido estudiados como análogos de aldehídos para varias especies de lepidópteros, ya que son más económicos de sintetizar y mucho más estables [26]. Por ejemplo, para la polilla del durazno amarillo, *Dichocrocis punctiferalis* (Crambidae), una mezcla 10:1 de los formiatos de (*E*) y (*Z*)-8-tetradecenilo resultó ser tan atractiva como la

feromona natural, una mezcla 10:1 de (*E*) y (*Z*)-10-hexadecenal [30]. Del mismo modo, el formiato de (*Z,E*)-7,9,11-dodecatrienilo, análogo del componente principal de la feromona sexual [(*Z,E*)-9,11,13-tetradecatrienal] de la polilla de los algarrobos, *Ectomyelois ceratoniae* (Pyralidae), fue tan atractivo para los machos como la feromona natural [una mezcla 8:1:1 de (*Z,E*)-9-11,13-tetradecatrienal, (*Z,E*)-9,11-tetradecadienal y (*Z*)-9-tetradecenal] [31].

Los formiatos han resultado ser efectivos como disruptores de la comunicación en algunas especies de polillas [32, 33]. Por ejemplo, el formiato de (*Z,E*)-7,9,11-dodecatrienilo ha sido utilizado en la disrupción de la comunicación de *E. ceratoniae* (Pyralidae) en plantaciones de palmeras datileras [32]. En este caso se observó en los cuadros tratados una reducción de hasta 100 % de las capturas de machos en trampas con hembras vírgenes y un menor nivel de daño, comprado con cuadros control (este resultado se observó solo en los cuadros tratados con insecticidas). De la misma manera, el formiato de (*Z,Z*)-9,11-tetradecadienilo se evaluó como disruptor de la comunicación de *Amyelois transitella* (Pyralidae) en un experimento a campo a gran escala, con buenos resultados [26]. Así mismo, el formiato de (*Z*)-9-tetradecenilo ha sido utilizado en la disrupción de la comunicación de *Heliothis virescens* (Noctuidae) y de *H. zea* (Noctuidae) [33], cuyas feromonas sexuales tienen como constituyente principal el (*Z*)-11-hexadecenal. En este caso se colocaron en una plantación de tabaco, dispensadores (septos de polietileno) con el análogo y 1 o 2 trampas con hembras vírgenes en el centro del cuadro; observándose una reducción del 95 % en la captura de machos. También se ha evaluado el formiato de (*Z*)-9-tetradecenilo y formiato de (*Z*)-11-hexadecenilo contra *Chilo suppressalis* (Crambidae), cuya feromona está constituida por (*Z*)-11-hexadecenal y (*Z*)-13-octadecenal. Se colocaron viales de polietileno con 30 mg de una mezcla 4.5:1 de ambos formiatos, en un cultivo de arroz, obteniéndose más del 90 % de inhibición de capturas de machos en trampas de feromona, por más de 23 días [34].

### **1.3- Kairomonas y su potencial en el manejo de plagas**

Las plantas emiten mezclas complejas de compuestos volátiles, que en algunos casos son utilizados como señales por insectos fitófagos en la búsqueda de sustratos donde

alimentarse u oviponer [35]. En insectos fitófagos con un espectro restringido de plantas alimenticias, la decisión de la hembra en cuanto a donde oviponer es crucial, dado que los primeros estadios larvales poseen limitada movilidad. La puesta de huevos en una planta inadecuada desde el punto de vista alimenticio puede resultar por lo tanto en una pérdida total de la progenie, con obvias consecuencias en la eficacia darwiniana (*fitness*) de la hembra. Es de esperar, por lo tanto, que la habilidad de la hembra para encontrar un sitio donde oviponer sea un carácter fuertemente seleccionado en muchas especies de insectos fitófagos.

Las hembras grávidas siguen una secuencia de eventos comportamentales en el momento de la oviposición que involucran la búsqueda, orientación y encuentro, como primer etapa, seguidos de aterrizaje, evaluación de contacto y aceptación o rechazo [36]. Este proceso comprende la integración de numerosos impulsos sensoriales en el sistema nervioso central, incluyendo señales olfativas y gustativas mediadas por semioquímicos, e información física como el color, forma y textura de la planta. Dada una combinación correcta de los impulsos sensoriales, una planta es reconocida como hospedera, provocando una respuesta de atracción; mientras que si el insecto percibe una señal equivocada, la planta es reconocida como no-hospedera [37]. En la primera etapa las señales sensoriales visuales, específicamente color y forma, son muy importantes [36]. Sin embargo, las hembras pueden localizar sus plantas hospederas a pesar de que las mismas se encuentren a menudo escondidas entre una gran variedad de otras plantas, jugando un rol importante en estos casos, los volátiles emitidos por las plantas hospederas (*kairomonas*) [37, 38].

Aunque las plantas emiten una mezcla compleja de volátiles, pudiendo contener más de 200 compuestos, solo algunos de éstos son detectados por los insectos. El número de compuestos utilizado por los insectos para reconocer el hospedero varía entre 3-10, a menudo componentes minoritarios del perfil de volátiles [35]. La localización de la planta hospedera se puede basar en compuestos específicos de la misma, que no se encuentran en especies de plantas no relacionadas, o mediante la detección de una relación específica de compuestos ubicuos, comúnmente presentes en todas las plantas, como (a modo de



ejemplo) derivados de ácidos grasos [hexanol, (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol], fenilpropanoides (bencil alcohol, 2-feniletanol) e isoprenoides (limoneno, linalool, geraniol) [37]. Siendo que el mecanismo prevalente en la localización de la planta hospedera es el uso de compuestos ubicuos de las plantas, la especificidad de la señal se basa en la relación de volátiles emitidos, más que en la presencia/ausencia de compuestos específicos [37].

En ambientes naturales, los insectos están expuestos a una gran variedad de compuestos, a diferentes concentraciones y en diferentes combinaciones. En este contexto complejo, con compuestos electrofisiológicamente activos emitidos también por plantas no-hospederas, los insectos deben ser capaces de distinguir los compuestos relevantes y reconocer la mezcla correcta. Esto es posible dado que el sistema olfativo de los insectos es altamente sensible y específico para ciertos compuestos, y permite una resolución espacio-temporal de los impulsos nerviosos. Diferentes neuronas son sensibles a diferentes compuestos y los impulsos hacia el SNC provenientes de diferentes compuestos, son diferentes, lo que permite una clara discriminación entre relaciones correctas e incorrectas. Para que dos neuronas especializadas para la recepción de compuestos diferentes respondan de manera sincronizada, éstas deben localizarse próximas anatómicamente. De hecho, existe frecuentemente una organización funcional de neuronas co-localizadas en el mismo pelo sensorial, lo que permite una resolución espacio-temporal de impulsos al SNC. Esto permite a los insectos discriminar si por ejemplo dos olores, en la relación correcta, provienen de la misma fuente (es decir son emitidos por la planta hospedera) o provienen cada uno de fuentes diferentes (no-hospederas). Si los olores provienen de la misma planta las neuronas son estimuladas al mismo tiempo, mientras que si los olores provienen de plantas diferentes las neuronas responden a diferentes tiempos [37]. Los volátiles detectados individualmente fuera del contexto de una mezcla son percibidos como señales de no-hospederos [35].

Tanto diferencias cuanti como cualitativas en los volátiles percibidos pueden tener un efecto significativo en la respuesta comportamental de los insectos. Un insecto requiere de un sistema olfativo suficientemente flexible de manera de poder sobrellevar la variación en el perfil de volátiles de un hospedero a otro, un aspecto relevante en insectos polípagos,

pero al mismo tiempo debe permitir discriminar una señal proveniente de un hospedero de una proveniente de un no-hospedero. Algunos compuestos dentro de la mezcla de volátiles utilizada para el reconocimiento del hospedero son más importantes que otros, y eliminarlos de la mezcla da lugar a una disminución de la atracción, mientras que otros juegan un rol menos importante y pueden ser omitidos sin pérdida significativa de la actividad (compuestos redundantes) [35]. Si bien la atracción a volátiles de hospederos juega un rol importante en la localización de un sitio donde alimentarse u oviponer, evitar los olores de plantas no-hospederas parece ser una parte importante en el proceso de localización. Es así que se ha comprobado que muchos insectos perciben como repelentes compuestos emitidos por plantas no-hospederas [35].

Los compuestos volátiles emitidos por las plantas pueden obtenerse por diferentes métodos, incluyendo la extracción del material vegetal; sin embargo, los métodos que involucran un flujo de aire que arrastra los volátiles de las plantas intactas, dan una idea más exacta de la relación de compuestos producida por diferentes estados fenológicos de la misma. Para determinar los compuestos biológicamente activos en estas mezclas complejas, se utilizan técnicas sofisticadas como cromatografía gaseosa acoplada a un detector de electroantenograma (GC-EAD, ver materiales y métodos) [37].

Conocer las bases químicas de este proceso de comunicación planta-insecto puede resultar en una metodología de manejo que utilice los compuestos volátiles de las plantas para manipular el comportamiento de las hembras al momento de la puesta de huevos, complementando otros métodos de control [39]. Mediante métodos de control basados en feromonas sexuales, solo se ve afectado el comportamiento de los machos, no así el de las hembras grávidas. Sumado a esto, la técnica de confusión sexual no siempre es eficiente a altas densidades de población de la plaga y es necesario controlar grandes áreas de manera de evitar la inmigración de hembras copuladas desde cultivos vecinos. Por lo tanto, la eficiencia de los métodos de control basados en feromonas puede mejorarse mediante el uso de kairomonas que afecten también el comportamiento de las hembras [40, 41].

Las kairomonas han sido utilizadas para control tanto en la estrategia de trampeo masivo como en atracticidas. Una técnica muy efectiva para controlar especies de *Helicoverpa* (Noctuidae) es el uso de atrayentes florales y estimulantes de alimentación combinados con insecticidas [17]. En algunos casos se ha demostrado que los volátiles de plantas aumentan significativamente la atracción de los machos a la feromona sexual [17, 19]. No es claro aun cómo estas mezclas de feromona y volátiles de plantas son integradas en el sistema olfativo de los insectos, o si el aumento en la atracción se debe al aumento de la respuesta a la feromona, al aumento de la respuesta a los volátiles de planta, o una respuesta a la mezcla como un olor único [19].

Los volátiles de no-hospederos pueden jugar un rol importante en el manejo de plagas, dado que los insectos evitan esos volátiles. Esas señales pueden ser utilizadas para diseñar estrategias de manejo conocidas como *empujar-atraer* (push-pull) [17]. Esta estrategia utiliza una combinación de estímulos que modifican el comportamiento (señales visuales y químicas), para manipular la distribución y abundancia de una plaga. Se busca reducir la abundancia de la plaga en el cultivo que se desea proteger (*empujar*), mediante el uso de estímulos que enmascaran al hospedero o son repelentes, dirigiendo simultáneamente a la plaga, mediante estímulos atrayentes, hacia otras áreas como trampas o cultivos trampa (*atraer*), donde se concentran facilitando su eliminación. Las señales químicas que se utilizan como componentes para *empujar* la plaga incluyen repelentes sintéticos, volátiles de plantas no-hospederas, feromonas de antiagregación y de alarma, antialimentarios y deterrentes de oviposición. Los estímulos químicos que pueden ser utilizados para atraer incluyen volátiles de plantas hospederas, feromonas sexuales y de agregación, y estimulantes de oviposición [19, 42].

Estos compuestos pueden utilizarse también para el monitoreo de hembras, lo que permite conocer el estatus reproductivo de las mismas, además de predecir los períodos de oviposición, siendo una aproximación más directa del riesgo potencial de daño [43].

El ejemplo más desarrollado de una kairomona utilizada en manejo de plagas es el compuesto denominado "éster de pera", (E,Z)-2,4-decadienoato de etilo. Las hembras copuladas de *Cydia pomonella* utilizan este compuesto para localizar la planta hospedera y

oviponer cerca o en las frutas [44]. Este compuesto ha demostrado ser no solo atrayente de hembras, sino también atrayente de machos y larvas de dicha especie. Su uso para monitoreo ha sido estudiado desde hace ya algunos años, obteniéndose recientemente buenos resultados de capturas con el uso de trampas transparentes conteniendo el éster de pera y ácido acético. En cuanto a su uso en control, estudios preliminares demostraron que el uso de este compuesto en la estrategia “attract and kill” podría reducir el daño únicamente durante el primer periodo de vuelo, ya que se observó que más tarde en la temporada pocas hembras tienen contacto con las trampas. Los estudios de trampeo masivo no han resultado efectivos dado que se capturaron muy pocas hembras usando varios diseños de trampas [43]. También se ha evaluado el uso de una formulación microencapsulada del éster de pera para interferir con el comportamiento de búsqueda del hospedero, determinándose una reducción de daño comparado con un control [45].

## 2- *Cryptoblabes gnidiella* y el sector vitivinícola

La producción de vino es una actividad importante en la región sur de América del Sur. En Uruguay, existen cerca de 8.100 ha de viñedos, concentrados principalmente en el departamento de Canelones [46]. El agroecosistema vitícola uruguayo ha presentado históricamente ventajas comparativas en lo que a plagas se refiere respecto a otras regiones vitícolas del mundo. Actualmente, los viñedos uruguayos no cuentan con el insecto plaga más importante de los viñedos Europeos; el tortricido *Lobesia botrana*. Sin embargo, hace ya algunos años los viñedos de Uruguay y el sur de Brasil son atacados por una importante plaga; *Cryptoblabes gnidiella* Millière (Lepidoptera: Pyralidae), conocida como la polilla de los racimos (fig. 2).

*C. gnidiella* es originaria de la región Mediterránea y se ha distribuido ampliamente a través del sur de Europa, Nueva Zelanda [47], Hawái, India, y América del Sur [48]. Fue detectada por primera vez en Uruguay en 1981, apareciendo desde entonces en forma constante y con una incidencia que varía de relativa a grave según las variedades de vid [49]. La larva tiene preferencia por los frutos maduros y vive en los racimos alimentándose de los granos, los que quedan vacíos y envueltos en una tela de seda junto a los excrementos y otros restos de su actividad [49]. Este pirálido causa tanto daño directo, ocasionado por la propia alimentación de la larva, como indirecto, debido a la infestación por microorganismos de los granos dañados. Ocasiona un grave problema sanitario que afecta tanto la producción del viñedo como la calidad de los vinos [48].

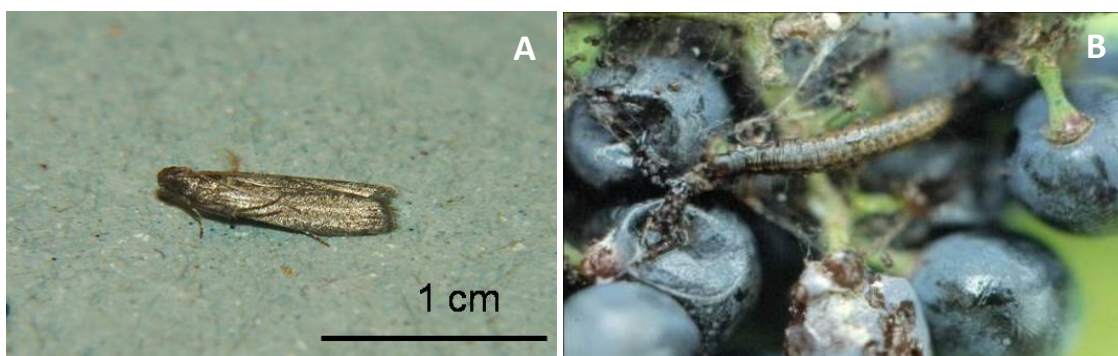
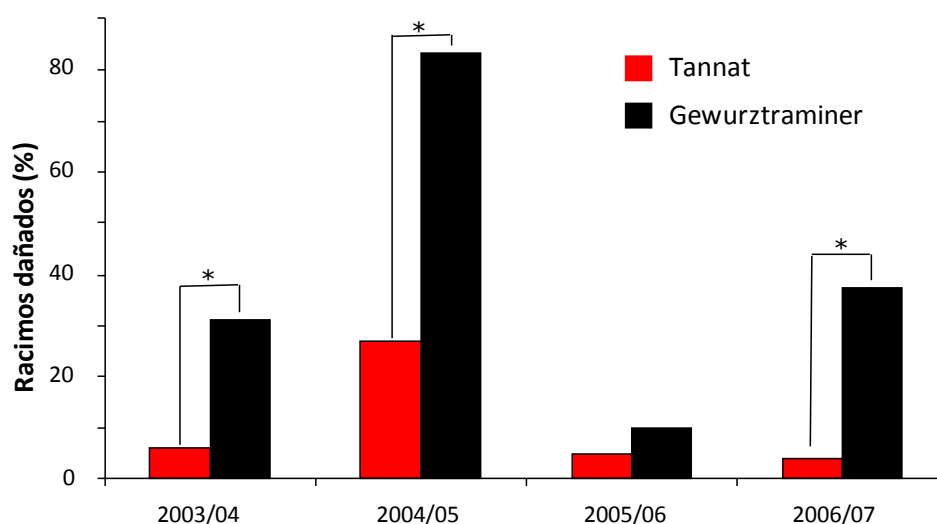


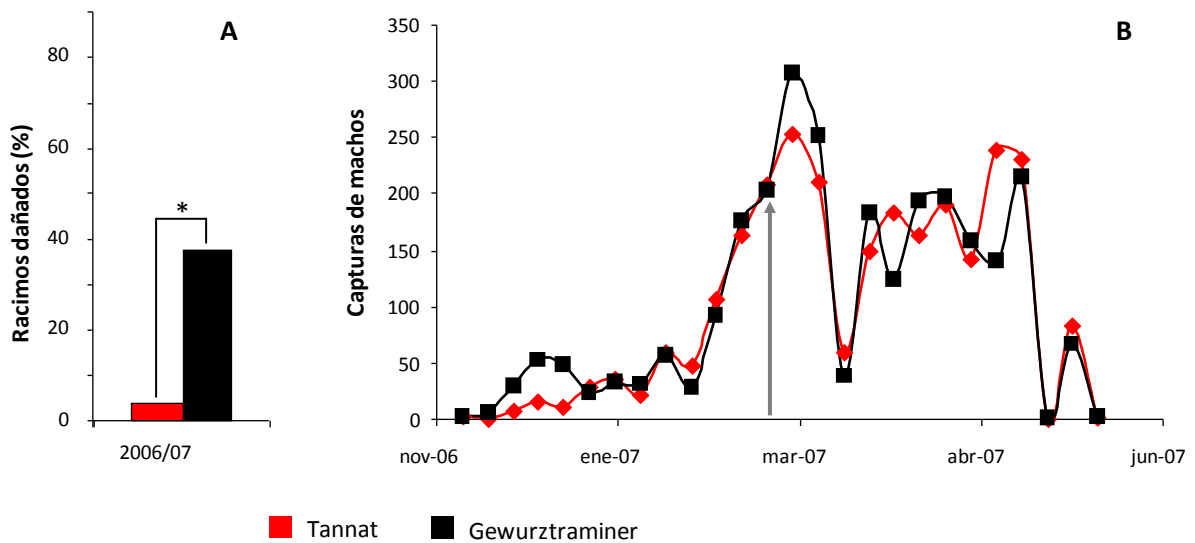
Figura 2. *Cryptoblabes gnidiella*, lepidóptero plaga de viñedos uruguayos. A) Insecto adulto. B) Larva en un racimo de uva junto a excrementos y tela de seda.

La feromona sexual de *C. gnidiella* consiste en una mezcla 1:1 de dos aldehídos monoinsaturados: Z-11-hexadecenal y Z-13-octadecenal [50]. Esta mezcla es utilizada para monitorear poblaciones de esta plaga en Israel [47], y su uso para control mediante la estrategia de confusión sexual también se está investigando en ese país (A. Harari, comunicación personal). Sin embargo, un inconveniente en el desarrollo exitoso de la técnica de confusión sexual es la inestabilidad de los componentes de la feromona. Es por esto que nos propusimos trabajar con análogos estructurales estables de estos aldehídos, como son los formiatos; estudiando su actividad electrofisiológica y comportamental, y evaluando su efectividad como estrategia de control.

Un aspecto interesante del ataque de *C. gnidiella* en viñedos uruguayos es una marcada preferencia varietal dentro de un viñedo, siendo la variedad Gewürztraminer más atacada que otras variedades como Tannat. En tres de los cuatro años en los que se realizó la evaluación de daño en este viñedo se observó una diferencia significativa en la presencia de larvas en ambas variedades (fig. 3), diferencia que no responde a la abundancia de machos adultos, ya que se observó que la población de machos (monitoreada mediante trampas de feromona) se distribuye de igual manera en todo el viñedo (Ing. Agr. I.B. Scatoni, comunicación personal) (fig. 4).



**Figura 3. Porcentaje de racimos dañados por *Cryptoblabes gnidiella* en dos variedades de uva. Evaluación de 80 racimos/variedad, un racimo dañado contiene al menos 1 individuo de *C. gnidiella*, \* indica diferencia significativa ( $P < 0.001$ ,  $\chi^2$ , datos de I.B. Scatoni, Facultad de Agronomía, UdelaR).**



**Figura 4. Porcentaje de racimos dañados y fluctuación de la población de *Cryptoblates gnidiella*, en dos variedades de uva, durante la temporada 2006/2007. A) Ver Fig. 3. B) Monitoreo de la población de machos adultos con trampas de feromona, la flecha indica el momento de evaluación de daño, no existe diferencia significativa entre las poblaciones de adultos según ANOVA factorial (datos de I.B. Scatoni, Facultad de Agronomía, UdelaR).**

Esta diferencia en la susceptibilidad varietal podría estar asociada a diferencias en las preferencias de las hembras a la hora de ovipositar, preferencia que a su vez puede responder a diferencias en los compuestos volátiles emitidos por las uvas. Dadas estas observaciones, nos planteamos estudiar los volátiles emitidos por dos variedades, la de mayor preferencia para *C. gnidiella* (Gewürztraminer) y una de menor preferencia (Tannat), estudiando también la respuesta electrofisiológica de las hembras en búsqueda de compuestos activos que puedan estar actuando como kairomonas de oviposición (atrayendo las hembras hacia su hospedero), o como inhibidores de oviposición (compuestos repelentes en Tannat).

### 3- Bibliografía

1. Cokl, A.A., and Millar, J.G. (2009). Manipulation of insect signaling for monitoring and control of pest insects. In *Biorational Control of Arthropod Pests*, I. Ishaaya and A.R. Horowitz, eds.
2. Cardé, R.T., and Millar, J.G. (2004). *Advances in insect chemical ecology* (Cambridge: Cambridge University Press).
3. Nandagopal, V., Prakash, A., and Rao, J. (2008). Know the pheromones: basics and its application. *Journal of Biopesticides 1*, 210 - 215.
4. Wyatt, T.D. (2003). *Pheromones and animal behaviour, communication by smell and taste* (New York: Cambridge University Press).
5. Brown, W.L., Jr., Eisner, T., and Whittaker, R.H. (1970). Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. *BioScience 20*, 21-22.
6. Symonds, M.R.E., and Elgar, M.A. (2008). The evolution of pheromone diversity. *Trends in Ecology & Evolution 23*, 220-228.
7. Ando, T., Inomata, S.-i., and Yamamoto, M. (2004). Lepidopteran sex pheromone. *Topics in Current Chemistry 239*, 51 - 96.
8. Norin, T. (2001). Pheromones and kairomones for control of pest insects. Some current results from a Swedish research program. *Pure and Applied Chemistry 73*, 607 - 612.
9. Cardé, R.T., and Mafra-Neto, A. (1997). Mechanisms of flight of male moths to pheromone. In *Insect Pheromone Research: New Directions*, C.a. Hall, ed. (New York).
10. Cardé, R.T., and Haynes, K.F. (2004). Structure of the pheromone communication channel in moths. In *Advances in Insect Chemical Ecology*, C.U. Press, ed. (Cambridge), pp. 283 - 332.
11. Rafaeli, A. (2002). Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. *International Review of Cytology 213*, 49-91.
12. Raina, A.K. (1993). Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology 38*, 329-349.
13. Rafaeli, A. (2009). Pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN): Regulatory role and mode of action. *General and Comparative Endocrinology 162*, 69–78.



14. Howse, P., Stevens, I., and Jones, O. (1998). Insect pheromones and their use in pest management (London: Chapman and Hall).
15. Plettner, E. (2002). Insect pheromone olfaction: new targets for the design of species-selective pest control agents. *Current Medicinal Chemistry* 9, 1075-1085.
16. Jacquin-Joly, E., and Merlin, C. (2004). Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* 30, 2359-2397.
17. Witzgall, P., Kirsch, P., and Cork, A. (2010). Sex pheromone and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology* 36, 80-100.
18. El-Sayed, A.M. (2011). The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals.
19. Reddy, G.V.P., and Guerrero, A. (2010). New pheromones and insect control strategies. *Vitamins and Hormones* 83, 493-519.
20. Rosell, G., Quero, C., Coll, J., and Guerrero, A. (2008). Biorational insecticides in pest management. *Journal of Pesticide Science* 33, 103-121.
21. Stelinski, L.L. (2007). On the physiological and behavioral mechanisms of pheromone-based mating disruption. *Pestycydy* 3-4, 27-32.
22. Altesor, P. (2010). Estudio de la comunicación química a través de feromonas en insectos de importancia económica en Uruguay para racionalizar el uso de insecticidas. Magister thesis, Montevideo.
23. Paullier, J., Nuñez, S., Arboleya, J., Leoni, C., and Maeso, D. (2005). Producción Integrada en Uruguay, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria: Montevideo.
24. Nuñez, P., Zignago, A., Paullier, J., and Nuñez, S. (2009). Feromonas sexuales para el control de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). *Agrociencia* 13, 27-35.
25. DGSSAA/MGAP (2011). Registro de productos fitosanitarios autorizados al 15/7/11. [http://www.mgap.gub.uy/gdssaa/DivAnalisisDiagnostico/DAYD\\_PROFIT.htm](http://www.mgap.gub.uy/gdssaa/DivAnalisisDiagnostico/DAYD_PROFIT.htm)
26. Renou, M., and Guerrero, A. (2000). Insect parapheromones in olfaction reserch and semiochemical-based pest control strategies. *Annual Review of Entomology* 48, 605–630.
27. Ujvary, I., Dickens, J.C., Kamm, J.A., and McDonough, L.M. (1993). Natural product analogs: stable mimics of aldehyde pheromones. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22, 393-411.

28. Carlson, D., and Mclaughlin, J. (1985 ). Diolefin pheromone mimics as disruptants of sexual communication in insects vol. 4527000 The United States of America as represented by the Secretary of (Washington, DC) United States.
29. Prestwich, G. (1985 ). Reactive pheromone mimics for insect mating disruption vol. 4544504, The Research Foundation of State University of New York (Albany, NY)
30. Mori, K., Watanabe, H., Fujiwhara, M., and Kuwahara, S. (1990). (*E*)- and (*Z*)-Tetradecenyl formate, potent sex-pheromone mimics against the yellow peach moth. *Liebigs Annalen Der Chemie* *12*, 1257-1259.
31. Todd, J.L., Millar, J.G., Vetter, R.S., and Baker, T.C. (1992). Behavioral and electrophysiological activity of (*Z,E*)-7,9,11-dodecatrienyl formate, a mimic of the major sex pheromone component of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*. *Journal of Chemical Ecology* *18*, 2331-2352.
32. Vetter, R.S., Millar, J.G., Vickers, N.J., and Baker, T.C. (2006). Mating disruption of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*, with a sex pheromone analog. *Southwestern Entomologist* *31*, 33-47.
33. Mitchell, E.R., Jacobson, M., and Baumhover, A.H. (1978). (*Z*)-9-Tetradecen-1-ol formate and its use as a communication disruptant for *Heliothis*, vol. 4083995: United States.
34. Goh, H., and Lee, J. (1984). Mating inhibition of striped rice borer (*Chilo suppressalis* W.) by pheromone mimics. *Korean Journal of Entomology* *14*, 9-12.
35. Bruce, T.J.A., and Pickett, J.A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochemistry* *72*, 1605-1611.
36. Renwick, J.A.A., and Chew, F.S. (1994). Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* *39*, 377-400.
37. Bruce, T.J.A., Wadhams, L.J., and Woodcock, C.M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science* *10*, 269-274.
38. Maher, N., and Thiéry, D. (2004). A bioassay to evaluate the activity of chemical stimuli from grape berries on the oviposition of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* *94*, 27-33.
39. Tasin, M. (2005). Sex, Wine and Chemical Communication in Grapevine Moth *Lobesia botrana*, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp.
40. Ansebo, L., Coracini, M.D.A., Bengtsson, M., Liblikas, I., Ramírez, M., Borg-Karlson, A.K., Tasin, M., and Witzgall, P. (2004). Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *Journal of Applied Entomology* *128*, 488-493.

41. Tasin, M., Anfora, G., Ioriatti, C., Carlin, S., De Cristofaro, A., Schmidt, S., Bengtsson, M., Versini, G., and Witzgall, P. (2005). Antennal and behavioral responses of grapevine moth *Lobesia botrana* females to volatiles from grapevine. *Journal of Chemical Ecology* 31, 77-87.
42. Cook, S.M., Khan, Z.R., and Pickett, J.A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology* 52, 375-400.
43. Knight, A.L. (2010). Increased catch of female codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in kairomone-baited clear delta traps. *Environmental entomology* 39, 583-590.
44. Schmidt, S., Anfora, G., Cristofaro, A.d., Mattedi, L., Molinari, F., Pasqualini, E., and Ioriatti, C. (2006). Ethyl (2E, 4Z)-2,4-decadienoate (pear ester): a new tool for female codling moth monitoring *Informatore Fitopatologico* 56, 17-24.
45. Schmidt, S., Tomasi, C., Melandri, M., Pradolesi, G., Pasqualini, E., and Ioriatti, C. (2007). Use of ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate for the control of *Cydia pomonella* (L.) on apple orchards. *Bulletin OILB/SROP* 30, 127-132.
46. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, D.d.E.A. (2010). Anuario Estadístico Agropecuario 2010.
47. Anshelevich, L., Kehat, M., Dunkelblum, E., and Greenberg, S. (1993). Sex pheromone traps for monitoring the honeydew moth, *Cryptoblabes gnidiella* : Effect of pheromone components, pheromone dose, field aging of dispenser, and type of trap on male captures *Phytoparasitica* 21, 189-198.
48. Harari, A.R., Zahavi, T., Gordon, D., Anshelevich, L., Harel, M., Ovadia, S., and Dunkelblum, E. (2007). Pest management programmes in vineyards using male mating disruption. *Pest Management Science* 63, 769–775.
49. Bentancourt, C.M., and Scatoni, I.B. (2006). *Lepidópteros de importancia económica en Uruguay: Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales*, 2nd Edition (Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L - Facultad de Agronomía).
50. Bjostad, L., Gurevitz, E., Gothilf, S., and Roelofs, W. (1981). Sex attractant for the honeydew moth, *Cryptoblabes gnidiella*. *Phytoparasitica* 9, 95-99.

## OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es la investigación de aspectos químicos y biológicos de la comunicación química intra- e inter-específica de *Cryptoblabes gnidiella*, con miras al desarrollo de estrategias convergentes para el manejo ecológico de dicha plaga en viñedos de Uruguay.

### **Objetivo específico 1: CAPÍTULO 1**

Estudiar la respuesta electrofisiológica y comportamental de machos de *Cryptoblabes gnidiella* a los formiatos análogos de la feromona sexual.

### **Objetivo específico 2: CAPÍTULO 2**

Evaluar la actividad inhibitoria de los formiatos y la eficiencia de los mismos en el control de *Cryptoblabes gnidiella*, mediante experimentos a campo.

### **Objetivo específico 3: CAPÍTULO 3**

Estudiar la presencia de kairomonas volátiles emitidas por las uvas y potencialmente utilizadas por las hembras de *Cryptoblabes gnidiella* para detectar el sitio preferido de oviposición.

# CAPÍTULO 1

## OBJETIVO

Estudiar la respuesta electrofisiológica y comportamental de machos de *Cryptoblabes gnidiella* a los formiatos análogos de la feromona sexual.

## MATERIALES Y MÉTODOS

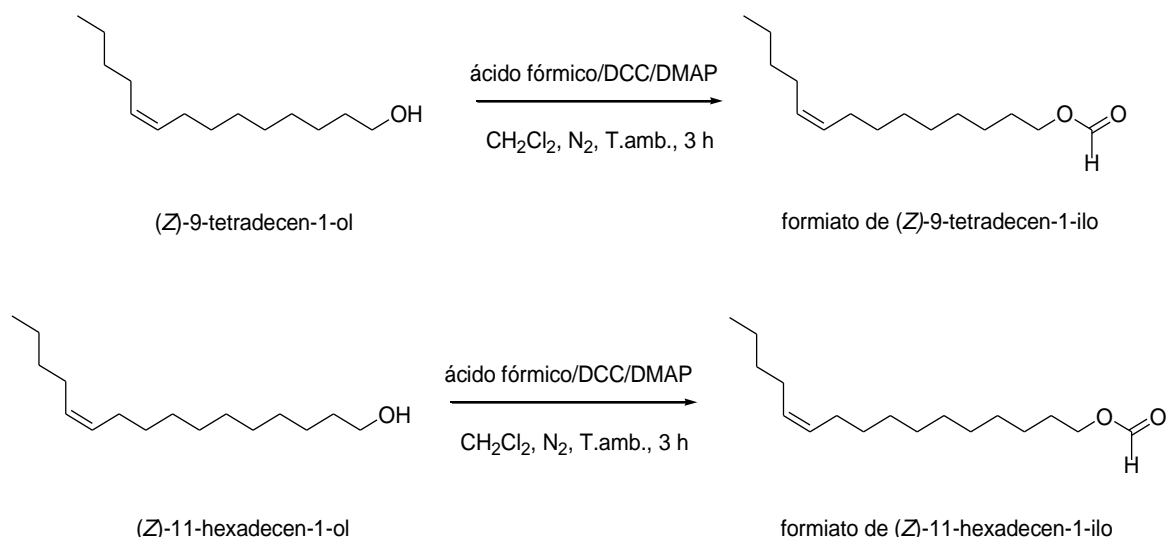
### 1- Síntesis química

#### 1.1- Síntesis de la feromona sexual de *C. gnidiella*

Los componentes de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal y (Z)-13-octadecenal, fueron sintetizados previamente en nuestro laboratorio o se obtuvieron mediante oxidación de los correspondientes alcoholes (también sintetizados previamente) con PCC (clorocromato de piridinio, relación molar 1:2.2) en diclorometano [1]. El producto crudo en diclorometano fue filtrado a través de sílica gel. Posteriormente se evaporó el solvente y el residuo fue purificado por cromatografía flash (sílica gel, hexano-acetato de etilo 9:1).

#### 1.2- Síntesis de los análogos de la feromona sexual de *C. gnidiella*

Se sintetizaron ambos análogos de la feromona sexual de *C. gnidiella*, formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo, a partir de los correspondientes alcoholes (Pherobank, Holanda, esquema 1). Los formiatos utilizados en el experimento a campo donde se evaluó la eficiencia de los mismos en el control de *C. gnidiella*, fueron comprados en Pherobank (Holanda).



**Esquema 1. Reacción de formilación.**

Se agregó diciclohexilcarbodiimida (DCC, 0.38 g, 1.84 mmol) a una solución de ácido fórmico (70  $\mu\text{L}$ , 1.84 mmol) en diclorometano seco (6 mL). Posteriormente se agregó el alcohol, (Z)-9-tetradecenol (0.3 g, 1.41 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, cantidad catalítica) [2]. El mismo procedimiento fue utilizado con (Z)-11-hexadecenol (0.3 g, 1.25 mmol), ajustando la cantidad de reactivos para mantener las mismas relaciones molares. Se agitó la mezcla durante 4 horas bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. A continuación se diluyó el crudo de reacción con diclorometano (15 mL), se filtró y se lavó con una solución saturada de NaCl. Luego de la evaporación del solvente, el residuo fue purificado por cromatografía flash (sílica gel, hexano-acetato de etilo 9:1).

Con el fin de corroborar la identidad de los compuestos sintetizados, éstos se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y mediante resonancia magnética nuclear (RMN). El GC-MS utilizado fue un QP-2010 Shimadzu, equipado con una columna OPTIMA-5-MS (Macherey-Nagel, 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ), con flujo de gas carrier (He) constante de 1 mL/min. El programa de temperatura del horno fue de 70  $^{\circ}\text{C}$  (1 min) hasta 300  $^{\circ}\text{C}$  a 7  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , la temperatura del inyector fue 250  $^{\circ}\text{C}$ , y la de la interfase 310  $^{\circ}\text{C}$ . La inyección (1  $\mu\text{L}$ ) se realizó en modo split y se utilizó una fuente de ionización de impacto electrónico (70 eV). Los espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) se obtuvieron mediante un espectrómetro Bruker Avance DPX 400 (400 MHz para  $^1\text{H}$ ; 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), utilizando como solvente  $\text{CDCl}_3$  y TMS como estándar interno.

## 2- Insectos

Las larvas de *C. gnidiella* fueron colectadas en un viñedo infestado de la localidad de Juanicó (Canelones, 34°34' S, 56°15' O). Las larvas se criaron hasta el estado de pupa, en racimos de uva remanentes en la viña después de la cosecha (fig. 5), bajo fotoperíodo invertido 14:10 horas (L:O), a 22±1 °C y 70–80 % de humedad relativa. Las pupas fueron sexadas y se mantuvieron separadas en recipiente de plástico cilíndrico (12 cm diam., 11.5 cm altura) hasta la emergencia de los adultos. Los adultos se alimentaron con una dieta líquida a base de miel y azúcar, hasta que fueron utilizados en los experimentos.

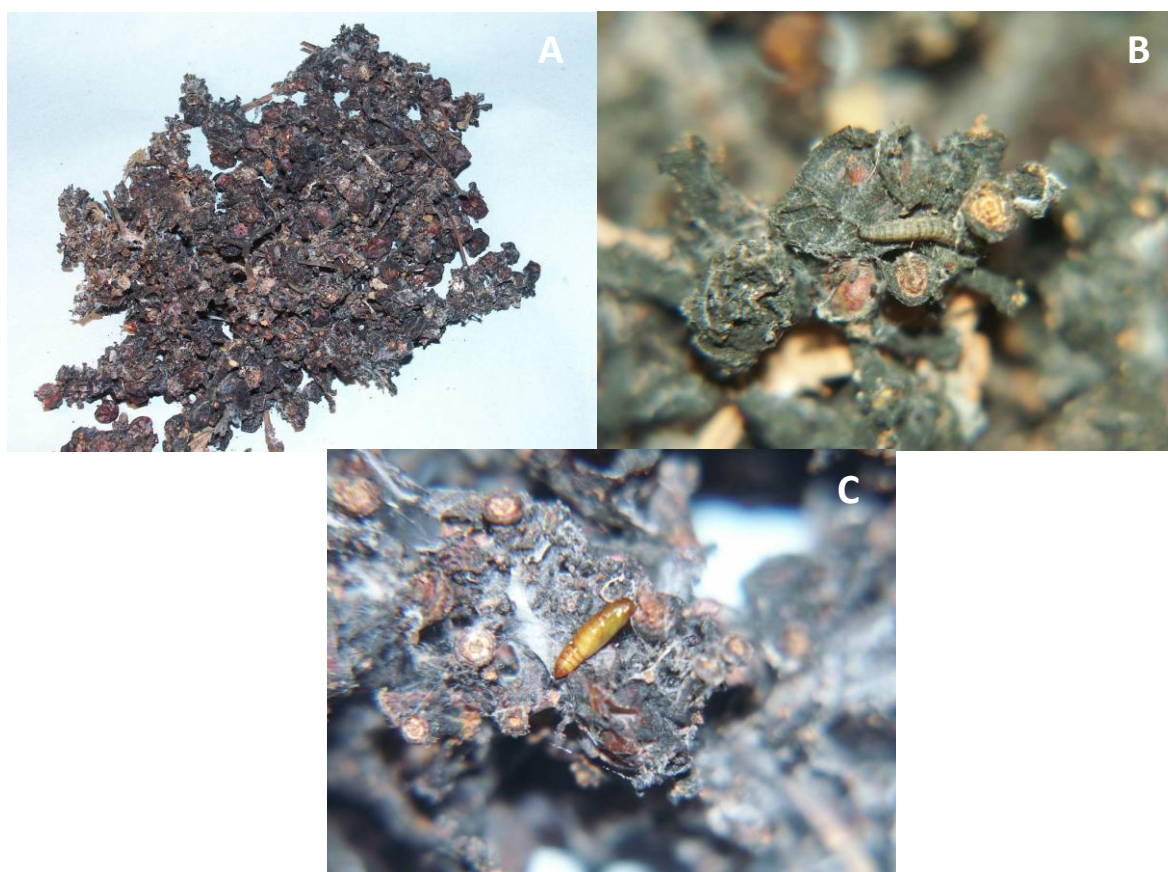


Figura 5. Insectos colectados de un viñedo infestado en la localidad de Juanicó (Canelones, 34°34' S, 56°15' O). A) Racimos de uva remanentes en la viña, B) larva de *Cryptoblabes gnidiella*, C) pupa de *C. gnidiella*.



### 3- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de machos de *C. gnidiella*

Se estudió la respuesta de la antena de los machos de *C. gnidiella* a los formiatos mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de electroantenograma (GC-EAD, fig. 6).

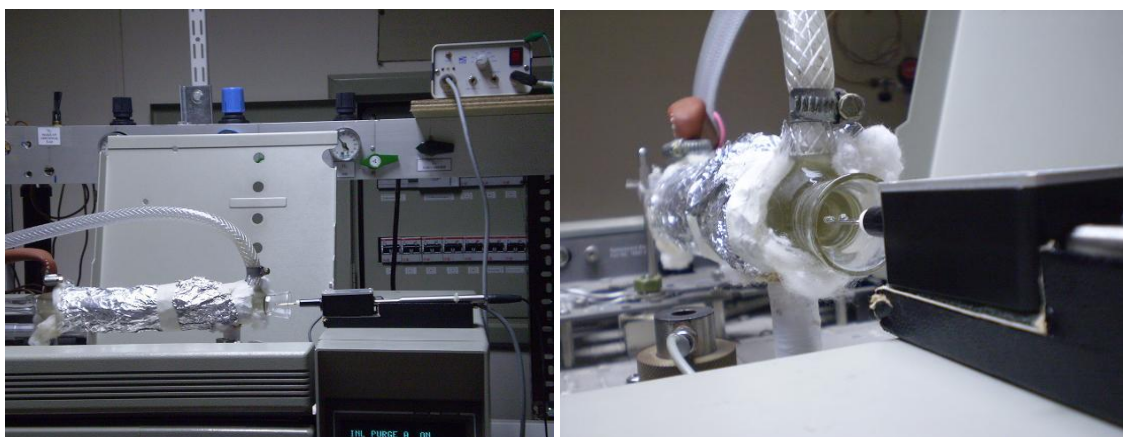


Figura 6. Cromatografo de gases acoplado a un detector de electroantenograma (GC-EAD).

En esta técnica se divide el final de la columna cromatográfica, de modo que un extremo se dirige a la antena (EAD) y el otro al detector FID, posibilitando la obtención simultánea de la respuesta química y electrofisiológica (antena). En el EAD, los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica son dirigidos hacia afuera del cromatógrafo a través de una tubo de sílica fundida similar a una columna de GC (0,22 mm diam. int., sin fase estacionaria), mantenida a 220 °C para evitar la condensación de los mismos. Una vez fuera del GC, los volátiles son arrastrados hacia la antena (1 cm) por una corriente (300 mL/min) de aire limpio (carbón activado) y húmedo, a través del lumen de un refrigerante de camisa por el que circula agua fría. La antena se suspende entre dos electrodos conectados a un amplificador de alta impedancia (Syntech, Holanda; fig. 7). La antena se colocó entera, inmediatamente después de separada del insecto, y se adhirió a los electrodos metálicos utilizando un gel conductor (Parker Laboratories, Inc., USA).



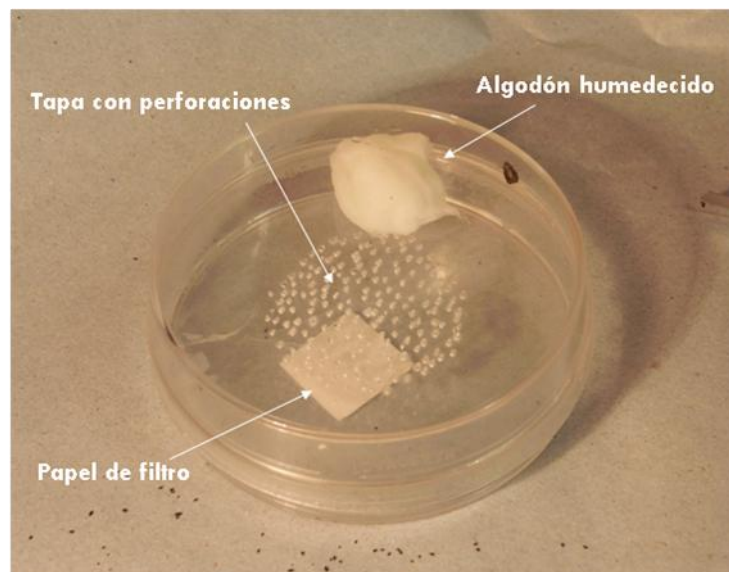
**Figura 7. Antena de *Cryptoblabes gnidiella* suspendida entre dos electrodos mediante gel conductor.**

El GC constó con una columna Elite-5 (Perkin Elmer, Fremont, CA, USA, 30 m × 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m), a un flujo constante de gas carrier ( $H_2$ ) de 2 mL/min. El programa de temperatura utilizado fue de 70 °C (1 min) hasta 240 °C a 10 °C/min, la temperatura del inyector 220 °C y la temperatura del detector FID 250 °C. La inyección se realizó en modo split.

#### **4- Estudio de inhibición sensorial**

Se realizó un experimento de pre-exposición para evaluar si la exposición previa de los machos a los formiatos análogos de la feromona sexual tiene un efecto inhibitorio, en la respuesta de la antena a los componentes normales de la feromona. Para llevar a cabo este experimento se utilizó un sistema diseñado en el laboratorio que constó de dos cámaras separadas por una tapa con perforaciones (150 perforaciones uniformemente distribuidas, 1 mm diámetro, fig. 8). En la cámara superior (placa de petri de 9 cm de diámetro) se colocó un macho de 1-3 días (N= 10) y un algodón humedecido con agua para mantener el ambiente húmedo. En la cámara inferior se colocó un papel de filtro (2 x 2 cm) impregnado con 5  $\mu$ g de la mezcla 1:1 de formiatos (o con hexano como control). De esta manera el vapor de los formiatos asciende a la cámara superior a través de las perforaciones. Los formiatos se disolvieron en hexano y se dejó evaporar el solvente antes de comenzar el experimento. Los machos se expusieron durante 1 hora en oscuridad, luego se transfirieron

a un vial limpio y se enfriaron por 5 – 10 min, para posteriormente extraer la antena y estudiar la respuesta a ambos componentes de la feromona mediante GC-EAD.



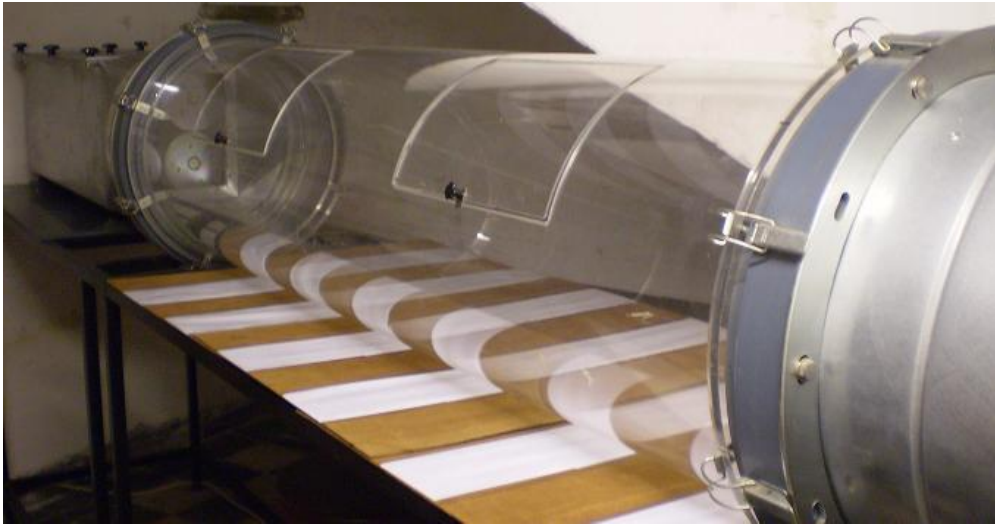
**Figura 8. Sistema diseñado para estudiar el efecto de pre-exposición a formiatos, en la respuesta a ambos componentes de la feromona.**

Las condiciones utilizadas en el cromatógrafo de gases fueron las descritas anteriormente, excepto que el programa de temperatura fue de 150 °C (1 min) hasta 240 °C a 10 °C/min. Se cuantificó la respuesta de la antena a la feromona (mezcla 1:1, 0.5 mg/mL, 0.5 µL, relación de split 30:1) como la altura de la señal de EAD, y se comparó en forma relativa (test de Mann-Whitney) con la respuesta de la antena de machos control (N = 10) que fueron tratados bajo las mismas condiciones pero sin exponerlos a los formiatos.

## **5- Estudio de comportamiento de machos de *C. gnidiella* en túnel de viento**

Para estudiar el comportamiento de los machos frente a los formiatos se utilizó un túnel de viento. Éste es un cilindro de acrílico transparente (150 cm de largo, 40 cm de diámetro, fig. 9), por el cual se hace pasar aire previamente filtrado por carbón activado a una velocidad controlada. En un extremo se coloca el estímulo olfatorio y en el otro se coloca el macho adulto. El aire arrastra los compuestos a evaluar, creando una pluma de

olor a la cual el macho responderá volando en la dirección opuesta al viento si el estímulo es atrayente.



**Figura 9. Túnel de viento.**

El túnel de viento está equipado con una bomba de succión controlada, filtros de carbón activado y una placa de metal para laminar el flujo de aire (0.2 – 0.3 m/s). Los experimentos se llevaron a cabo a 21 – 25 °C y 70 – 80 % de humedad relativa. Dos horas antes del experimento, se colocó un macho virgen de 3-5 días de edad en un tubo de vidrio (8 cm largo × 4.5 cm diam.) con tul en ambos extremos. El experimento se llevo a cabo en la oscuridad (1-5 horas antes de la fotofase), observando la respuesta comportamental de los machos mediante una cámara digital con tecnología night-vision (Sony DCR-SR45). Cada tubo conteniendo un macho se colgó al final del túnel de viento, se mantuvo cerrado por 1 minuto para permitir que la pluma de olor alcance al macho, luego se removió el tul y se registró el comportamiento durante 10 minutos. Los comportamientos registrados fueron, vuelo en la pluma (vuelo orientado, directo a la fuente) y contacto con la fuente. Cada macho fue testeado solo una vez.

Se evaluaron 5 tratamientos: a) un septo de goma conteniendo 50 µg de feromona (relación de componentes 1:1); b) un septo de goma con 50 µg de formiatos (relación de componentes 1:1); c) un septo de goma con 50 µg de feromona (relación 1:1) más 50 µg de formiatos (relación 1:1); d) hembras vírgenes llamando (3–7 días de edad); y e) hembras

vírgenes llamando con un septo de goma conteniendo 50  $\mu\text{g}$  de formiatos (relación 1:1) colocado encima del tubo donde se encontraban las hembras (fig. 10). Además se evaluaron septos con hexano (solvente utilizado en las soluciones de feromona y formiatos) como control. Los tratamientos se colgaron en la entrada del túnel dentro de un tubo de vidrio (8 cm largo  $\times$  4.5 cm diam.).

Los septos se limpiaron previamente a su uso mediante agitación magnética en dos solventes, una hora en hexano y una hora en etanol. Cuando el tratamiento constaba de hembras vírgenes, se colocaron 1-2 hembras en un tubo de vidrio 2 horas antes del experimento; en todas las réplicas al menos una de las hembras se encontraba en postura de llamada durante el período del experimento (fig. 10). Se testearon 15 machos en cada tratamiento, excepto en (c), en el cual se testearon 20 machos. Los datos de comportamiento de los diferentes tratamientos fueron comparados mediante test de Chi-cuadrado.



**Figura 10. Hembra de *Cryptoblabes gnidiella* en postura de llamada dentro del tubo de vidrio; encima del mismo se encuentra el septo conteniendo una mezcla 1:1 de formiatos.**

## RESULTADOS

### 1- Síntesis química

#### 1.1- Síntesis de la feromona sexual de *C. gnidiella*

Ambos componentes de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal y (Z)-13-octadecenal, sintetizados a partir de los correspondientes alcoholes, fueron obtenidos con buena pureza (97 y 96% por GC-MS, respectivamente). El análisis de los productos finales por espectrometría de masas (ver anexo del capítulo 1) mostró los siguientes resultados:

(Z)-11-hexadecenal:

94 % de similitud con el espectro de la base de datos (NIST 05)

MS (EI) m/z (%): 238 (0.4); 237 (0.6); 209 (0.7); 152 (5); 149 (6); 138 (6); 137 (5); 136 (6); 135 (13); 125 (9); 124 (10); 123 (10); 122 (8); 121 (22); 112 (13); 111 (22); 110 (16); 109 (20); 108 (8); 107 (8); 99 (6); 98 (42); 97 (37); 96 (38); 95 (41); 94 (11); 93 (12); 85 (11); 84 (24); 83 (46); 82 (44); 81 (50); 80 (12); 79 (13); 71 (14); 70 (29); 69 (60); 68 (24); 67 (46); 57 (27); 56 (26); 55 (100); 54 (17); 53 (5); 43 (25); 42 (8); 41 (43).

(Z)-13-octadecenal:

92 % de similitud con el espectro de la base de datos (NIST 05)

MS (EI) m/z (%): 266 (2); 248 (5); 152 (5); 149 (6); 138 (6); 137 (5); 136 (6); 135 (13); 125 (9); 124 (10); 123 (10); 122 (8); 121 (22); 112 (13); 111 (22); 110 (16); 109 (20); 108 (8); 107 (8); 99 (6); 98 (42); 97 (37); 96 (38); 95 (41); 94 (11); 93 (12); 85 (11); 84 (24); 83 (46); 82 (44); 81 (50); 80 (12); 79 (13); 71 (14); 70 (29); 69 (60); 68 (24); 67 (46); 57 (27); 56 (26); 55 (100); 54 (17); 53 (5); 43 (25); 42 (8); 41 (43).

En ambos espectros de masas se observó el ión molecular,  $m/z$  238 para el (Z)-11-hexadecenal y  $m/z$  266 para el (Z)-13-octadecenal, así como una pérdida de 18 unidades de masa correspondiente a la pérdida de una molécula de H<sub>2</sub>O y un ion base de  $m/z$  55.

## 1.2- Síntesis de los análogos de la feromona sexual de *C.gnidiella*

Ambos análogos estructurales, formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo, se obtuvieron con buenos rendimientos y pureza (90% rendimiento y 99% pureza, por GC-MS). El análisis de los productos finales por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (ver anexo del capítulo 1) mostró los siguientes resultados:

Formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo:

MS (EI)  $m/z$  (%): 240 (0.02); 194 (14); 166 (3); 152 (3); 151 (3); 138 (12); 137 (8); 124 (17); 123 (14); 111 (5); 110 (32); 109 (29); 98 (3); 97 (16); 96 (75); 95 (58); 94 (3); 84 (5); 83 (27); 82 (100); 81 (88); 80 (5); 79 (7); 70 (11); 69 (46); 68 (49); 67 (73); 66 (8); 57 (9); 56 (19); 55 (99); 54 (39); 53 (6); 43 (15); 42 (9); 41 (44).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.06 (s, 1H, OCOH); 5.30-5.39 (m, 2H, CH=CH); 4.16 (t, J=6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O); 1.99-2.02 (m, 4H, H<sub>2</sub>C-CH=CH); 1.62-1.69 (m, 2H, H<sub>2</sub>C-CH<sub>2</sub>O); 1.26-1.37 (m, 14H, CH<sub>2</sub>); 0.89 (t, J=7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 161.4; 130.1; 129.9; 64.3; 32.1; 29.8; 29.5; 29.3; 29.3; 28.6; 27.3; 27.1; 25.9; 22.5; 14.2.

Formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo:

MS (EI)  $m/z$  (%): 268 (0.09); 222(12); 166 (4); 152 (4); 151 (3); 138 (12); 137 (9); 125 (3); 124 (21); 123 (17); 111 (9); 110 (34); 109 (30); 98 (4); 97 (25); 96 (85); 95 (57); 94 (3); 84 (6); 83 (37); 82 (100); 81 (79); 80 (5); 79 (7); 71 (4); 70 (12); 69 (52); 68 (48); 67 (64); 66 (6); 57 (13); 56 (18); 55 (99); 54 (34); 53 (5); 43 (20); 42 (9); 41 (49).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 8.06 (s, 1H, OCOH); 5.30-5.39 (m, 2H, CH=CH); 4.16 (t, J=6.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 1.97-2.04 (m, 4H,  $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}$ ); 1.62-1.69 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2\text{O}$ ); 1.27-1.37 (m, 18H,  $\text{CH}_2$ ); 0.89 (t, J=7.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 161.4; 130.0; 130.0; 64.3; 32.1; 29.9; 29.7; 29.6; 29.6; 29.4; 29.3; 28.6; 27.3; 27.1; 26.0; 22.5; 14.2.

Los espectros de masas de ambos formiatos mostraron el ion molecular,  $m/z$  240 para el formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y  $m/z$  268 para el formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo, y una pérdida de 46 unidades de masa correspondiente al rearrreglo de McLafferty con posterior ruptura inductiva con pérdida de  $\text{CO}_2\text{H}_2$ .

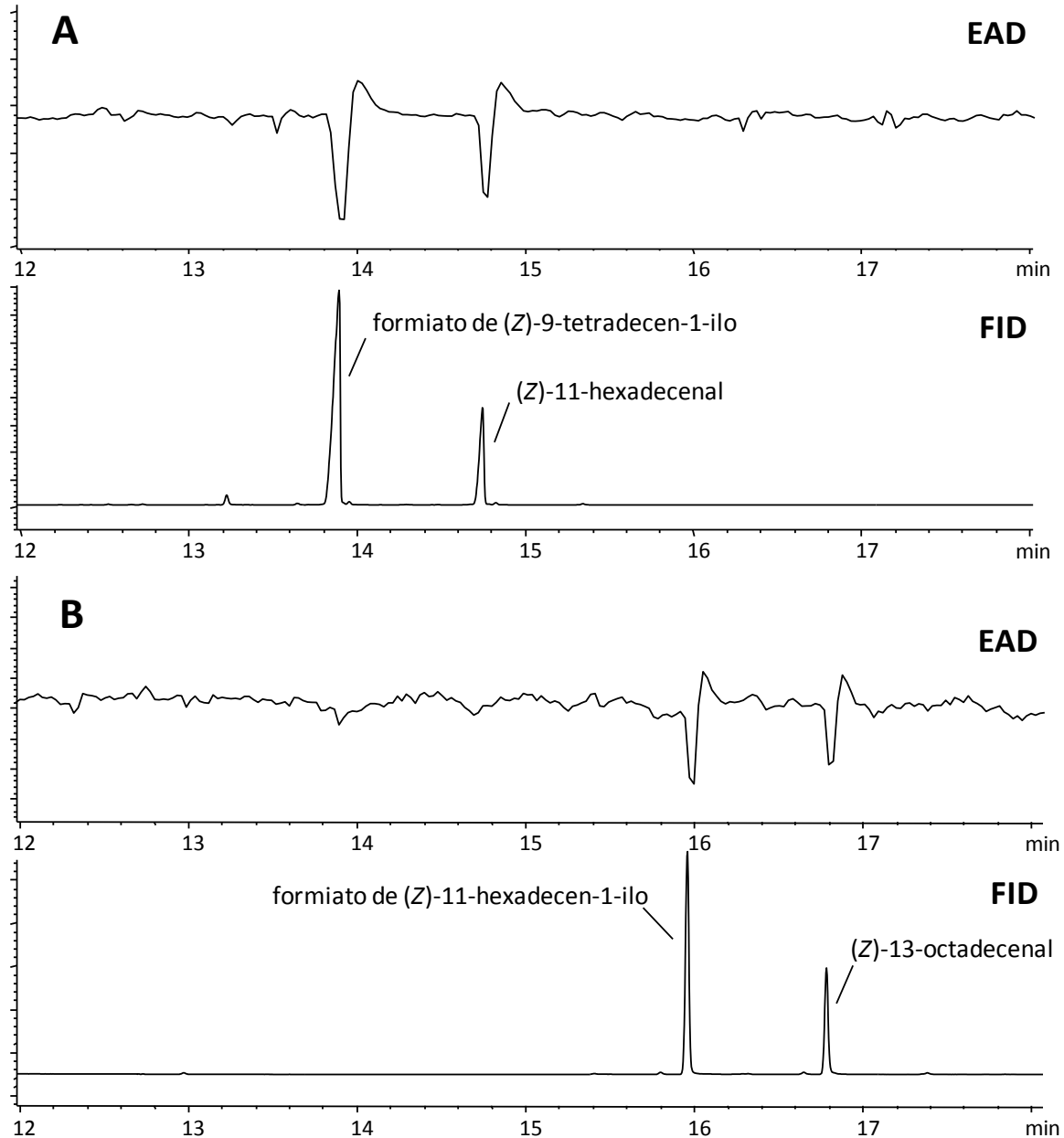
En ambos espectros de protón se observó una única señal con desplazamiento químico 8.06 correspondiente al protón del grupo funcional formiato. Se observó asimismo un multiplete con desplazamiento químico de 5.3, correspondiente a los dos protones olefínicos del doble enlace. Se observaron claramente las señales correspondientes a los protones de los metilenos en posiciones alfa y beta al grupo formiato en 4.2 y 1.6 respectivamente, y las señales correspondientes a los protones alílicos en 2.0.

## **2- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de machos de *C. gnidiella***

Se obtuvo una respuesta clara y reproducible (N= 5) de la antena de machos de *C. gnidiella* a ambos análogos, formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo. Esto demuestra que el sistema sensorial de los machos de *C. gnidiella* puede detectar ambos formiatos, posiblemente debido a la similitud estructural con los componentes de la feromona sexual.

Aunque estas respuestas no fueron cuantificadas, fueron similares en magnitud a las respuestas de los componentes de la feromona (fig. 11). Se observa que una única antena responde al análogo y seguidamente a la feromona, lo que sugiere que la recepción del análogo no bloquea la respuesta de los receptores de la antena a la feromona natural.



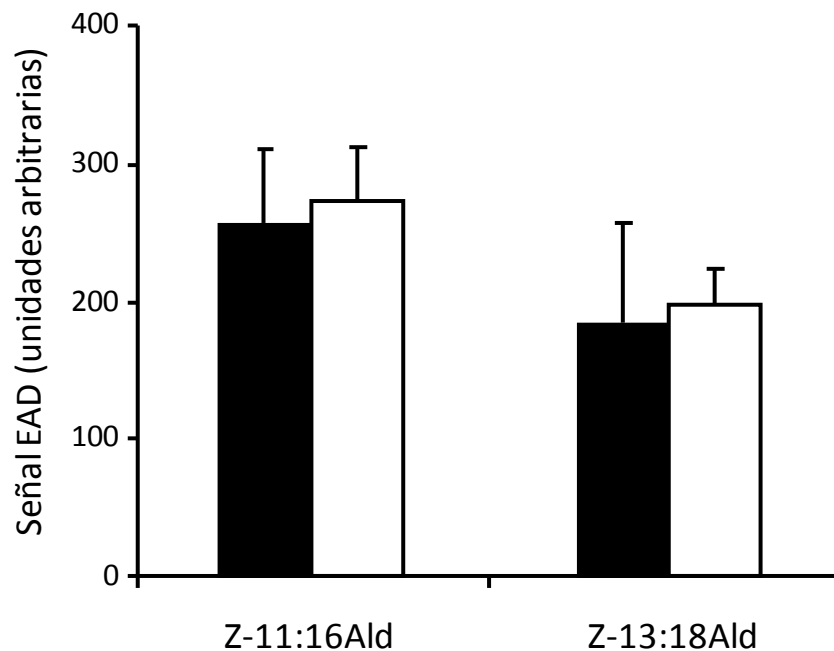


**Figura 11.** Respuesta electrofisiológica (EAD) de la antena de un macho de *Cryptoblabes gnidiella* a una co-inyección de uno de los componentes de la feromona y su correspondiente formiato análogo: A) (Z)-11-hexadecenal y formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo, y B) (Z)-13-octadecenal y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo. EAD = detector de electroantenograma; FID = detector de ionización por llama.

### 3- Estudio de inhibición sensorial

La magnitud de la señal de EAD a ambos componentes de la feromona fue similar independientemente de si los machos fueron expuestos a vapores de formiatos o de hexano

(control) (fig. 12). Estos resultados son consistentes con lo observado anteriormente (sección 2); y sugieren que los receptores de la antena no son bloqueados por los formiatos a la concentración testada.

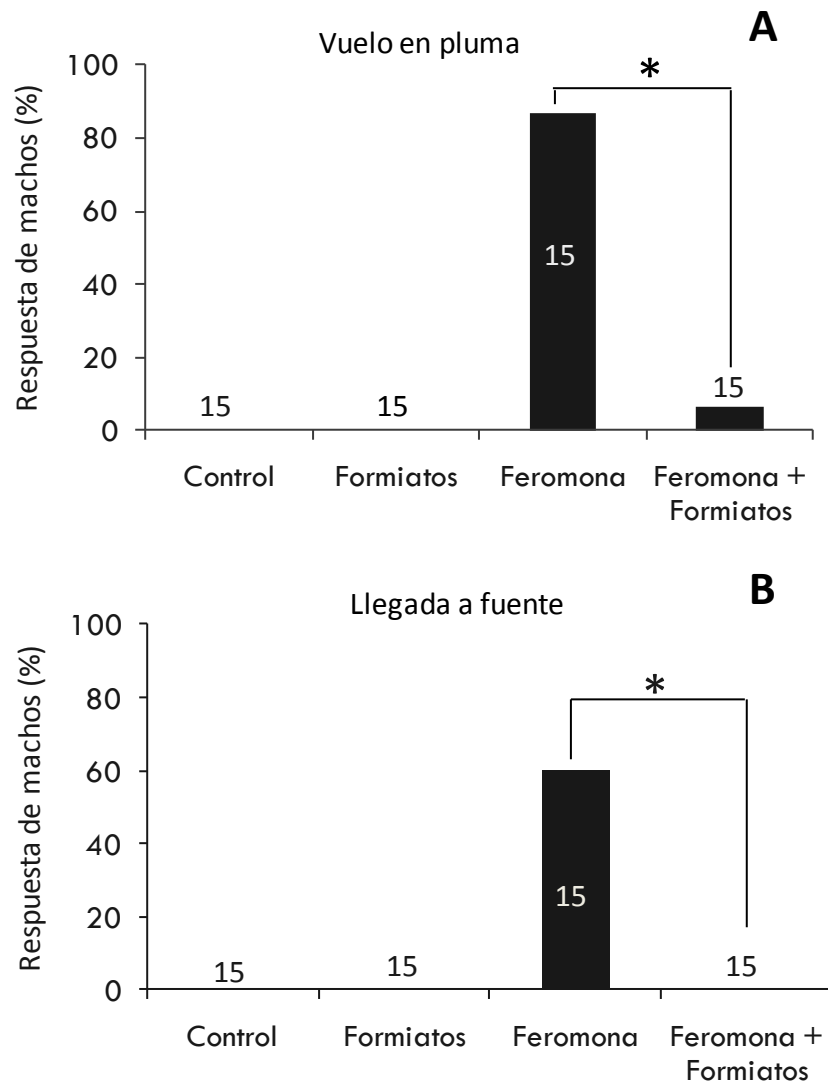


**Figura 12.** Comparación de la magnitud de las respuestas electrofisiológicas (EAD) de antenas de machos de *Cryptoblabes gnidiella* a los componentes de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal (Z-11:16Ald) y (Z)-13-octadecenal (Z-13:18Ald), luego de la pre-exposición a vapores de formiatos análogos de la feromona (barras blancas) o al control (barras negras). Las respuestas se expresan como la altura de pico de la señal de la antena (en unidades arbitrarias). N= 10 antenas/tratamiento, provenientes de diferentes machos. Las barras de error indican error estándar de la media,  $P > 0.3$  para ambos componentes de la feromona (test de Mann-Whitney).

#### 4- Estudio de comportamiento de machos de *C. gnidiella* en túnel de viento

No se observó respuesta de los machos en el túnel de viento a los septos control (hexano) o con formiato (fig. 13). Cuando se evaluó la feromona sintética, más del 85% (13/15) de los machos testados volaron en la pluma de olor (fig. 13A), y el 60% (9/15) llegaron a la fuente de olor (fig. 13B y 14). Sin embargo, se observó un efecto antagonista cuando los machos se expusieron a una mezcla de feromona y formiatos, ya que volaron en

la pluma solo el 6.6% (1/15) de los machos (fig. 13A), mientras que ninguno llegó a la fuente de olor (fig. 13B).

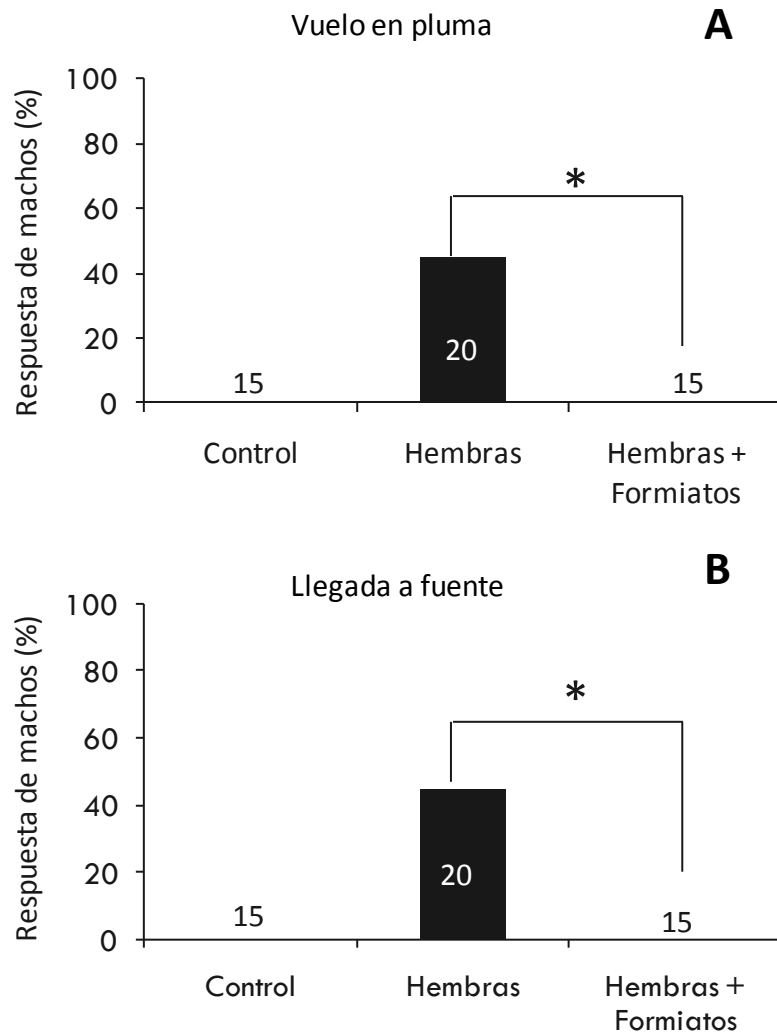


**Figura 13.** Respuesta comportamental de machos de *Cryptoblabes gnidiella* en túnel de viento a diferentes fuentes de olor: hexano (control), 50 µg de formiatos (1:1), 50 µg de feromona (1:1) o 50 µg de feromona más 50 µg de formiatos (ambos 1:1). N= 15 machos/ tratamiento. Los asteriscos indican respuestas diferentes entre pares de tratamientos (test de  $\chi^2$ ;  $P < 0.01$ ). A) Vuelo en pluma y B) Llegada a fuente de olor.



**Figura 14.** Comportamiento de cortejo de un macho de *Cryptoblabes gnidiella*, exhibiendo el cepillo de pelos, cuando contactó un septo conteniendo feromona sexual.

Este efecto también fue notorio cuando se testearon hembras vírgenes. El 45% (9/20) de los machos volaron en la pluma (fig. 15A) y todos ellos llegaron a la fuente de olor (fig. 15B y 16) cuando se expusieron a hembras en postura de llamada, mientras que cuando se testearon hembras vírgenes en combinación con un septo conteniendo formiatos, ningún macho voló en la pluma o contactó el receptáculo conteniendo las hembras (fig. 15).



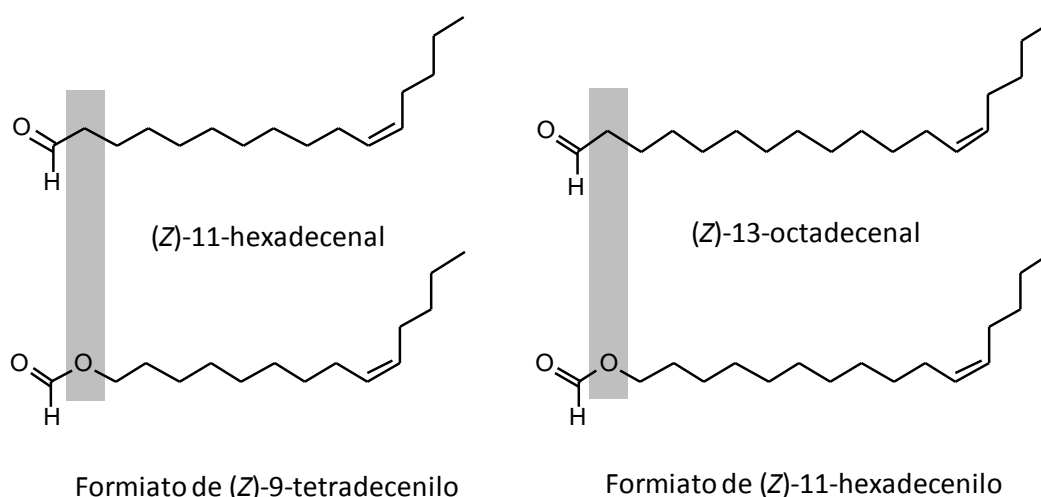
**Figura 15.** Respuesta comportamental de machos de *Cryptoblabes gnidiella* en túnel de viento a diferentes fuentes de olor: hexano (control, N= 15), hembras vírgenes llamando (N= 20), o hembras vírgenes llamando más un septo con 50 µg de formiatos (1:1) (N= 15). Los asteriscos indican respuestas diferentes a pares de tratamientos (test de  $\chi^2$ ;  $P < 0.01$ ). A) Vuelo en pluma y B) Llegada a fuente de olor.



**Figura 16.** Comportamiento de cortejo de macho de *Cryptoblabes gnidiella* cuando alcanzó el tubo de vidrio conteniendo una hembra llamando.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que el sistema sensorial de los machos de *C. gnidiella* detecta ambos análogos de la feromona sexual, formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo. La similitud estructural de los mismos con los componentes de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal y (Z)-13-octadecenal, respectivamente (fig. 17), podría resultar en una interacción favorable de los análogos con las proteínas transportadoras y receptores dendríticos correspondientes. El cambio estructural entre cada componente de la feromona y su correspondiente análogo es el reemplazo de un grupo metileno en la posición alfa al grupo carbonilo del aldehído, por un átomo de oxígeno, sin cambiar la posición relativa del doble enlace y el largo de cadena (con respecto al grupo carbonilo).



**Figura 17. Estructuras químicas de los componentes de la feromona sexual de *Cryptoblabes gnidiella*, (Z)-11-hexadecenal y (Z)-13-octadecenal, y sus respectivos análogos estructurales, formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo y formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo, respectivamente.**

Aunque esta sustitución conlleva a grandes cambios electrónicos y estructurales en el extremo terminal (grupo funcional) de la molécula, otras características moleculares no se ven demasiado afectadas, y podrían por lo tanto ser reconocidas a nivel sensorial.

Los análogos no actúan como miméticos de la feromona sexual a nivel comportamental, sino como antagonistas, ya que inhibieron la respuesta de los machos a la feromona sintética o natural de las hembras en los estudios de comportamiento en túnel de viento. El efecto antagonista puede ocurrir a nivel periférico o a nivel de la integración de la señal. En cuanto al nivel periférico, es posible que estos compuestos actúen en receptores diferentes a los de la feromona, o que bloqueen los receptores de la feromona. Dada la similitud estructural con los componentes de la feromona, se podría argumentar que actúan sobre los mismos receptores, sin embargo, si existieran receptores para acetatos en las antenas de los machos de *C. gnidiella*, los formiatos podrían estar interactuando con ellos; los formiatos se han estudiado también como análogos de grupos funcionales acetato mostrando tanto efectos inhibidores como sinergistas [3, 4]. Nuestros resultados no permiten concluir si los formiatos se unen a los mismos o a diferentes receptores que los componentes de la feromona, ya que no se realizaron registros de sensilio único. En otras especies, como *Helicoverpa zea* (Noctuidae), Grant et al. (1989) observaron que el componente principal de la feromona sexual, (Z)-11-hexadecenal, y el análogo correspondiente, formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo, provocaban respuestas de la misma clase de neuronas receptoras en la antena de los machos, aunque en este caso a diferencia de nuestro estudio el análogo actúa como mimético [5].

Nuestros datos sugieren que los formiatos análogos no bloquean la respuesta de los receptores a la feromona. Las señales de EAD de la antena fueron similares para ambos componentes de la feromona, independientemente de si los machos habían sido pre-expuestos a formiatos o a solvente como control. Otro dato que apoya la hipótesis de no bloqueo de receptores, es que la misma antena responde al formiato y seguidamente a la feromona en el GC-EAD, con un tiempo entre ambos compuestos de aproximadamente un minuto. Sin embargo, es posible que ocurra el bloqueo de los receptores de la feromona por los análogos si los machos se pre-exponen a mayores cantidades de análogos, o si se disminuye el tiempo transcurrido entre la exposición a los análogos y a la feromona. En un estudio reciente (Giner et al., 2009), en el que se evaluó la actividad de (E,E)-8,10-dodecadienil trifluorometil cetona, análogo del componente principal [(E,E)-8,10-dodecadien-1-ol] de la feromona sexual de la polilla de la manzana, *Cydia pomonella*, se

observó que la respuesta electrofisiológica de la antena de los machos de *C. pomonella* a la feromona disminuyó significativamente sólo cuando los machos fueron expuestos a grandes dosis del análogo (>50 µg), no observándose una disminución con dosis similares a las utilizadas en nuestro experimento (1-10 µg) [6].

Existen varios mecanismos de acción reportados para explicar el efecto antagonista de algunos análogos de feromonas; como la interacción con las proteínas de unión a la feromona (PBPs), encargadas de transportar las moléculas hacia los receptores, o la inhibición de las enzimas responsables del catabolismo de las moléculas de feromona [7]. En nuestro caso, estas hipótesis pueden descartarse ya que la respuesta a nivel periférico no se ve afectada, por lo que parece más probable que los formiatos podrían estar actuando como antagonistas a nivel de la integración de la señal, alterando por ejemplo, la proporción percibida de ambos componentes.

Otros formiatos han sido reportados como miméticos de aldehídos componentes de feromonas sexuales de polillas, pero no como antagonistas del comportamiento. En *Dichocrocis punctiferalis* (Pyralidae), una mezcla 10:1 de los formiatos de (*E*) y (*Z*)-8-tetradecen-1-ilo resultó ser tan atractiva como la feromona natural, una mezcla 10:1 de (*E*) y (*Z*)-10-hexadecenal [8]. Del mismo modo, el formiato de (*Z,E*)-7,9,11-dodecatrienilo, análogo del componente principal de la feromona sexual [(*Z,E*)-9,11,13-tetradecatrienal] de la polilla de los algarrobos, *Ectomyelois ceratoniae* (Pyralidae), fue tan atractivo para los machos, como la feromona natural [una mezcla 8:1:1 de (*Z,E*)-9,11,13-tetradecatrienal, (*Z,E*)-9,11-tetradecadienal y (*Z*)-9-tetradecenal] [9]. En el caso del noctúideo *Heliothis virescens* el efecto no es claro; Tingle y Mitchell (1978) reportaron que los machos de *H. virescens* no respondían a la feromona sexual, una mezcla 16:1 de (*Z*)-11-hexadecenal y (*Z*)-9-tetradecenal, cuando se liberaba simultáneamente con el análogo del componente mayoritario, formiato de (*Z*)-9-tetradecen-1-ilo. De acuerdo a estos autores, la pre-exposición al análogo disminuía la respuesta comportamental de los machos a la feromona [10]. Sin embargo, otro reporte demostró que una mezcla de formiato de (*Z*)-9-tetradecen-1-ilo y (*Z*)-9-tetradecenal en relación 16:1 fue tan atractiva como la feromona natural en experimentos a campo [11].



## BIBLIOGRAFÍA

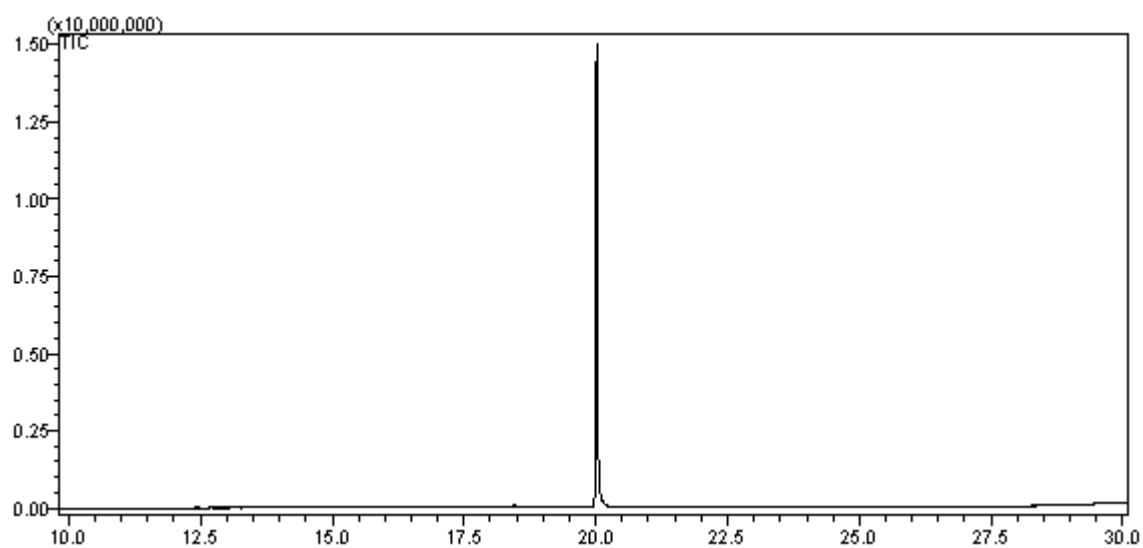
1. Corey, E.J., and Suggs, J.W. (1975). Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters* 16, 2647-2650.
2. Neises, B., and Steglich, W. (1978). Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* 17, 522-524.
3. Butler, L.I., Halfhill, J.E., McDonough, L.M., and Butt, B.A. (1977). Sex attractant of the alfalfa looper *Autographa californica* and the celery looper *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology* 3, 65-70.
4. Roelofs, W.L., and Comeau, A. (1971). Sex pheromone perception: synergists and inhibitors for the red-banded leaf roller attractant. *Journal of Insect Physiology* 17, 435-448.
5. Grant, A.J., Mayer, M.S., and Mankin, R.W. (1989). Responses from sensilla on antennae of male *Heliothis zea* to its major pheromone component and two analogs. *Journal of Chemical Ecology* 15, 2625-2634.
6. Giner, M., Sans, A., Riba, M., Bosch, D., Gago, R., Rayo, J., Rosell, G., and Guerrero, A. (2009). Development and biological activity of a new antagonist of the pheromone of the codling moth *Cydia pomonella*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8514 - 8519.
7. Solé, J., Sans, A., Riba, M., Rosa, E., Bosch, M.P., Barrot, M., Palencia, J., Castella, J., and Guerrero, A. (2008). Reduction of damage by the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, and the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in maize fields by a trifluoromethyl ketone pheromone analog. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 126, 28-39.
8. Mori, K., Watanabe, H., Fujiwhara, M., and Kuwahara, S. (1990). (*E*)- and (*Z*)-Tetradecenyl formate, potent sex-pheromone mimics against the yellow peach moth. *Liebigs Annalen Der Chemie* 12, 1257-1259.
9. Todd, J.L., Millar, J.G., Vetter, R.S., and Baker, T.C. (1992). Behavioral and electrophysiological activity of (*Z,E*)-7,9,11-dodecatrienyl formate, a mimic of the major sex pheromone component of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*. *Journal of Chemical Ecology* 18, 2331-2352.
10. Tingle, F.C., and Mitchell, E.R. (1978). Response of *Heliothis virescens* to pheromonal components and an inhibitor in olfactometers. *Experientia* 34, 153-154.
11. Mitchell, E.R., Tumlinson, J.H., and Baumhover, A.H. (1978). *Heliothis virescens*: attraction of males to blends of (*Z*)-9-tetradecen-1-ol formate and (*Z*)-9-tetradecenal. *Journal of Chemical Ecology* 4, 709-716.

## ANEXO

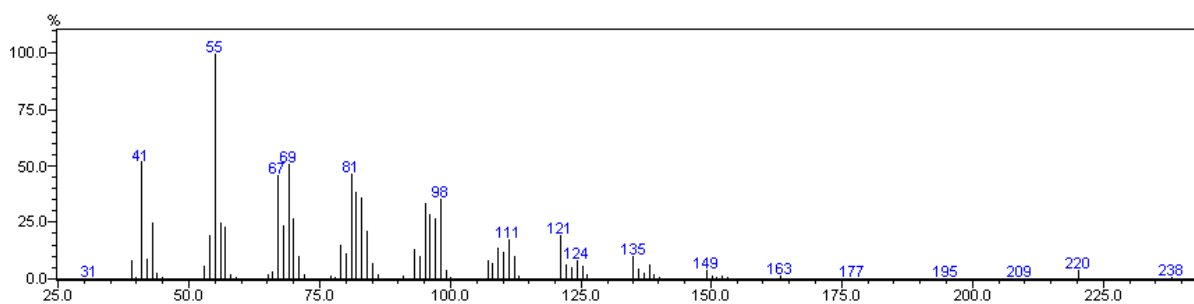
Cromatogramas y espectros de masas y resonancia magnética nuclear de los componentes de la feromona sexual de *C. gnidiella* y sus análogos. Por detalles en las condiciones de adquisición ver sección 1.2 de materiales y métodos.

### (Z)-11-hexadecenal

Cromatograma TIC

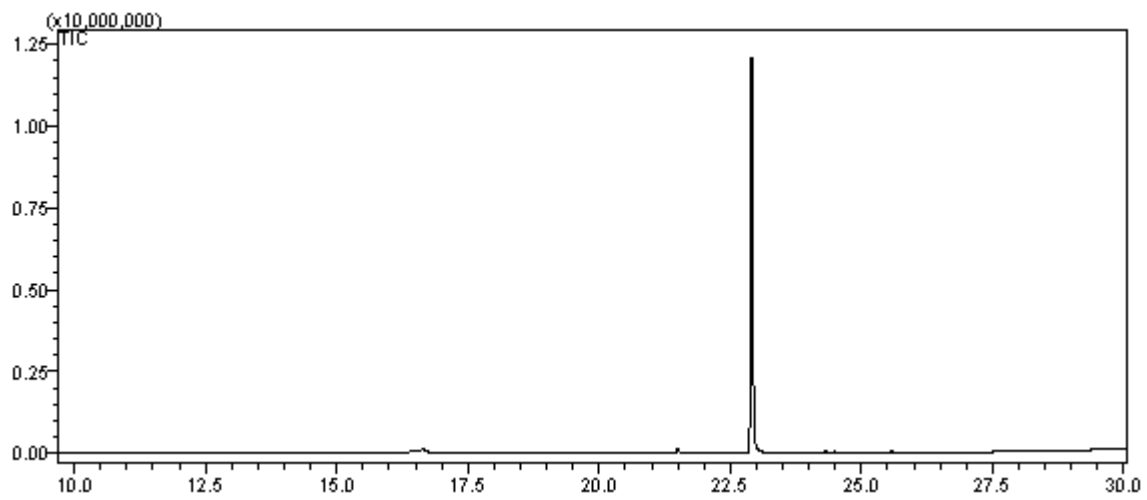


Espectro de masas

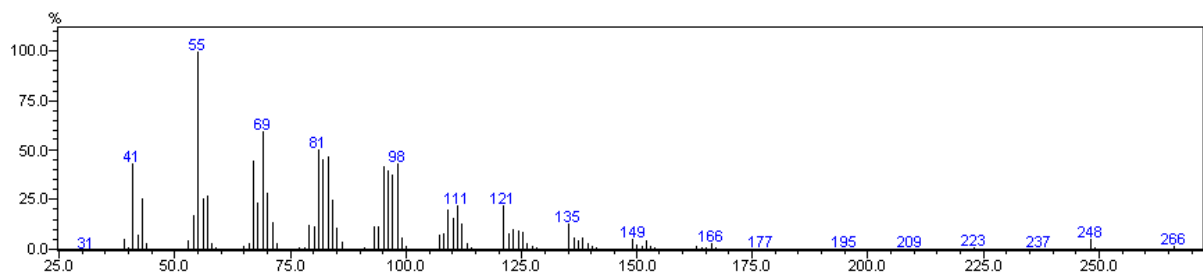


## (Z)-13-octadecenal

Cromatograma TIC

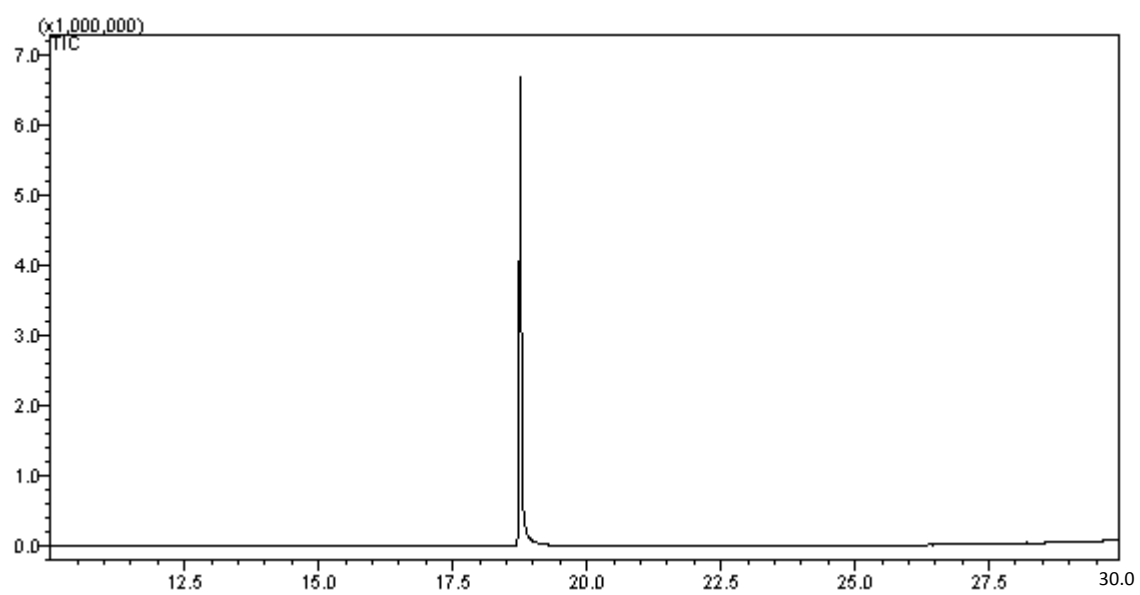


Espectro de masas

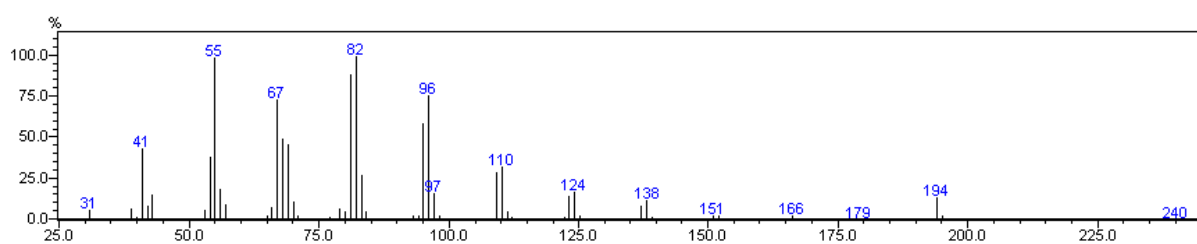


## formiato de (Z)-9-tetradecen-1-ilo

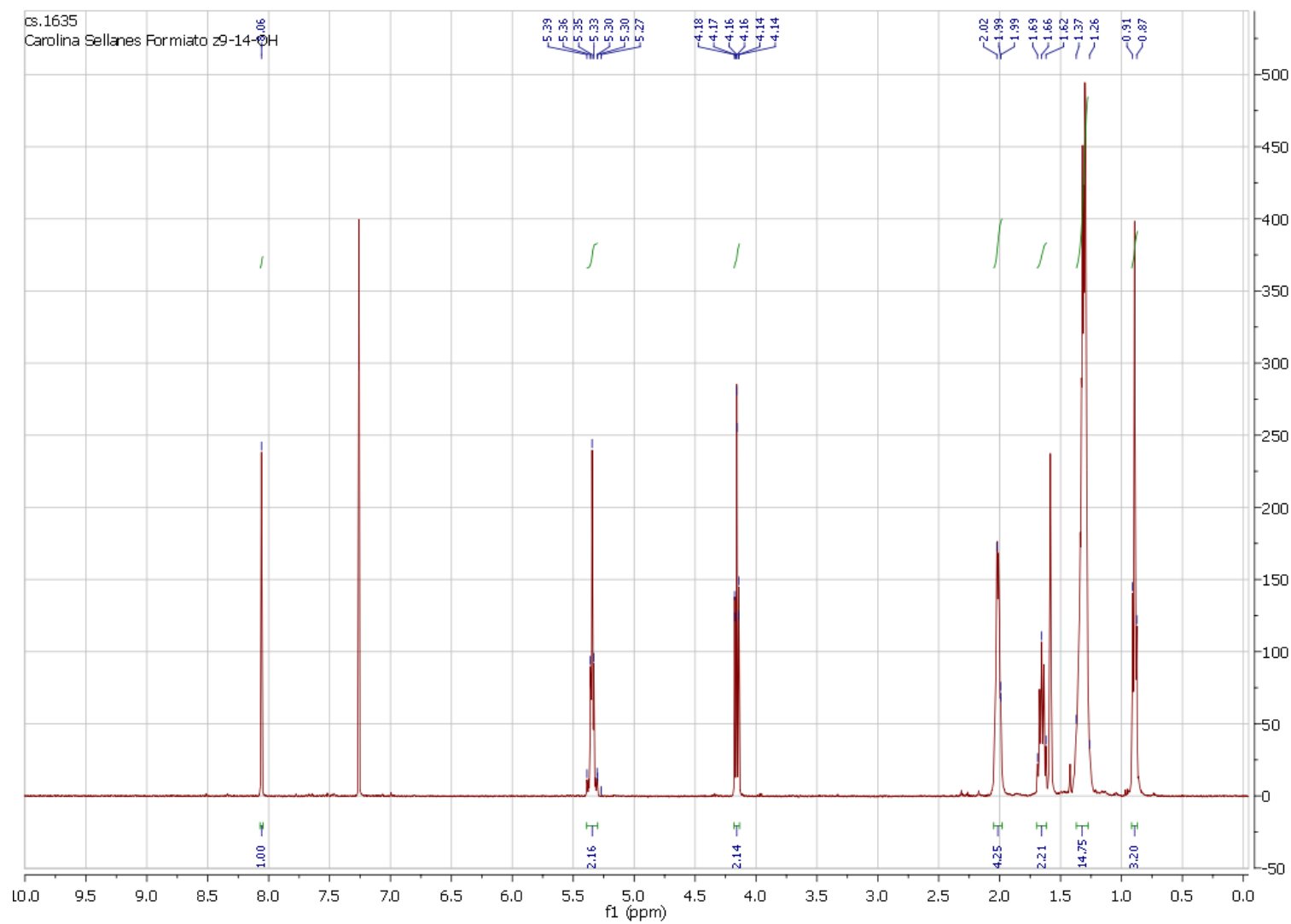
Cromatograma TIC



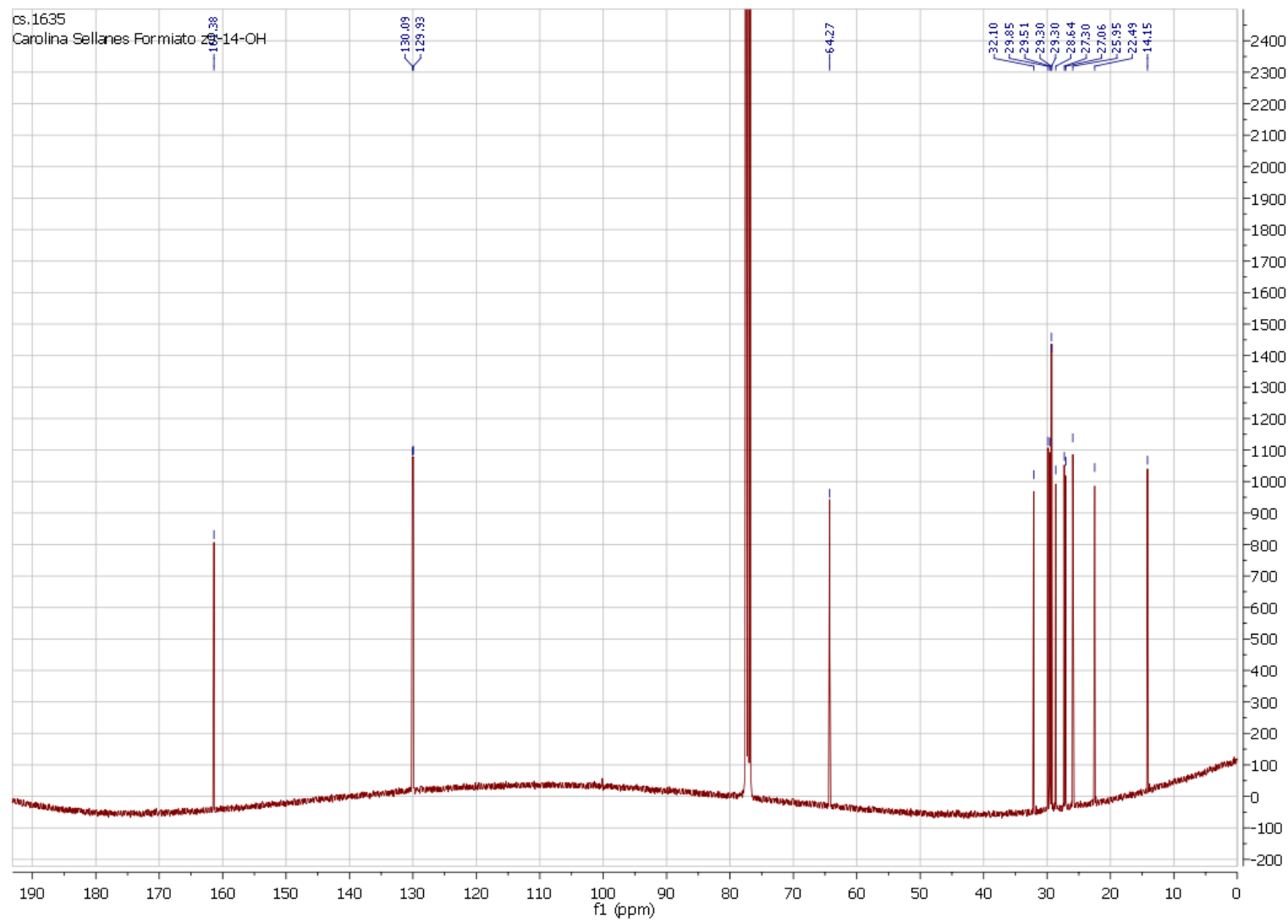
Espectro de masas



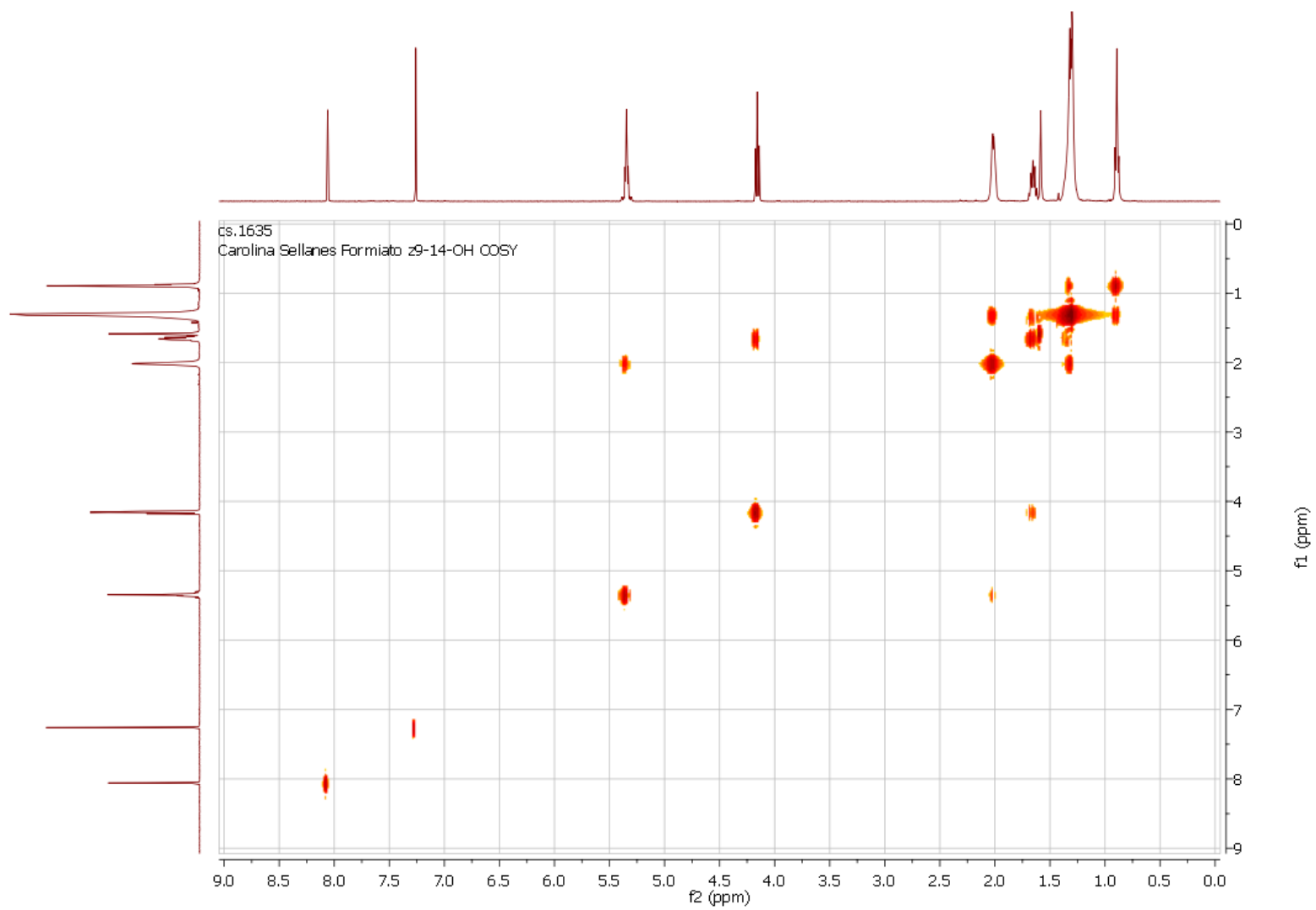
RMN - <sup>1</sup>H



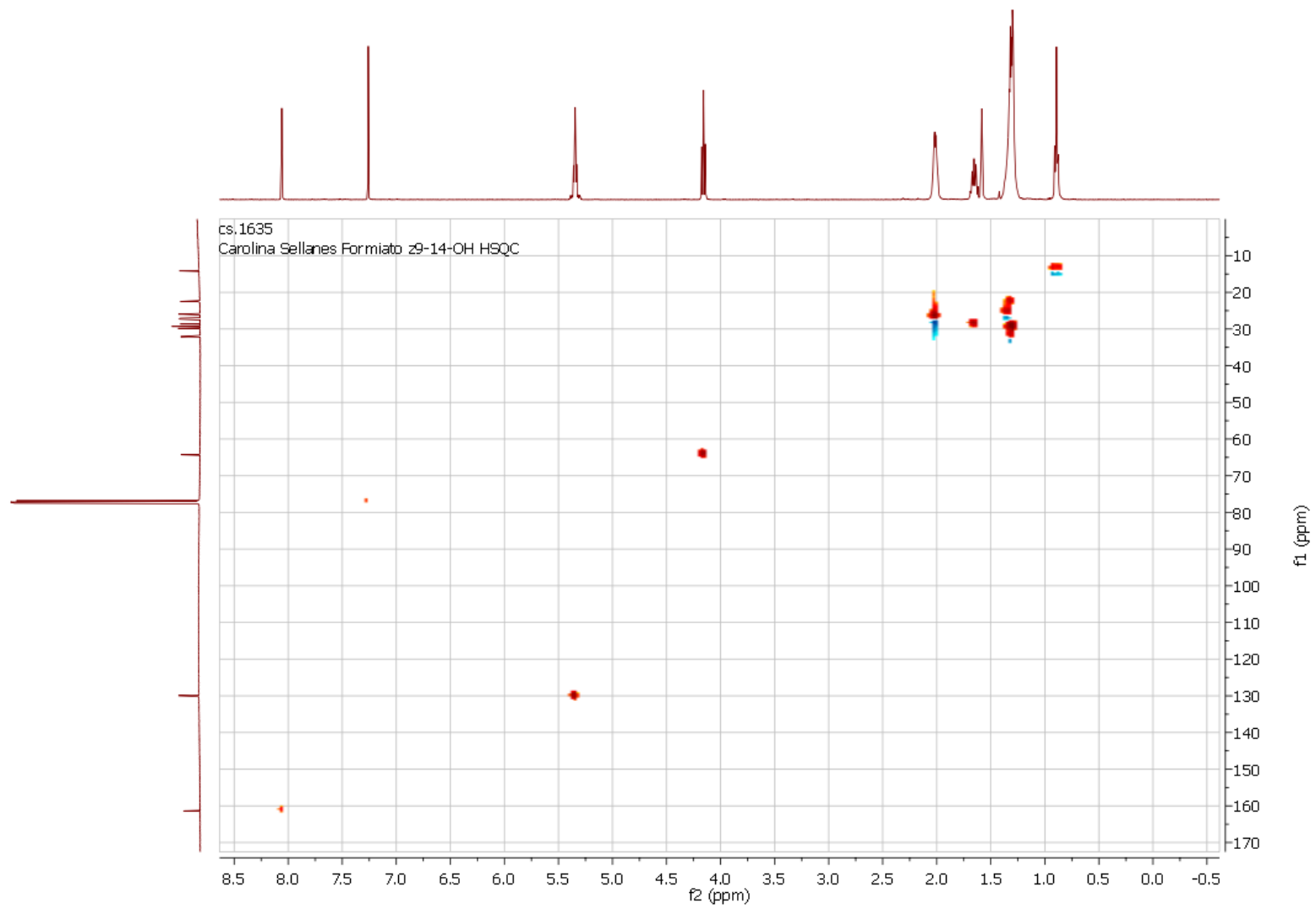
# RMN - <sup>13</sup>C



RMN – COSY



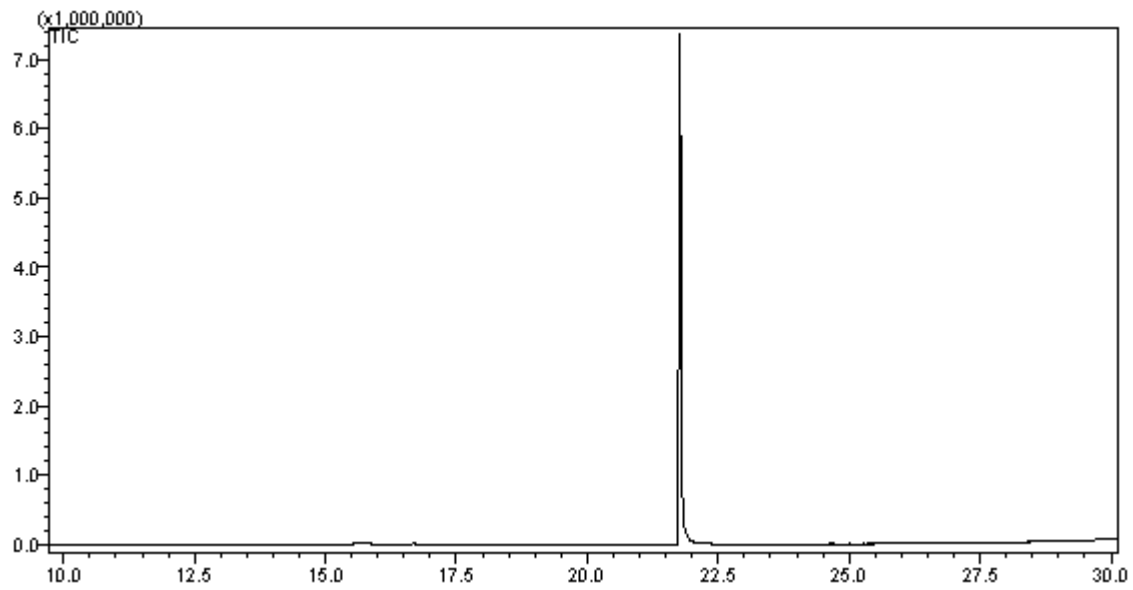
RMN – HSQC



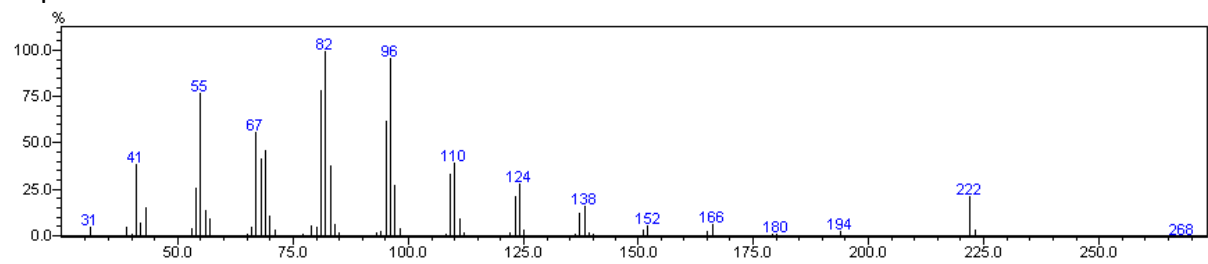


## formiato de (Z)-11-hexadecen-1-ilo

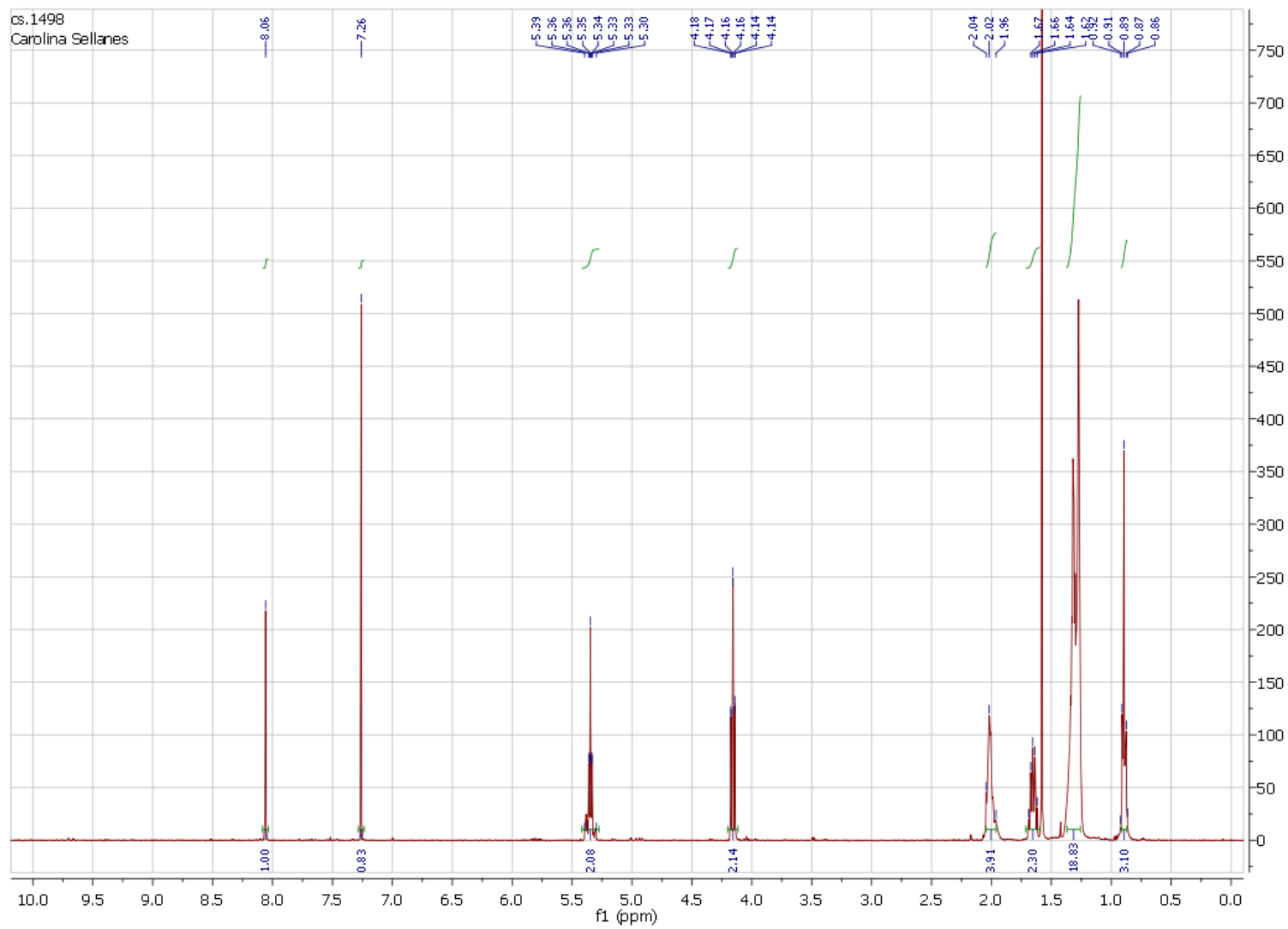
Cromatograma TIC



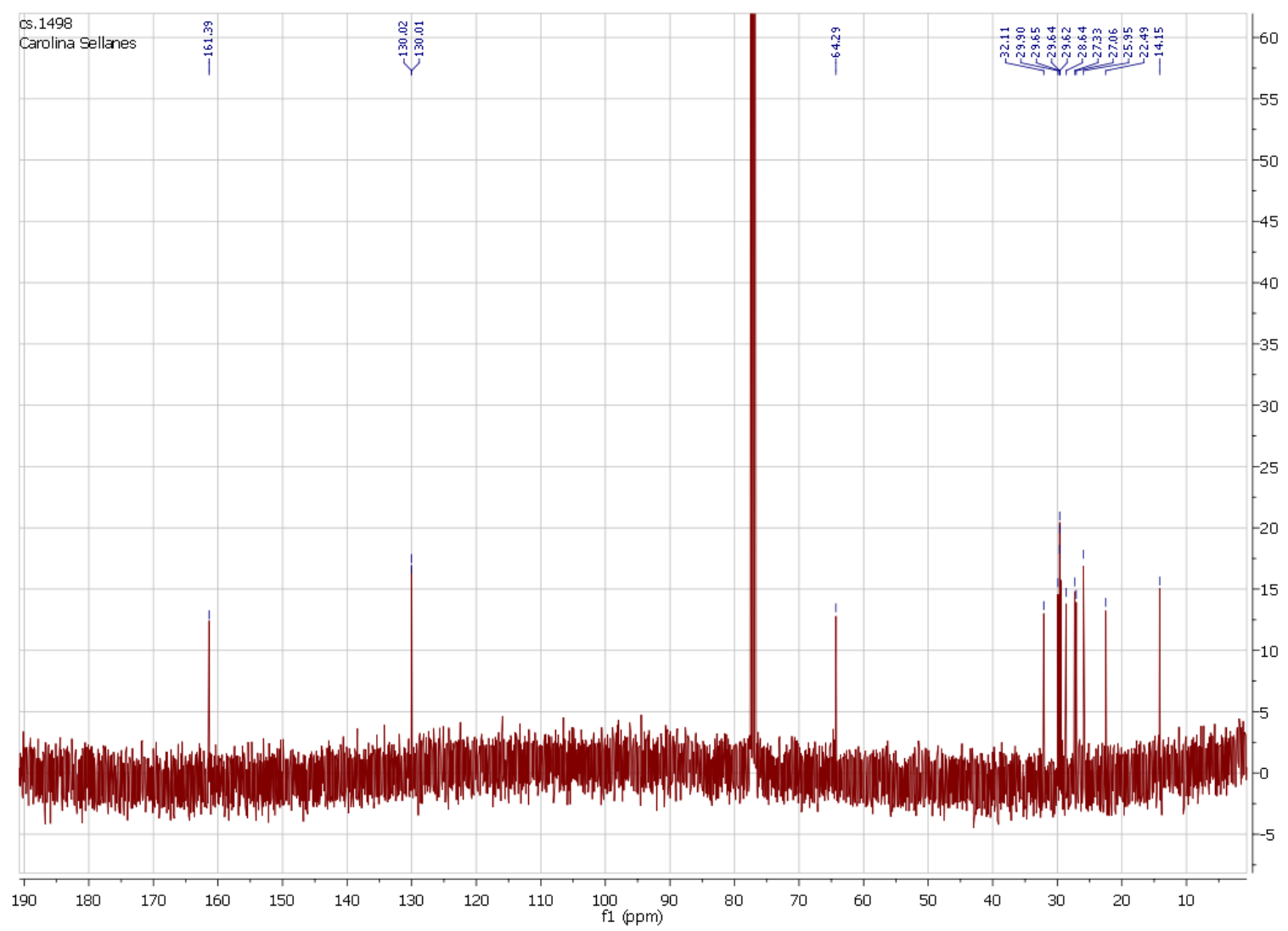
Espectro de masas



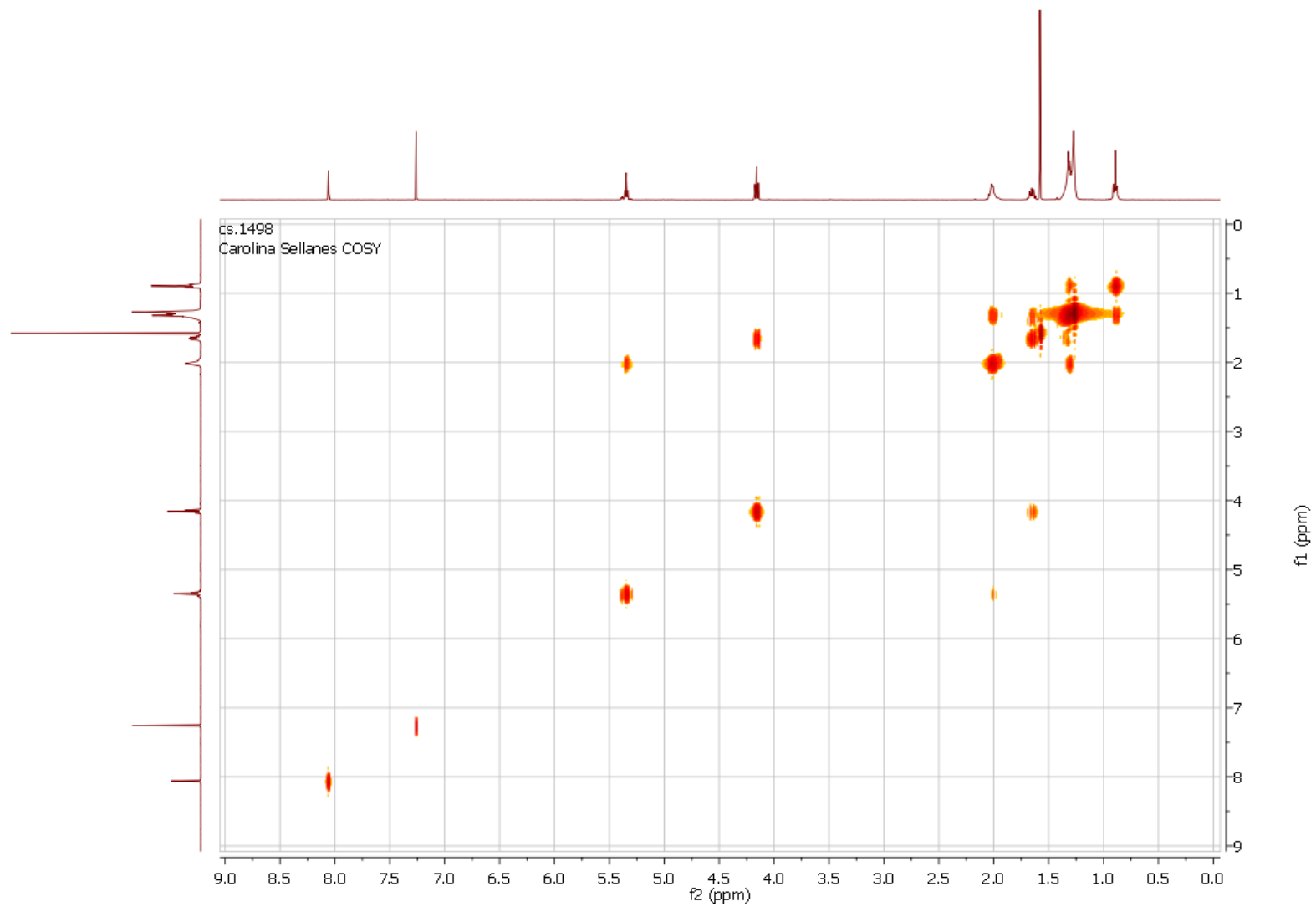
RMN - <sup>1</sup>H



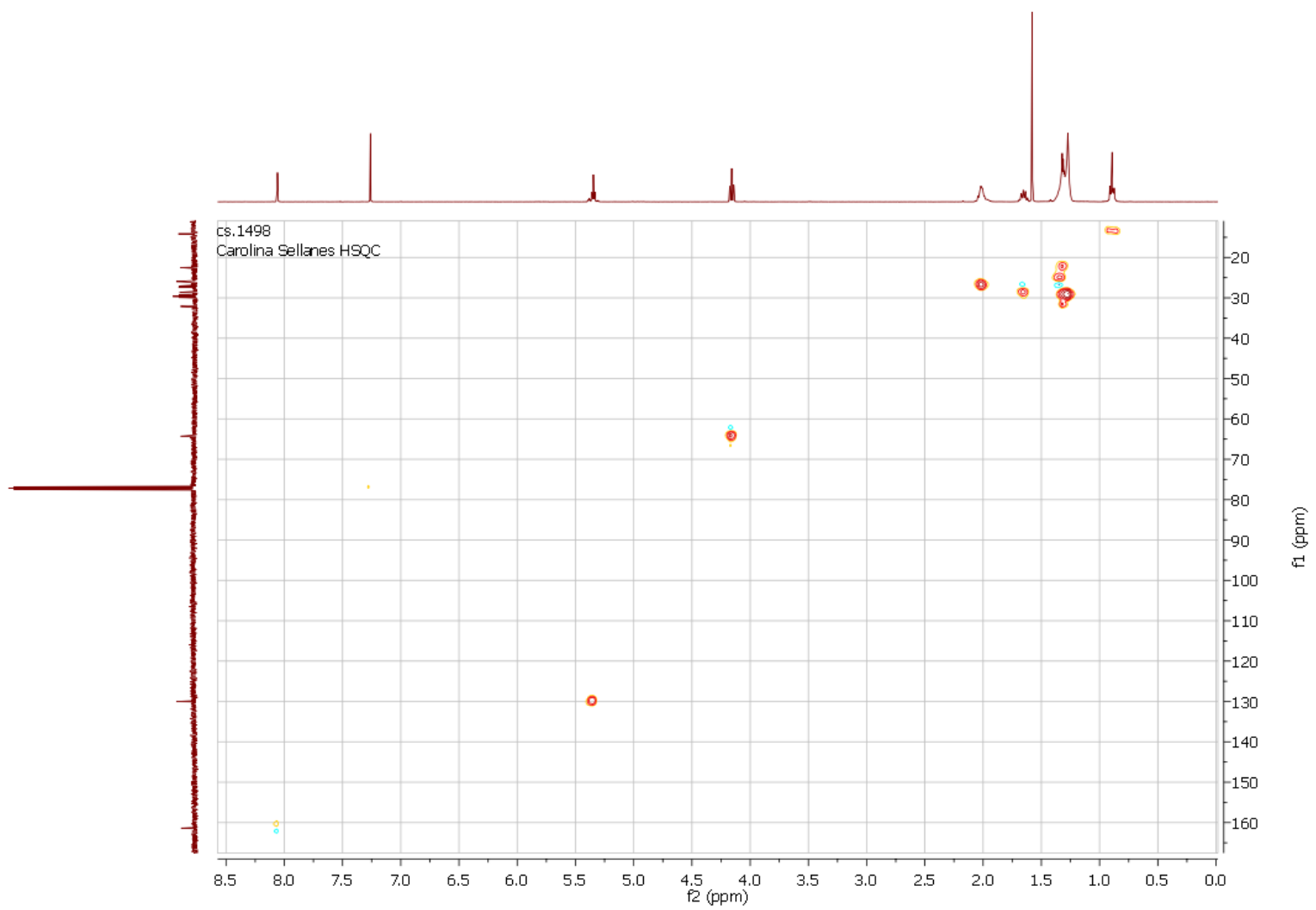
RMN - <sup>13</sup>C



RMN – COSY



RMN – HSQC



## CAPÍTULO 2

### OBJETIVO

Evaluar la actividad inhibitoria de los formiatos y la eficiencia de los mismos en el control de *Cryptoblabes gnidiella*, mediante experimentos a campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Evaluación de la actividad inhibitoria de los formiatos a campo

El experimento a campo se llevó a cabo en un viñedo comercial de la localidad de Juanicó (Canelones), desde mediados de enero hasta principios de marzo de 2010. Se ensayaron seis relaciones diferentes de feromona y formiatos: 1:0, 0:1, 5:1, 1:1, 1:5 y 1:10. Todos los septos (excepto el tratamiento 0:1) contenían 1 mg de feromona (10  $\mu$ L de una solución 100 mg/mL en hexano, relación de componentes 1:1), y cantidades variables de formiatos (solución 100 mg/mL en hexano; relación de componentes 1:1). Los septos se colgaron dentro de trampas delta construidas de plástico corrugado blanco (24×15 cm base × 13.5 cm altura), con un piso engomado en la base (pegamento entomológico, Biocontrol, Brasil) donde quedan pegados los insectos (fig. 18).

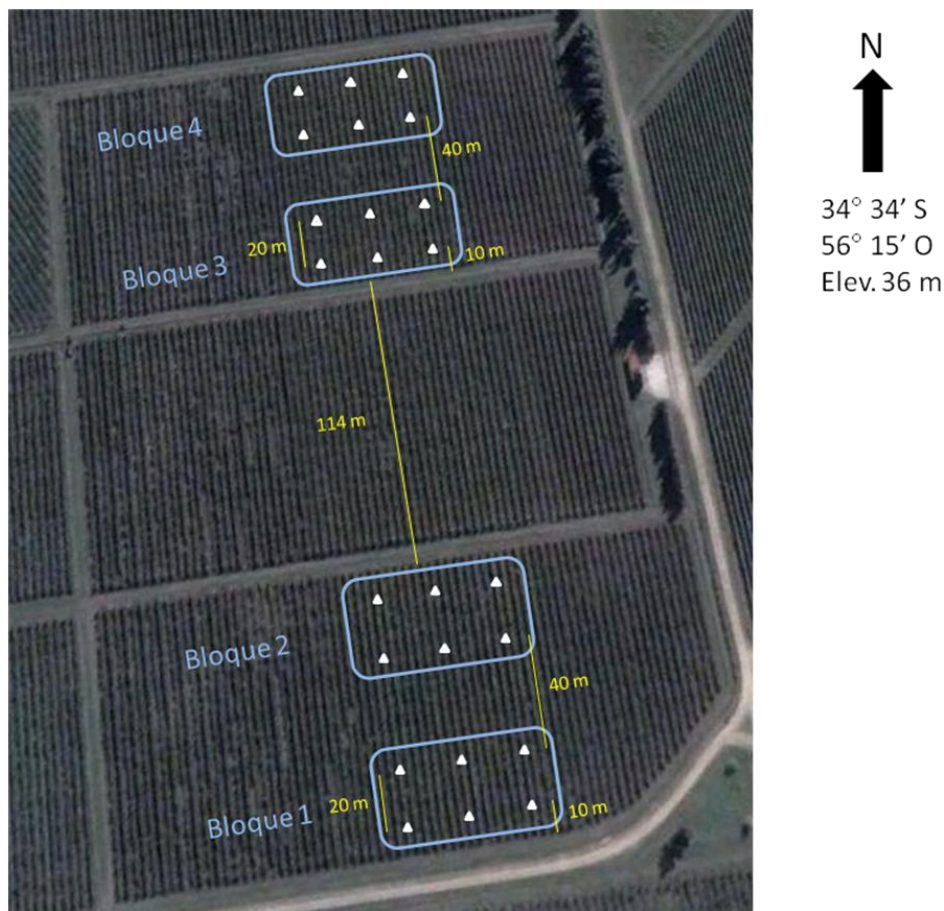


Figura 18. Trampa delta de plástico corrugado, con piso engomado; el septo cuelga de un alambre dentro de la trampa.

El experimento se realizó en un viñedo de la variedad Gewürztraminer, cuyas filas estaban separadas por 3 m, y consistió de cuatro bloques independientes separados por al

menos 40 m. En cada bloque se colocaron seis trampas separadas una distancia de 20 m con los diferentes tratamientos asignados al azar (fig. 19).

Una vez a la semana, durante seis semanas, se registraron las capturas de machos, se rotaron los tratamientos dentro de cada bloque, y se cambiaron los septos. Los pisos engomados de las trampas se cambiaron cada vez que fue necesario, de acuerdo al nivel de capturas de machos, ya que capturas altas dejan un importante residuo de escamas en el piso de la trampa, disminuyendo la adhesividad. Los datos (número de machos capturados) fueron transformados  $[V(x + 0.5)]$  y analizados por ANOVA factorial, con bloques y tiempo como factores. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se analizaron mediante el test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 19.** Diseño del experimento a campo, realizado desde mediados de enero hasta principios de marzo de 2010, en un viñedo comercial de la localidad de Juanicó, con el fin de evaluar la actividad inhibitoria de los formiatos. Cada bloque incluye los 6 tratamientos de mezclas feromona:formiatos evaluadas.



## 2- Evaluación de la eficiencia de los formiatos como método de control

El experimento se realizó en un viñedo comercial de la localidad de Juanicó, Canelones, desde mediados de enero hasta principios de abril de 2011. Se utilizaron dos cuadros de aproximadamente 0.7 hectáreas cada uno (25 filas de 100 m de largo, separadas 3 m) de la variedad Gewürztraminer. Los cuadros seleccionados fueron los utilizados en el experimento realizado el año anterior (cuadro 60 donde se encontraban los bloques 1 y 2, se utilizó para aplicar el tratamiento y cuadro 62 donde se encontraban los bloques 3 y 4 se utilizó como control) dado que se observó que los datos de capturas de machos no mostraron diferencias significativas entre cuadros (ANOVA factorial,  $F_{1,16} = 0.81$ ;  $P > 0.3$ ; fig. 20); lo que indica que *a priori* no es de esperar diferencias entre capturas de machos en ambos cuadros por factores distintos al tratamiento con formiatos.

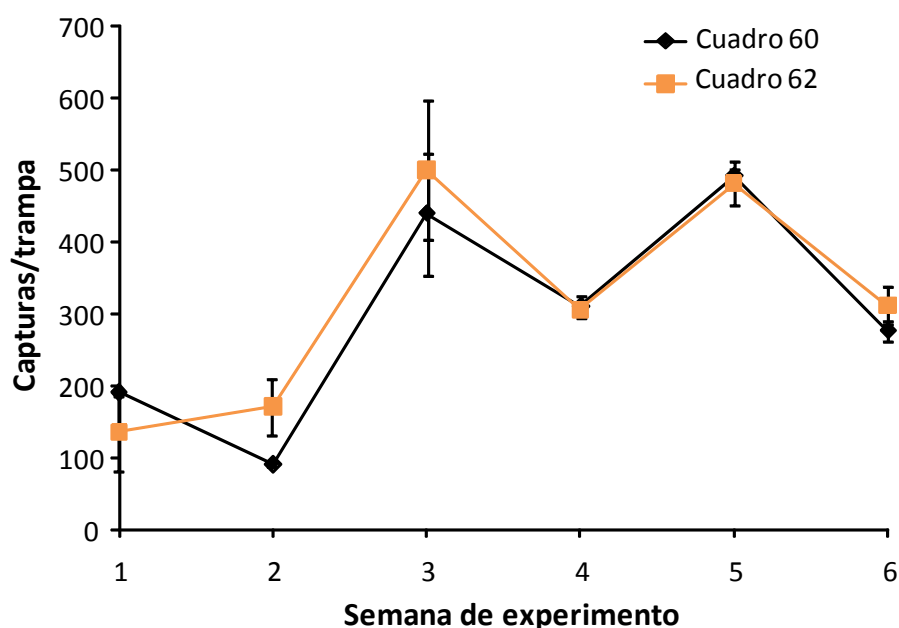


Figura 20. Capturas promedio de machos de *Cryptoblabes gnidiella* durante las 6 semanas del experimento realizado en el verano 2010.

## 2.1- Fecha de inicio del experimento

La fecha de comienzo del experimento se hizo coincidir con el inicio del vuelo de adultos de la primera generación de *C. gnidiella*. Para determinar el inicio de dicha generación, se colocaron cuatro trampas delta cebadas con feromona (dos en cada cuadro), registrando las capturas de machos cada 15 días desde mediados de noviembre. Asimismo, se calcularon los grados-días; datos ampliamente utilizados en la predicción de eventos en los ciclos biológicos de los insectos. Los grados-días representan la cantidad de calor acumulado durante 24 horas por encima del umbral inferior de desarrollo. El umbral inferior de desarrollo es la temperatura por debajo de la cual el desarrollo cesa y es característico para cada especie. Se calculan como la diferencia entre la temperatura media y el umbral inferior de desarrollo (12.26 °C en el caso de *C. gnidiella*) [1]. La temperatura media se obtuvo a partir de los registros meteorológicos de la Estación Experimental INIA Las Brujas (Ruta 48 km 10, Rincón del Colorado, a 12 km del Establecimiento Juanicó). Los grados-días necesarios para completar el desarrollo de huevo a adulto en *C. gnidiella* son de 570 GD aproximadamente [2]; con este dato y calculando los grados-días acumulados diariamente, es posible determinar cuándo están presentes en el campo los adultos. Es así que se calcularon los grados días acumulados a partir del 30 de noviembre, ya que según datos de años anteriores el vuelo de adultos de la generación invernante comienza aproximadamente a fines de ese mes (Ing Agr. Beatriz Scatoni, comunicación personal).

## 2.2- Diseño del experimento

Se colocaron 1000 dispensadores de goma conteniendo 10 mg de la mezcla 1:1 de formiatos en uno de los cuadros (cuadro tratamiento). Los dispensadores se colocaron en cada fila del sector del viñedo a tratar, debajo de la vegetación, separados por 2.5 m y aproximadamente a la altura de los racimos. Se cubrieron con un vaso de poliestireno expandido con el fin de protegerlos de factores climáticos como el sol y la lluvia (fig. 21). El cuadro restante, de igual tamaño y variedad de uva, se utilizó como control (sin tratamiento, con 114 m de distancia entre ambos cuadros, fig. 22).



Figura 21. Dispensadores de análogos de feromona utilizados en el experimento de campo para evaluar la eficiencia de los mismos como método de control de *Cryptoblabes gnidiella*. Izquierda: vista inferior donde se observa el septo de goma; centro: vista lateral del dispensador con su vaso protector colgado a la altura de los racimos de uva; derecha: arreglo de los dispensadores a 2.5 m de distancia en una fila de la variedad de vid Gewürztraminer.



Figura 22. Diseño del experimento a campo realizado en un viñedo comercial de la localidad de Juanico, Canelones, desde mediados de enero hasta principios de abril, con el fin de evaluar la eficiencia de análogos de feromona en el control de *Cryptoblabes gnidiella*.

### 2.3- Muestreo de la población de *C. gnidiella*

Con el fin de evaluar la población de machos y hembras de *C. gnidiella* durante el período del experimento, se colocaron en ambos cuadros cuatro trampas delta cebadas con feromona [(Z)-11-hexadecenal y (Z)-13-octadecenal, en relación 1:1, 1 mg], y cuatro trampas de alimentación [3] (fig. 22). Las trampas de alimentación constaron de un recipiente de plástico con 2 litros de alimento líquido a base de diamalta, una protección de cartonplast cuya función principal era evitar la entrada de agua proveniente de la lluvia, lo que ocasionaría derrame del alimento y pérdida de los insectos atrapados, y una armazón de alambre para sostener dicha protección y colgarla de la viña (fig. 23). El alimento se preparó disolviendo un kilo de diamalta en 2 L de agua hirviendo, posteriormente se agregaron 3 L de agua fría y un pan de levadura fresca (25 g), se dejó fermentar por aproximadamente una semana y se llevó a un volumen total de 20 L con agua fría. Una vez a la semana, durante 11 semanas, se contaron las capturas de machos de *C. gnidiella* en las trampas delta, se cambiaron los septos de feromona por septos recientemente preparados, y se sustituyeron los pisos engomados si era necesario, de acuerdo al nivel de captura de machos. A su vez, se colectaron de las trampas de alimentación los adultos de *C. gnidiella* que se mantenían en la superficie del alimento y todos los insectos que cayeron en las mismas. El alimento se cambió también semanalmente por alimento recientemente preparado. Los insectos colectados se llevaron al laboratorio y se colocaron en alcohol 70 % para su posterior identificación a nivel de familia.

El número de machos capturados en trampas de feromona fue transformado  $[\sqrt{(x + 0.5)}]$  para normalizar los datos y los mismos fueron analizados por ANOVA factorial, con tiempo y posición de la trampa como factores.



**Figura 23. Trampa de alimentación.**

#### **2.4- Evaluación de daño**

El experimento se desarrolló a lo largo de 11 semanas y se realizaron 2 evaluaciones de daño. La primera se realizó aproximadamente al mes de comenzado el experimento (25 de febrero) y la segunda al final del mismo (28 de marzo), previo a la cosecha de la uva. Las evaluaciones se realizaron colectando 100 racimos de uva de cada cuadro (control y tratamiento). En la primera evaluación se colectaron cuatro racimos por fila, separados 22.5 m entre si y respecto a los bordes del cuadro. En la segunda evaluación de daño se colectó el mismo número de racimos por fila, pero separados por 18 m entre sí y 10 m de los bordes. Los racimos colectados se revisaron exhaustivamente en el laboratorio bajo una lámpara, contando el número de larvas, prepupas y pupas de *C. gnidiella* (fig. 24).





**Figura 24. Evaluación de daño realizada para determinar si el tratamiento con análogos de feromona fue eficiente como método de control de *Cryptoblabes gnidiella* en vid. Izquierda: revisión exhaustiva de racimos bajo lámpara, evaluando la presencia de larvas, prepupas o pupas; derecha arriba: racimo infestado donde se observa una larva y excrementos de la misma; derecha abajo: racimo completamente desgranado.**

Para determinar el efecto del tratamiento sobre el daño ocasionado por esta plaga a la vid, se determinó el número total de insectos (larva, prepupas, pupas) en cada cuadro, el porcentaje de racimos dañados (con al menos una larva, prepupa o pupa) y el número de insectos en racimos dañados. En función del porcentaje de racimos dañados en ambos cuadros se calculó el porcentaje de reducción de daño según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de reducción} = \frac{\text{racimos infestados en el control} - \text{racimos infestados en el tratamiento}}{\text{racimos infestados en el control}} \times 100$$

El número total de insectos y el porcentaje de racimos infestados se comparó utilizando el test de chi-cuadrado, mientras que el número de insectos por racimo dañado se analizó mediante el test de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

### 1- Evaluación de la actividad de los formiatos a campo

El experimento se realizó durante un período de alto nivel de población de insectos, evidenciado por las capturas de machos en trampas de feromona (tratamiento 1:0, promedio de 314 machos/semana, fig. 25). Al agregar la mezcla de formiatos a los septos, se observó una disminución dependiente de la dosis en las capturas; cuanto mayor cantidad de mezcla de formiatos se agregó al septo, menor número de machos fueron capturados (fig. 25 y 26). El análisis factorial mostró un efecto no significativo entre bloques ( $F_{3,130}=0.75$ ;  $P>0.5$ ), pero mostró efectos significativos en el tiempo ( $F_{5,130}=18.15$ ;  $P<0.001$ ) y los tratamientos ( $F_{5,130}=217.68$ ;  $P<0.001$ ). Todas las mezclas feromona:formiatos capturaron significativamente menor número de machos comparado con los machos capturados en las trampas con feromona únicamente. Los septos que contenían mayor cantidad de formiatos que de feromona capturaron solo un insecto (mezcla 1:5), siendo la cantidad total de feromona para todos los tratamientos la misma (1 mg, fig. 25). La diferencia de capturas fue significativa ya en la primera semana, y ésta tendencia se mantuvo a lo largo de todo el período del experimento (Fig. 27).

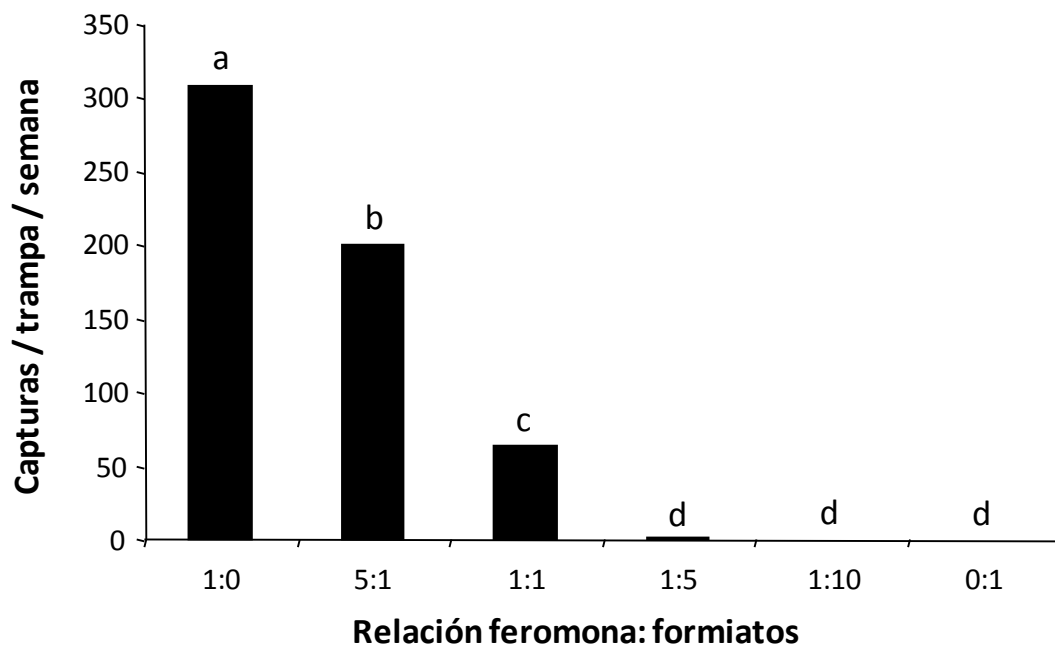


Figura 25. Promedio de capturas semanales (seis semanas) de machos de *Cryptoblates gnidiella* durante el experimento a campo en donde se compararon diferentes relaciones de feromona sintética y formiatos. Letras diferentes indican medias diferentes (test de Tukey;  $p < 0.05$ ).

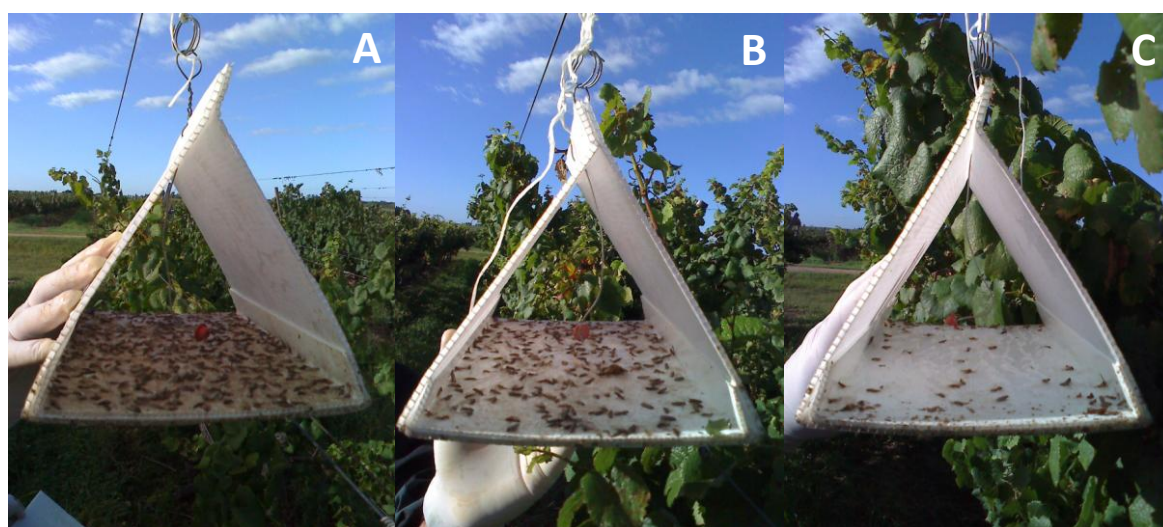


Figura 26. Capturas de machos de *Cryptoblates gnidiella* en trampas con diferentes tratamientos (relaciones de feromona y formiatos). A) feromona (tratamiento 1:0). B) tratamiento 5:1. C) tratamiento 1:1.



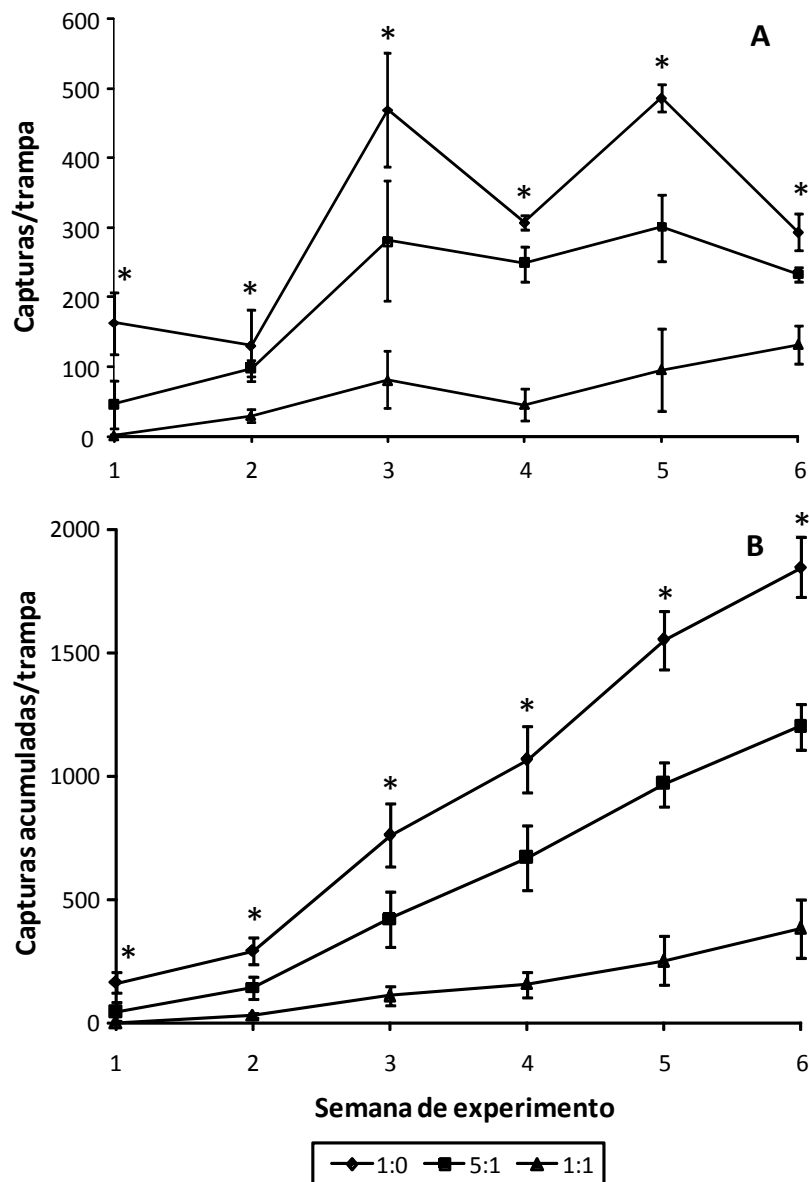


Figura 27. Capturas semanales (promedio de bloques) de machos de *Cryptoblabes gnidiella* durante el experimento a campo con diferentes relaciones de feromona sintética y formiatos. A) Capturas de machos a lo largo del tiempo. B) Capturas acumuladas de machos a lo largo del tiempo. Solo se muestran los tratamientos 1:0, 5:1 y 1:1 (semana 1= 27 de enero, 2010; las barras de error indican desviación estándar, \* indican diferencias entre tratamientos (test de Tukey;  $p < 0.05$ ).

## 2- Evaluación de la eficiencia de los formiatos como método de control

### 2.1- Fecha de inicio del experimento

Se registró un pequeño aumento de las capturas de machos de *C. gnidiella* en trampas de feromona la semana del 10 de enero (fig. 28), por lo que se decidió comenzar el experimento la semana siguiente (20 de enero), en la que a su vez se cumplían los 570 GD acumulados (fig. 29).

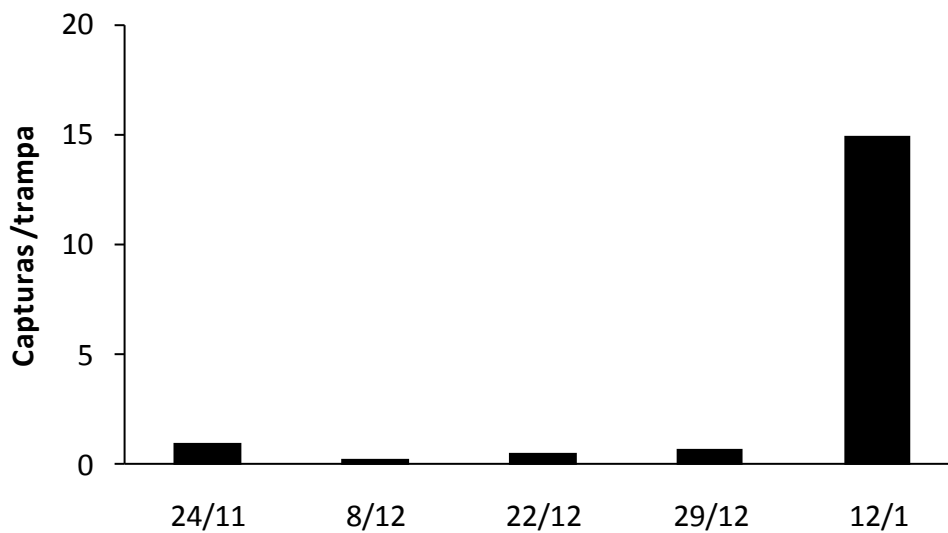


Figura 28. Muestreo de la población de machos de *Cryptoblabe gnidiella* con trampas de feromona, antes de comenzar el experimento.

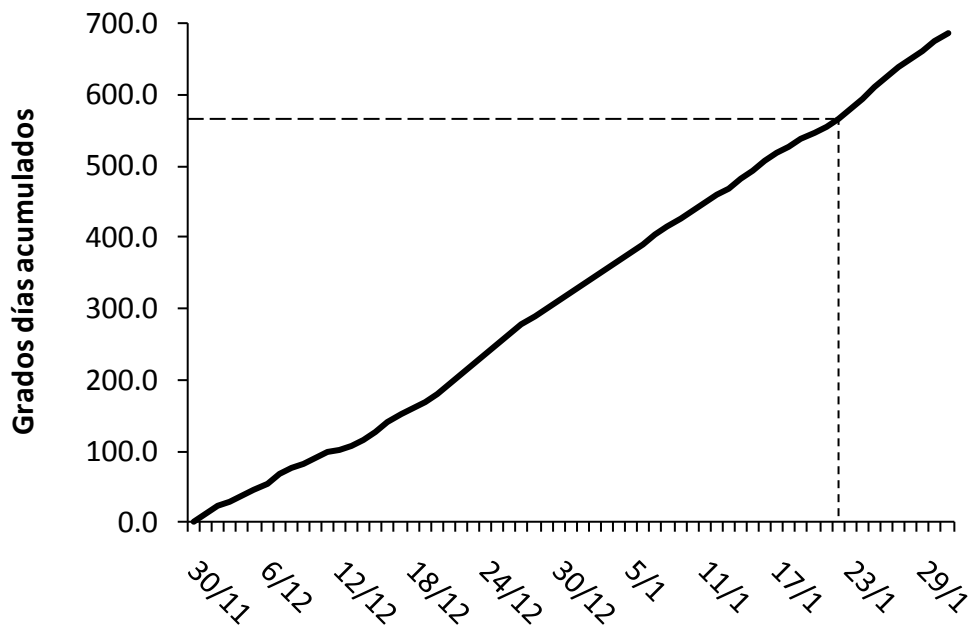
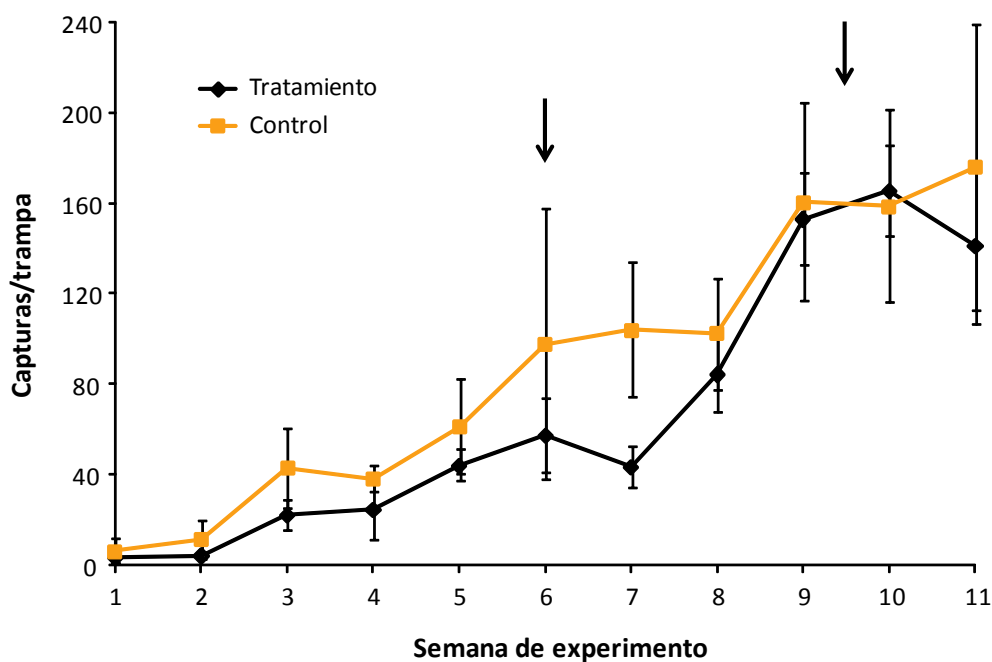


Figura 29. Grados días acumulados desde el 30 de noviembre de 2010. El día 22 de enero de 2011 se cumplieron los 570 GD.

## 2.2- Muestreo de la población de *C. gnidiella*

Las capturas de machos de *C. gnidiella* durante el período del experimento fueron en general bajas (promedio de 87 machos/semana) comparadas con las obtenidas el año anterior en la misma temporada (promedio de 314 machos/semana). El análisis factorial de los datos de capturas de machos de *C. gnidiella* en trampas de feromona mostró diferencias significativas entre tratamientos ( $F_{1,73} = 23.54$ ;  $P < 0.001$ ) y semanas ( $F_{10,73} = 79.69$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 30), lo cual es observable en particular en las primeras semanas del experimento.



**Figura 30.** Capturas promedio de machos de *Cryptoblabes gnidiella* en trampas de feromona durante las 11 semanas del experimento (28 de enero – 7 de abril) evaluando el efecto de los formiatos liberados desde 1000 septos, en un cuadro de 0.7 hectáreas (cuadro tratamiento). Las flechas indican los momentos en los que se realizaron las evaluaciones de daño.

Las capturas de hembras de *C. gnidiella* en las trampas de alimentación fueron muy bajas durante todo el experimento. Se capturó un promedio menor a una hembra por trampa hasta la última semana (cuando las capturas en trampas de feromona sobrepasaron los 150 machos), en la cual se capturaron en promedio aproximadamente 6 hembras por trampa en el cuadro con tratamiento y 4 hembras por trampa en el cuadro control. Los insectos colectados de las trampas de alimentación fueron identificados a nivel de familia con la ayuda de una clave. Se detectó la presencia de insectos de los órdenes Coleoptera, Himenoptera, Diptera y Lepidoptera. Se identificaron mayoritariamente insectos de las familias: Nitidulidae, Blattellidae, Cicadellidae, Cantharidae y Cerambicidae del orden Coleoptera; Formicidae, Apidae y Sphecidae del orden Himenoptera; Drosophilidae del orden Diptera. También fueron identificados en menor proporción insectos de las familias: Elateridae, Curculionidae, Chrysomelidae y Meloidae del orden Coleoptera; Pompilidae, Halictidae y Bethylidae del orden Himenoptera; Tachinidae, Cecidomyiidae y Sarcophagidae del orden Diptera y algunos insectos del orden Lepidoptera.

### 2.3- Evaluación de daño

En la primera evaluación de daño realizada no se observaron diferencias significativas en el número total de *C. gnidiella*, encontrándose 5 insectos en el cuadro tratamiento y 9 en el control (suma de diferentes estadios: larvas, pre-pupas, pupas y exuvias de pupas,  $P > 0.25$ ). El porcentaje de racimos infestados tampoco mostró diferencia significativa; se detectaron 5 racimos infestados en el cuadro tratamiento y 8 en el control (racimos con al menos una larva, prepupa o pupa de *C. gnidiella*,  $P > 0.25$ ). Sin embargo, en la segunda evaluación de daño, el número total de *C. gnidiella* en el cuadro control fue significativamente mayor que el total encontrado en el cuadro donde se aplicó el tratamiento ( $P < 0.001$ , fig. 31). Además, el porcentaje de racimos infestados mostró una diferencia significativa entre cuadros (tratamiento vs. control), según el test de Chi-cuadrado ( $P < 0.025$ , fig.32), siendo menor en el cuadro tratamiento. El porcentaje de reducción calculado fue de 42 %.

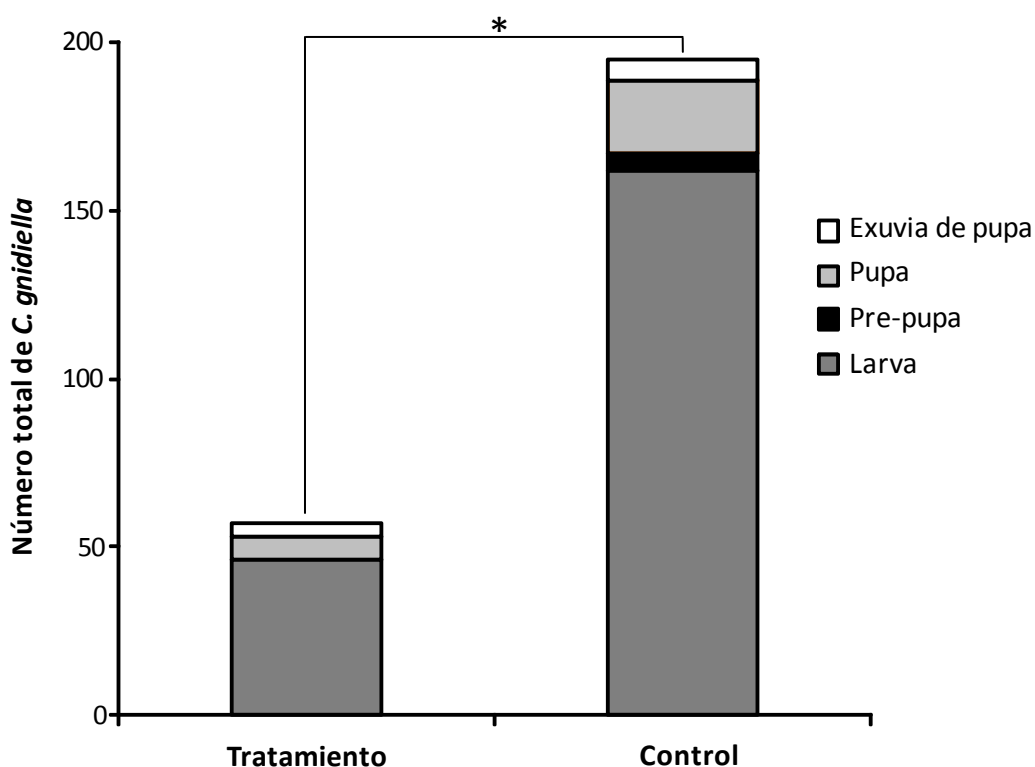


Figura 31. Número total de *Cryptoblabes gnidiella* (larvas, pre-pupas, pupas y exuvias de pupas) en 100 racimos, para ambos cuadros (control y tratamiento). \* indica tratamientos significativamente diferentes (test de  $\chi^2$ ,  $P < 0.001$ ).

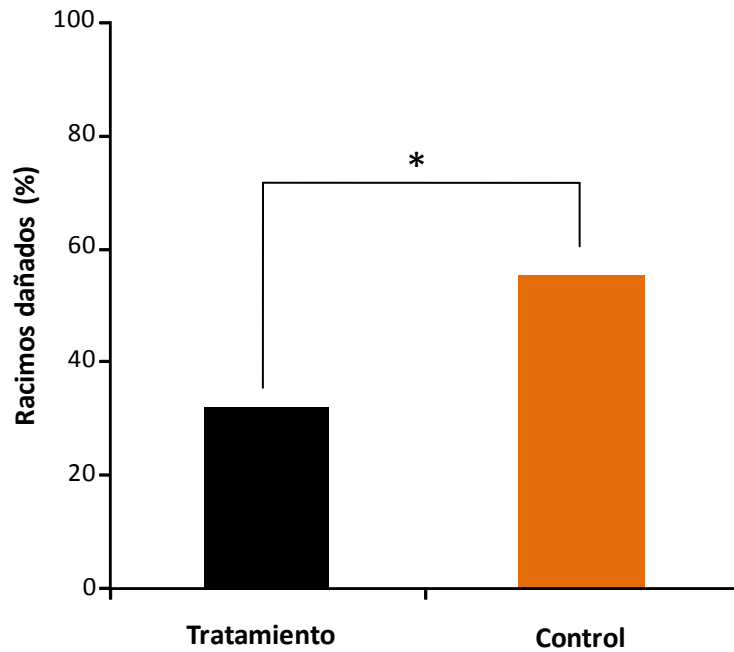


Figura 32. Porcentaje de racimos dañados por *Cryptoblabes gnidiella* en ambos cuadros (tratamiento y control). Evaluación de 100 racimos/cuadro, un racimo dañado contiene al menos 1 individuo de *C. gnidiella*, \* indica tratamientos significativamente diferentes (test de  $\chi^2$ ,  $P < 0.025$ ).

Al comparar el número de insectos por racimo dañado, éste también es significativamente mayor en el cuadro control que el cuadro tratamiento (test de Mann-Whitney,  $P < 0.03$ ), encontrándose un promedio de  $3.5 \pm 0.6$  y  $1.8 \pm 0.3$  insectos por racimo (media  $\pm$  error estándar), respectivamente (fig. 33).

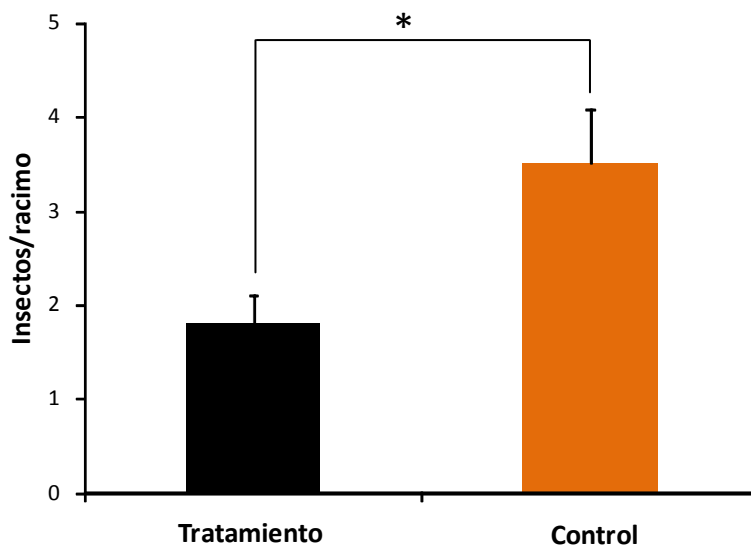


Figura 33. Número de insectos *Cryptoblabes gnidiella* por racimo infestado. Las barras de error indican error estándar de la media. \* indica tratamientos significativamente diferentes (test de Mann-Whitney,  $P < 0.03$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación de la actividad a campo de los formiatos en combinación con feromona son consistentes con los obtenidos en el estudio de comportamiento en túnel de viento; los formiatos actúan como antagonistas de la feromona, inhibiendo el comportamiento de atracción de los machos a la feromona sexual. Los resultados muestran que los formiatos poseen buena actividad inhibitoria; la relación feromona: análogo más baja ensayada (5:1; 1 mg de feromona y 0,2 mg de formiatos) disminuyó significativamente las capturas de machos, siendo ésta una dosis intermedia a las dosis necesarias reportadas para observar actividad antagonista de análogos de feromonas (entre 1: 0,001 y 1: 10) [4]. En nuestro caso deberían ensayarse relaciones más pequeñas para observar hasta qué dosis este efecto es significativo. El efecto antagonista ha sido reportado para varias trifluorometil cetonas, análogos de feromonas sexuales compuestas por alcoholes o acetatos [5, 6]. Sin embargo, por ejemplo en el caso de *Cydia pomonella*, el efecto antagonista fue evidente únicamente cuando se agregó mayor cantidad de análogo que de feromona; en un experimento a campo similar al que realizamos, las capturas de machos disminuyeron significativamente solo cuando se utilizó una mezcla feromona: antagonista 1:10. Además, nuestros resultados muestran que el efecto antagonista se observó a lo largo de toda la temporada, independientemente de la densidad de población de insectos; la cual llegó a ser muy elevada en las semanas 3 y 5, registrándose capturas promedio mayores a 450 insectos en las trampas de feromona.

Las paraferomonas tienen potencial en el manejo integrado de plagas, especialmente cuando la feromona natural es difícil de sintetizar o se descompone rápidamente bajo condiciones de campo. Antagonistas de feromonas han sido utilizados para controlar plagas en experimentos de confusión sexual [4], por ejemplo en *Amyelois transitella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), *Choristoneura rosaceana* Harris (Lepidoptera: Tortricidae), *Sesamia nonagriodes* (Lepidoptera: Noctuidae), entre otras [7] y en algunos casos han resultado ser disruptores de la comunicación más potentes que la feromona natural [5].

El experimento de permeación con los formiatos muestra que los mismos pueden ser nuevos agentes efectivos para el control de *C. gnidiella* en viñedos comerciales. Si bien este es el primer experimento realizado a escala de campo con estos análogos, los resultados obtenidos son promisorios; se obtuvo una reducción de daño de 42 % utilizando una dosis de 10 g/hectárea. Si bien la aplicación exitosa de la confusión sexual como estrategia de control requiere una mayor reducción de daño, existen varios parámetros que deben ser considerados y que pueden optimizarse a futuro. Podemos destacar que la cantidad de agente disruptor (por hectárea) utilizada en nuestro experimento es la mínima requerida según Witzgall et al. para lograr la interrupción de la comunicación [8]. La liberación de una mayor cantidad de formiatos posiblemente conlleve a un aumento en el porcentaje de reducción de daño. Un factor clave que podría influir en nuestros resultados es el tipo de dispensador utilizado (septo de goma). Se han utilizado varios tipos de dispensadores como por ejemplo fibras huecas, micro-cápsulas, tubos de polietileno y aerosoles; buscando que la tasa de liberación del dispensador sea constante y duradera a lo largo del tiempo, para cubrir completamente el período de vuelo del insecto. Más aún, se han diseñado pulverizadores de feromona con control del tiempo y dosis, los mismos liberan cantidades constantes de feromona solo cuando los insectos están activos. Otros parámetros a considerar son: el número de dispensadores para igual dosis, el lugar de colocación de dichos dispensadores y el área donde se aplica el tratamiento; ya que esta técnica de control es más efectiva cuando se tratan grandes áreas, reduciendo el impacto de hembras grávidas que inmigran desde áreas vecinas [8-10].

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes mecanismos involucrados en la confusión sexual: falsas pistas, camuflaje, desensibilización (adaptación y habituación) y desequilibrio sensorial [11]. El mecanismo de falsas pistas solo es posible considerarlo cuando los compuestos utilizados en la interrupción son atractivos, no siendo éste nuestro caso. En cuanto al camuflaje, es un mecanismo que puede ser importante cuando ésta técnica se lleva a cabo con la feromona sexual, ya que se basa en que el macho no logra detectar la pluma de feromona natural, debido a que el ambiente está cargado con los mismos compuestos emitidos por la hembra. La adaptación (disminución de la sensibilidad del sistema nervioso periférico a la feromona) tampoco es un mecanismo probable, dado



que como se observó en el experimento de pre-exposición y estudio por GC-EAD (resultados del capítulo 1 sección 3), la respuesta sensorial a la feromona no disminuyó por efecto de la exposición previa a formiatos; sumado a que la concentración utilizada en dicho experimento fue mucho mayor que la concentración que se espera en aire en condiciones de campo ( $1 \text{ ng/m}^3$  aproximadamente, según Witzgall et al [8]). Para determinar si la habituación (disminución de la sensibilidad del sistema nervioso central) es uno de los mecanismos responsables, podría evaluarse el efecto comportamental de la exposición previa a estos compuestos, esto es, la atracción de los machos a la feromona sexual en túnel de viento para machos previamente expuesto a la mezcla de formiatos. Finalmente, el mecanismo que podría estar involucrado en nuestro caso es el desequilibrio sensorial, donde la presencia de los formiatos en el aire modifica la relación de componentes percibida por los machos, por lo que éstos no responden adecuadamente. Esta posibilidad asume que los formiatos interactúan con los mismos receptores (a nivel de la membrana dendrítica) que los propios componentes de la feromona, pero que uno de los formiatos lo hace en forma más favorable, alterando la relación de impulsos nerviosos y por lo tanto alterando el proceso posterior de integración a nivel del lóbulo antenal. Sería interesante por lo tanto estudiar la respuesta a los componentes de la feromona y sus análogos respectivos mediante el registro a nivel de sensilia única, así como la respuesta comportamental de machos en túnel de viento evaluando diferentes proporciones de formiatos, ante la posibilidad que una proporción determinada, distinta de 1:1, pueda resultar atractiva para los machos.

Se observó claramente que las trampas de alimentación no son tan efectivas como las trampas de feromona en detectar la población del insecto en estudio. Si bien en experimentos anteriores se habían utilizado trampas de alimentación para monitorear *C. gnidiella* con buenos resultados [1, 3], nuestros estudios muestran que el uso de trampas de alimentación basadas en diamalita no es una técnica apropiada para el monitoreo de hembras de *C. gnidiella*; el número promedio de hembras capturadas fue muy bajo durante todo el experimento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bentancourt, C.M., and Scatoni, I.B. (2006). Lepidópteros de importancia económica en Uruguay: Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales, 2nd Edition (Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L - Facultad de Agronomía).
2. Ringenberg, R., Botton, M., Garcia, M.S., and Nondillo, A. (2005). Biología comparada e exigências térmicas de *Cryptoblabes gnidiella* em dieta artificial. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 40, 1059-1065.
3. Bentancourt, C., Scatoni, I., and Nuñez, S. (1988). Observaciones sobre la biología de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) en la zona sur de Uruguay. In *Boletín de Investigación* 13. pp. 12, Facultad de Agronomía: Montevideo.
4. Renou, M., and Guerrero, A. (2000). Insect parapheromones in olfaction reserch and semiochemical-based pest control strategies. *Annual Review of Entomology* 48, 605–630.
5. Giner, M., Sans, A., Riba, M., Bosch, D., Gago, R., Rayo, J., Rosell, G., and Guerrero, A. (2009). Development and biological activity of a new antagonist of the pheromone of the codling moth *Cydia pomonella*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8514 - 8519.
6. Solé, J., Sans, A., Riba, M., Rosell, G., Rosa, E., Muñoz, L., Bosch, M.P., and Guerrero, A. (2008). Differential activity of non-fluorinated and fluorinated analogues of the European corn borer pheromone. *Chemoecology* 18, 99-108.
7. Solé, J., Sans, A., Riba, M., Rosa, E., Bosch, M.P., Barrot, M., Palencia, J., Castella, J., and Guerrero, A. (2008). Reduction of damage by the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, and the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in maize fields by a trifluoromethyl ketone pheromone analog. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 126, 28-39.
8. Witzgall, P., Kirsch, P., and Cork, A. (2010). Sex pheromone and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology* 36, 80-100.
9. Reddy, G.V.P., and Guerrero, A. (2010). New pheromones and insect control strategies. *Vitamins and Hormones* 83, 493-519.
10. Rosell, G., Quero, C., Coll, J., and Guerrero, A. (2008). Biorational insecticides in pest management. *Journal of Pesticide Science* 33, 103-121.
11. Stelinski, L.L. (2007). On the physiological and behavioral mechanisms of pheromone-based mating disruption. *Pestycydy* 3-4, 27-32.

## CAPÍTULO 3

### OBJETIVO

Estudiar la presencia de kairomonas volátiles emitidas por las uvas y potencialmente utilizadas por las hembras de *Cryptoblabes gnidiella* para detectar el sitio preferido de oviposición.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Colecta de volátiles *in vivo* y preparación de muestra para análisis

Se realizaron las colectas de compuestos volátiles *in vivo*, en distintos estados fenológicos de la viña: floración, uvas verdes, uvas en envero (estadio en el que las uvas cambian de color) y uvas maduras, para dos variedades diferentes, Tannat y Gewürztraminer. Se utilizaron bombas succionadoras de aire (Casella Cel, Apex Standard, Reino Unido) conectadas mediante una división en “Y”, a dos pipetas Pasteur conteniendo 100 mg de adsorbente HayeSep Q (Hayes Separations, Inc.; divinilbenceno; mesh 80-100). A su vez, estas pipetas se conectaron cada una a una bolsa (Embalebem; bolsa para horno, 27 cm x 41 cm); una de ellas se utilizó para envolver el material vegetal a muestrear y la otra se utilizó vacía como blanco (fig. 34). El sistema completo se cubrió con plástico corrugado de modo de protegerlo de factores climáticos (lluvia y sol).



Figura 34. Sistema de colecta de volátiles *in vivo*

Las bombas fueron programadas para coleccionar durante 20 horas, utilizando un flujo total de aire de 1.6 L/min. Al finalizar la obtención de volátiles se cortó el material vegetal muestreado para obtener su peso fresco, de modo de expresar la cantidad de volátiles en función del peso del mismo (ng equivalentes de tridecano/ gramo de material vegetal). Las pipetas Pasteur se transportaron envueltas en papel de aluminio al laboratorio para su posterior elución. Los compuestos volátiles se desorbieron del HayeSep Q utilizando 2 mL de hexano destilado. Las columnas se limpiaron posteriormente con 15 mL de tres solventes de diferente polaridad; metanol, diclorometano y hexano (en ese orden) para su reutilización.

Las colectas se realizaron siempre por duplicado y durante dos temporadas consecutivas, verano 2009/2010 y verano 2010/2011. Para eluir los volátiles, en la primera temporada se agregaron 100 µL de una solución 0.05 mg/mL de tridecano en hexano como estándar interno, y se concentró el eluido mediante flujo de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 100 µL. En la segunda temporada se tomaron 500 µL de los 2 mL de extracto de volátiles, y se agregaron 25 µL de una solución 0.05 mg/ml de tridecano en hexano (50 µL en los extractos de flores), llevando a un volumen final de 25 µL bajo flujo de nitrógeno. El resto del eluido se conservó para eventuales bioensayos de preferencia de oviposición, los que no forman parte de esta tesis.

## **2- Análisis de compuestos volátiles de uva mediante GC-MS**

Con el fin de identificar y cuantificar los volátiles emitido por las uvas, las muestras se analizaron mediante GC-MS. Para las muestras de la primera temporada se utilizaron las condiciones descritas anteriormente (ver sección 3.1.2), salvo el programa de temperatura [40 °C (1 min) – 6 °C/min – 210 °C (1 min) – 15 °C/min – 300 °C (1 min)] y la inyección que se realizó en modo split para extractos de volátiles de flores y modo splitless para el resto de las muestras (1 µL). Para los extractos de volátiles florales, se utilizó una relación de split de 20:1 para la variedad Gewürztraminer y de 30:1 para Tannat. Para las muestras de la segunda temporada se utilizó una columna AT-5-MS (30 m x 0.25 mm, 0.10 µm) y método

de inyección splitless (1 µL), con excepción de las flores de Tannat (relación de split 1:10), siendo el resto de las condiciones idénticas a las anteriores.

En todos los casos, se inyectó una solución de hidrocarburos con el fin de calcular los índices de retención de cada compuesto tentativamente identificado. El cálculo de los índices de retención se realizó con la fórmula para temperaturas programadas [1] :

$$I_x = 100.N + 100.n. \left( \frac{t_{R\ x} - t_{R\ (N)}}{t_{R\ (N+n)} - t_{R\ (N)}} \right)$$

Donde:

$I_x$ : índice de retención para el compuesto "x"

N: número de átomos de carbono del n-alcano menor

n: diferencia en número de átomos de carbono de los n-alcanos entre los que se encuentra el compuesto

$t_{R\ x}$ ,  $t_{R\ (N)}$ ,  $t_{R\ (N+n)}$ : tiempos de retención del compuesto "x", y los n-alcanos entre los que se encuentra este compuesto.

Los compuestos volátiles fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con bases de datos de espectros de masas (NIST08 y ADAMS [1]), considerando índices de similitud mayor a 85%, y mediante la comparación de índices de retención con los correspondientes obtenidos de bibliografía. Fueron considerados solo aquellos compuestos cuya cantidad promedio superaba los 0,25 µg equivalentes de tridecano, es decir, cuya relación de área con el estándar fue superior a 5 % (ó 2.5 % en el caso de flores de Tannat de la segunda temporada). Este criterio se definió en base a la dificultad de obtener espectros de masas de buena calidad para los componentes de menor área. Asimismo, aquellos compuestos que se encontraban en el blanco en cantidad mayor al 50 % de la cantidad en el material vegetal (según área del pico), no fueron considerados como volátiles emitidos por el material vegetal muestreado; los que se encontraban en relación menor a 50 % sí fueron considerados por entenderse que la emisión de estos compuestos por las uvas puede derivar en la aparición de los mismos en el blanco, ya que en éste se muestrea el

aire circundante. Estos compuestos fueron señalados con color gris en las tablas de resultados (ANEXO del capítulo).

### **3- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de hembras de *C. gnidiella*.**

Se estudió la respuesta de la antena (N= 5) de hembras vírgenes de *C. gnidiella* (1-4 días de edad) a los extractos volátiles (de la primera temporada) de ambas variedades, en los diferentes estados fenológicos, mediante GC-EAD (ver sección 3.1.3).

Las condiciones utilizadas en el cromatógrafo de gases fueron las descritas anteriormente (ver sección 3.1.3), excepto que el programa de temperatura del horno utilizado fue de 40 °C (1 min) hasta 240 °C a 10 °C/min y la inyección (1 µL) se realizó en modo splitless, con excepción de los extractos de flores los que fueron inyectados utilizando el modo split.

## RESULTADOS

### 1- Análisis de compuestos volátiles de uva mediante GC-MS

Los resultados del análisis por GC-MS de volátiles emitidos *en vivo* por la planta de vid permiten observar que existen diferencias cuali y cuantitativas, tanto al comparar las dos variedades como al comparar entre los diferentes estados fenológicos (para ambas temporadas).

En el anexo del presente capítulo se presentan los compuestos volátiles identificados para cada variedad de uva, los porcentajes de similitud de los espectros de masas con los correspondientes de la base de datos, los índices de retención calculados y de bibliografía, y cantidades absolutas obtenidas de las uvas en colectas de volátiles de 20 hs., a lo largo de dos temporadas.

Si bien las flores de ambas variedades emiten principalmente sesquiterpenos, siendo en su mayoría compuestos no oxigenados, la variedad Gewürztraminer emite también cetonas en gran proporción (fig. 35). Se observa que las flores de Tannat emiten mayor cantidad total de volátiles que las de Gewürztraminer, respondiendo esta diferencia a la gran cantidad de sesquiterpenos emitidos por Tannat, particularmente *E*-cariofileno, *E,E*- $\alpha$ -farneseno y *E*- $\beta$ -farneseno. Una clara diferencia entre ambas variedades es que las flores de Tannat emiten éteres, siendo el mayoritario el 1,2-dimetoxi-benceno conocido como veratrol.



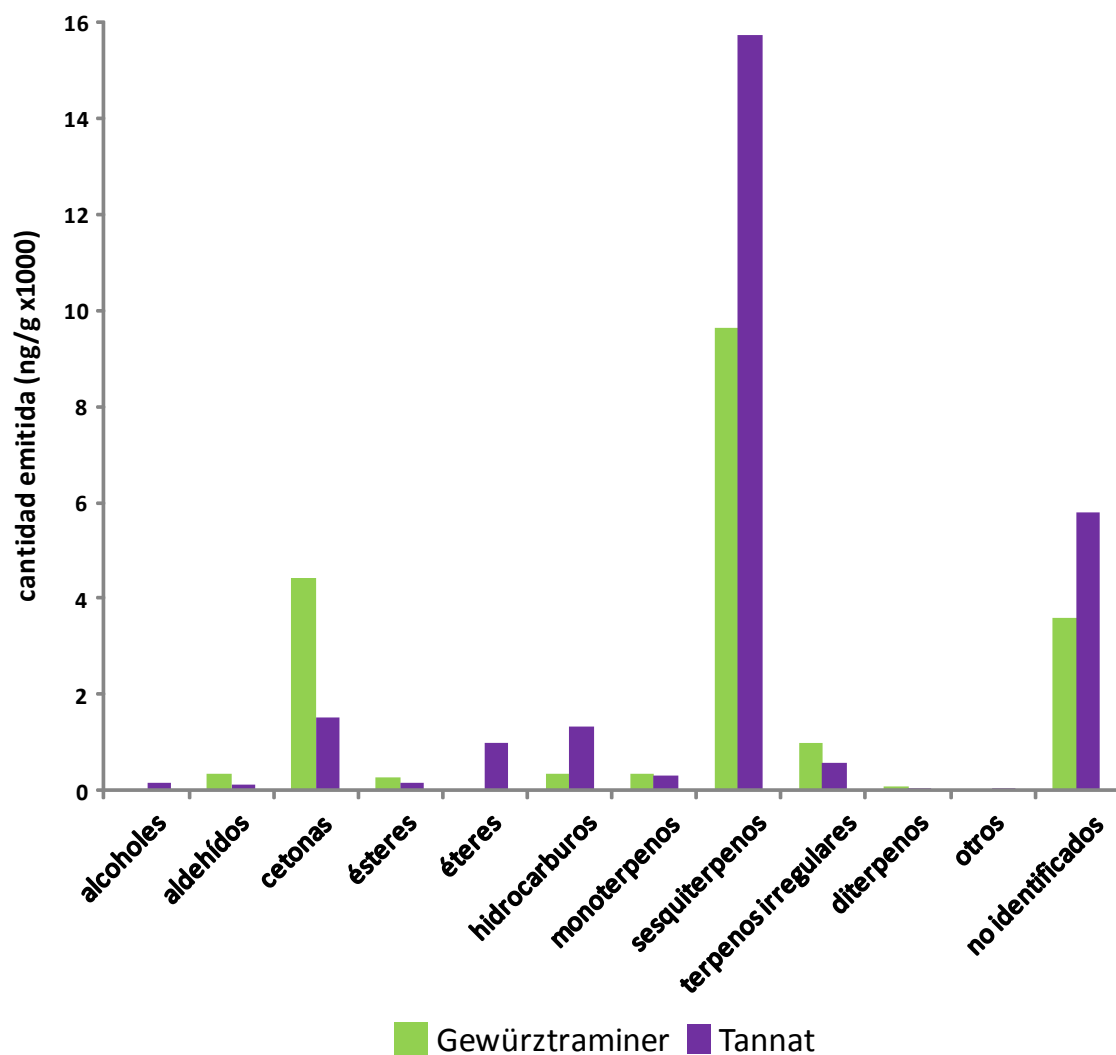


Figura 35. Volátiles emitidos por flores según grupos funcionales, expresados como ng equivalentes de tridecano por gramo de material vegetal muestreado, colectados durante 20 horas en la temporada 2009/2010.

Al comparar cómo varía la emisión de volátiles totales entre ambas variedades se observa una disminución una vez que culmina la floración, y hasta el envero de las uvas; con excepción de Gewürztraminer en la primera temporada que prácticamente mantiene la emisión constante (fig. 36). Esta disminución se observa en diciembre, cuando las uvas están verdes, hasta mediados de enero cuando ocurre el envero.

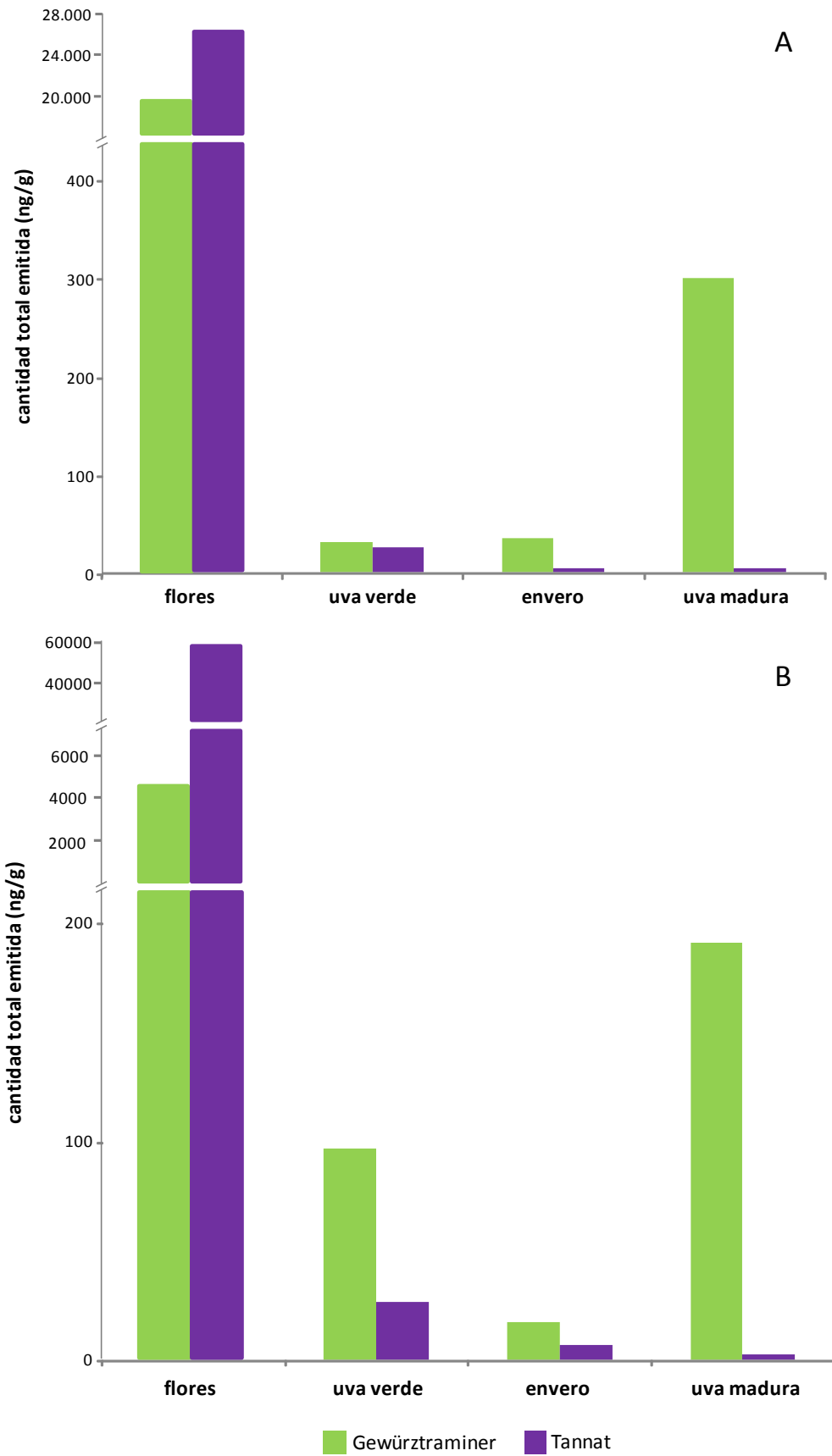


Figura 36. Variación en la emisión de volátiles de dos variedades de uva, Gewürztraminer y Tannat, a lo largo de la temporada. A) 2009-2010 primera temporada. B) 2010-2011 segunda temporada.

Las uvas verdes de Gewürztraminer emiten mayoritariamente aldehídos y monoterpenos, mientras que las uvas verdes de Tannat emiten en mayor proporción sesquiterpenos y algunos compuestos que no pudieron ser identificados. Luego del envero se observa un claro aumento de la cantidad de volátiles emitidos por Gewürztraminer no siendo así en Tannat; variedad en la que la emisión de volátiles sigue disminuyendo (fig. 36). Este aumento de volátiles en Gewürztraminer se debe al aumento en la emisión de 6 compuestos que corresponden a un compuesto no identificado y 5 terpenos: un monoterpeno oxigenado, geranato de metilo; tres sesquiterpenos no oxigenados, *E,E*- $\alpha$ -farneseno, *E*- $\beta$ -farneseno y  $\alpha$ -zingibereno y un terpeno irregular, 6-metil-5-hepten-2-ona. Éstos representan más del 70% de los volátiles emitidos por Gewürztraminer al final de la temporada (fig. 37).

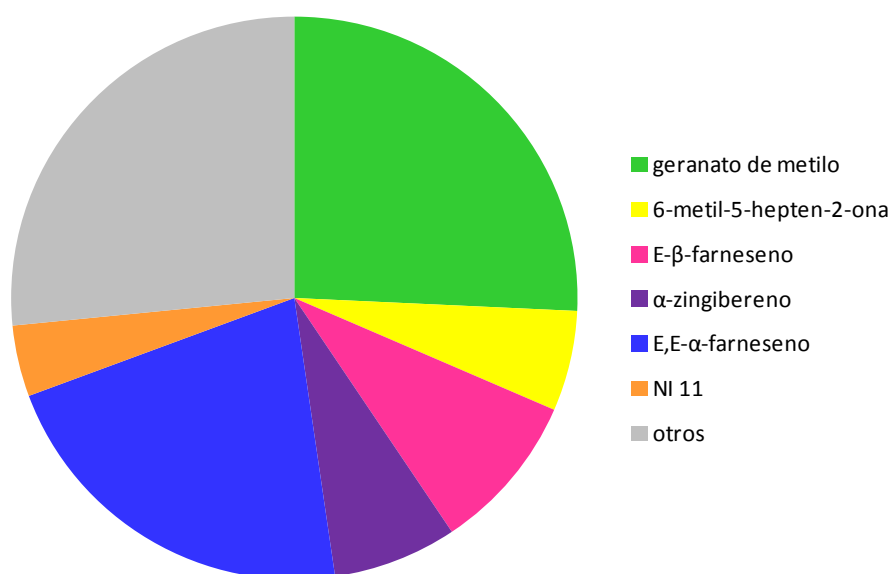


Figura 37. Representación gráfica de los volátiles emitidos por Gewürztraminer al final de la temporada (uva madura).

## 2- Estudio de la respuesta electrofisiológica de antenas de hembras de *C. gnidiella*.

En ningún caso se observó una respuesta clara (superior al ruido) y reproducible de las antenas de las hembras de *C. gnidiella* a los compuestos volátiles emitidos por flores, uvas verdes, uvas en envero y uvas maduras, de las variedades Gewürztraminer y Tannat, bajo las condiciones utilizadas.

## DISCUSIÓN

En varios tipos de frutas se han observado diferencias cuali y cuantitativas en sus compuestos volátiles, dependiendo de su estado de maduración [2]. En la mayoría de las frutas la variación de los compuestos volátiles desde el cuajado (transformación de flor en fruto) hasta el final de la maduración se caracteriza por una acumulación de ésteres y terpenos. Sin embargo, en el caso de las uvas, si bien no se ha estudiado ampliamente la evolución de volátiles, en Cabernet Sauvignon se detectó que tanto los ésteres como los terpenos se encuentran en el desarrollo temprano; caracterizándose la madurez por alcoholes y derivados de benceno [3]. En nuestro caso se observan mayoritariamente sesquiterpenos en el desarrollo temprano (uvas verdes) de la variedad Tannat, mientras que en la madurez las uvas de Tannat emiten muy baja cantidad de volátiles, pudiéndose detectar en mayor proporción aldehídos. En cambio las uvas verdes de Gewürztraminer emiten mayoritariamente aldehídos y monoterpenos, mientras que la madurez se caracteriza por compuestos mono y sesquiterpénicos.

Los volátiles de uvas se han estudiado en muchos casos como parámetro para medir la maduración de las uvas, y así determinar el momento apropiado para la cosecha [2-4]. Es ampliamente conocido el hecho de que uvas de diferentes variedades muestran diferente composición aromática [5, 6]. En variedades aromáticas como la Muscat, la concentración de terpenos emitidos es mayor en comparación con variedades neutras [6]. Gewürztraminer es una variedad rica en cuanto a aromaticidad [7], y como se observa en nuestro estudio, las uvas maduras emiten una mayor concentración de terpenos.

La búsqueda de kairomonas de oviposición se ha llevado a cabo en varias especies de lepidópteros, como *Cydia pomonella*, *Cydia molesta* y *Lobesia botrana* [8-10]. En ésta última, se ha trabajado arduamente en la búsqueda de volátiles de uva potencialmente utilizados por las hembras de *L. botrana*, un tortricido plaga importante de viñedos europeos, para detectar el sitio de oviposición. Es así que se han encontrado varios compuestos volátiles electrofisiológicamente activos frente a antenas de hembras de *L. botrana*; 27 compuestos de la variedad Chardonnay [11], y 10 compuestos de la variedad

Casana [12]. Se ha estudiado el comportamiento de las hembras frente a estos volátiles en túnel de viento, y se observó que una mezcla de estos diez compuestos (de la variedad Casana) resultó ser tan atrayente como las propias uvas verdes [12]. Sin embargo, posteriormente se detectó la presencia de compuestos redundantes, determinándose que una mezcla de tres compuestos:  $\beta$ -cariofileno, *E*- $\beta$ -farneseno y *E*-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, fue tan atractiva como la combinación de los 10 compuestos volátiles [13].

En nuestro caso, no obtuvimos respuestas electrofisiológicas a los volátiles de ninguna de las dos variedades estudiadas, en ningún estado fenológico. En Uruguay existe un período de vuelo de adultos a mediados de diciembre, correspondiente a la generación invernante. Estas hembras ovipondrían en las uvas verdes, sin embargo, no se tiene evidencia de que la puesta de huevos por parte de estas hembras genere una diferencia significativa en el número de larvas de primera generación entre ambas variedades, por lo que los volátiles de uvas verdes podrían no jugar un rol importante como kairomonas de oviposición. Como se mencionó anteriormente, en estudios previos se ha encontrado una diferencia clara y reproducible en la abundancia de larvas al comparar las dos variedades, Gewürztraminer y Tannat (Ing. Agr. Beatriz Scatoni, comunicación personal). Sin embargo, estas larvas provienen de huevos que han sido puestos por hembras de la primera generación, a partir del período de envero. Por lo tanto, si existieran kairomonas (o volátiles repelentes) que pudieran explicar esta diferencia, esperamos que estén presentes en las uvas en envero y maduras. Generalmente, en los insectos polífagos la localización de la planta hospedera se basa en compuestos comúnmente presentes en las plantas (ubicuos). Al comparar ambas variedades en ambos estados fenológicos (envero y madura), se observa que existen diferencias tanto cuantitativas como cualitativas de compuestos ubicuos. Las diferencias cuantitativas en algunos compuestos podrían explicar la diferencia en la preferencia, por ejemplo, si la relación correcta de volátiles para hembras *C. gnidiella* se encontrara en Gewürztraminer. Pero también esta preferencia podría deberse a la presencia de volátiles emitidos únicamente por Gewürztraminer, como geranato de metilo, *E*- $\beta$ -farneseno, *E,E*- $\alpha$ -farneseno,  $\alpha$ -zingibereno, los que podrían actuar como kairomonas atrayentes. Asimismo, en las uvas maduras de la variedad Tannat se determinó la presencia de salicilato de metilo (en la temporada 2010/2011), compuesto no emitido por uvas de la

variedad Gewürztraminer, y que podría estar actuando como repelente, como ocurre con los llamados volátiles de no-hospederos [14].

Como se mencionó anteriormente, las hembras grávidas siguen una secuencia de eventos comportamentales en el momento de la oviposición. Estos eventos involucran la búsqueda, orientación y encuentro, como primera etapa, seguidos de aterrizaje, evaluación de contacto y aceptación o rechazo [15]. Es posible que las hembras utilicen perfiles de compuestos volátiles para hallar su sitio de oviposición, pero que esta diferencia en la preferencia de variedades se defina a nivel de la etapa de evaluación por contacto, y se deba a compuestos fijos diferenciales, los que no fueron incluidos en este estudio. La posibilidad de que uvas de la variedad Gewürztraminer presenten compuestos superficiales estimulantes de la oviposición tendría un paralelo en el caso de *L. botrana*, en la cual se observó que la oviposición es estimulada por compuestos polares presentes en la superficie de las uvas [16], determinándose posteriormente que los compuestos responsables eran azúcares, específicamente fructosa, sacarosa y glucosa [17]. También es posible que las hembras de *C. gnidiella* utilicen otras claves para seleccionar su sitio de oviposición, aunque antes de descartar esta hipótesis deberían repetirse estos estudios utilizando un instrumento de EAD más sensible, ya que se conoce que la respuesta de las antenas de hembras a volátiles asociados a su planta hospedera es más débil que la respuesta de antenas de machos a componentes de la feromona sexual. Asimismo, sería importante realizar estudios de comportamiento en túnel de viento para comprobar una eventual atracción diferencial, y mediada por volátiles, de hembras de *C. gnidiella* hacia las uvas de ambas variedades. Estos experimentos no pudieron realizarse por no contar con suficiente cantidad de hembras *C. gnidiella* en el momento en que las uvas de distintos estados fenológicos estaban disponibles en campo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry (Illinois: Allured Publishing Corporation).
2. Gomez, E., Martinez, A., and Laencina, J. (1995). Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 229-233.
3. Kalua, C.M., and Boss, P.K. (2009). Evolution of volatile compounds during the development of Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3818–3830.
4. Yang, C., Wang, Y., Wua, B., Fang, J., and Li, S. (2011). Volatile compounds evolution of three table grapes with different flavour during and after maturation. *Food Chemistry* 128, 823–830.
5. Schreier, P., Drawert, F., and Junker, A. (1976). Identification of volatile constituents from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 331–336.
6. Rosillo, L., Salinas, M.R., Garijo, J., and Alonso, G.L. (1999). Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. *Journal of Chromatography A* 847, 155–159.
7. Girard, B., Fukumoto, L., Mazza, G., Delaquis, P., and Ewert, B. (2002). Volatile terpene constituents in maturing Gewürztraminer grapes from British Columbia. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 99-109.
8. Ansebo, L., Coracini, M.D.A., Bengtsson, M., Liblikas, I., Ramírez, M., Borg-Karlson, A.K., Tasin, M., and Witzgall, P. (2004). Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *Journal of Applied Entomology* 128, 488-493.
9. Piñero, J.C., and Dorn, S. (2009). Responses of female oriental fruit moth to volatiles from apple and peach trees at three phenological stages. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 131, 67-74.
10. Tasin, M. (2005). Sex, wine and chemical communication in grapevine moth *Lobesia botrana*, Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science, Alnarp.
11. Tasin, M., Anfora, G., Ioriatti, C., Carlin, S., De Cristofaro, A., Schmidt, S., Bengtsson, M., Versini, G., and Witzgall, P. (2005). Antennal and behavioral responses of grapevine moth *Lobesia botrana* females to volatiles from grapevine. *Journal of Chemical Ecology* 31, 77-87.

12. Tasin, M., Backman, A., Bengtsson, M., Varela, N., Ioriatti, C., and Witzgall, P. (2006). Wind tunnel attraction of grapevine moth females, *Lobesia botrana*, to natural and artificial grape odour. *Chemoecology* 16, 87-92.
13. Tasin, M., Backman, A., Coracini, M., Casado, D., Ioriatti, C., and Witzgall, P. (2007). Synergism and redundancy in a plant volatile blend attracting grapevine moth females. *Phytochemistry* 68, 203-209.
14. Bruce, T.J.A., and Pickett, J.A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochemistry* 72, 1605-1611.
15. Renwick, J.A.A., and Chew, F.S. (1994). Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 39, 377-400.
16. Maher, N., and Thiéry, D. (2004). A bioassay to evaluate the activity of chemical stimuli from grape berries on the oviposition of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* 94, 27-33.
17. Maher, N., Thiery, D., and Städler, E. (2006). Oviposition by *Lobesia botrana* is stimulated by sugars detected by contact chemoreceptors. *Physiological Entomology* 31, 14-22.



## ANEXO

Compuestos volátiles emitidos *en vivo* por uvas de las variedades Gewürztraminer y Tannat, durante dos temporadas y cuatro estados fenológicos. Los compuestos se agrupan según características estructurales, y se incluyen los porcentajes de similitud de los espectros de masas con los correspondientes de las bases de datos (masas), así como los índices de retención calculados y de bibliografía. Los estadios fenológicos se clasifican en: flores, uvas verdes, uvas en envero, uvas maduras. La cantidad de cada compuesto se expresa en ng equivalentes de tridecano/ gramo de material vegetal, y corresponde al promedio de dos muestras de volátiles colectadas durante 20 horas. En gris se muestran los compuestos que se encontraron en la colecta de volátiles blanco, aunque con un área menor al 50 % del área en la colecta de volátiles de uva, los demás compuestos no fueron encontrados en el blanco. Los índices de retención de bibliografía se obtuvieron a partir de la biblioteca Adams y con asterisco se señalan los obtenidos de la biblioteca Flavornet. Los compuestos no identificados (NI) que se indican con una numeración son aquellos que claramente se repetían entre muestras, dados sus espectros de masas y tiempos de retención.

### Primera temporada: verano 2009/2010

#### Gewürztraminer

Grupo estructural	Compuesto	% sim.	IR calc.	IR bibl.	Estado fenológico			
					flores	uva verde	uva envero	uva madura
alcoholes	1-octen-3-ol	98	974	974			1.1	2.0
	1-octanol	95	1069	1063				1.2
aldehídos	octanal	95	996	998	72.4	1.3	1.0	
	nonanal	95	1100	1100	147.7	7.9	6.1	3.2
	decanal	93	1201	1201	114.6	8.1	4.8	2.8

cetonas	2-tridecanona	88	1494	1495	2013.1			
	2-pentadecanona	96	1696	1697	2397.5			
ésteres	tetradecanoato de metilo	93	1722	1722	157.9			
	hexadecanoato de metilo	95	1921	1921	74.5			
hidrocarburos	1-tetradeceno	86	1391	1392	70.3			
	hexadecano	92	1598	1600	64.6			
	heneicosano	93	2112	2100	187.7			
monoterpenos no oxigenados	$\alpha$ -pineno	92	928	932	42.5			
	<i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	92	1047	1044	47.7	3.1		
monoterpenos oxigenados	1,8-cineol (y limoneno)	96/88	1029	1026/1024	95.5			
	óxido de <i>Z</i> -linalool (furanóide)	85	1071	1067		1.1	0.9	
	óxido de <i>E</i> -linalool (furanóide)	86	1087	1084		2.2	0.7	
	linalool	95	1097	1095	75.9	2.3	5.0	
	óxido de <i>Z</i> -linalool (piranoide)	91	1171	1170		1.4		
	cintronelato de metilo	92	1258	1257				2.5
	nerolato de metilo	85	1279	1280				2.5
	geranato de metilo	90	1322	1322	46.6		6.8	74.6
	geranato de etilo	89	1391	1394				1.2
terpenos irregulares	6-metil-5-hepten-2-ona	94	978	981	428.5	2.2	2.1	4.2
	geranil acetona	93	1450	1453	429.1	1.4	0.9	2.8
	<i>E</i> - $\beta$ -ionona	92	1487	1487	114.7			
sesquiterpenos no oxigenados	$\beta$ -elemeno	92	1396	1389	94.5			
	<i>E</i> -cariofileno	94	1428	1417	565.6			
	<i>E</i> - $\beta$ -farneseno	92	1457	1454	1111.1			27.2
	$\alpha$ -humuleno	92	1463	1452	214.9			
	$\alpha$ -zingibereno	88	1495	1493			1.4	28.8
	valenceno	92	1503	1496	2533.5			2.3
	<i>E,E</i> - $\alpha$ -farneseno	92	1509	1505	2887.7		3.7	83.3
	7-epi- $\alpha$ -selineno	91	1529	1520	1462.1			2.3
sesquiterpenos oxigenados	<i>E</i> -nerolidol	90	1563	1561	42.3			
	óxido de cariofileno	90	1590	1582	218.7			

	<i>E,E</i> -2,6-farnesal	92	1741	1740	182.7	
	<i>E,E</i> -2,6-farnesoato de metilo	92	1781	1783	310.1	6.0
diterpenos	<i>E,E</i> -geranil linalool	88	2035	2026	47.3	
no identificados	NI 1	X	1115	X	35.9	
	NI 3	X	1353	X		1.4
	NI 5	X	1435	X		4.5
	NI 6	X	1470	X	53.2	
	NI 7	X	1484	X	116.6	
	NI	X	1523	X		1.9
	NI 8	X	1534	X		5.4
	NI 9	X	1554	X	45.2	5.8
	NI	X	1574	X		1.9
	NI 11	X	1596	X		22.0
	NI 13	X	1616	X	43.6	7.7
	NI	X	1665	X	124.0	
	NI 14	X	1669	X	191.4	
	NI 16	X	1678	X	2468.5	
	NI 17	X	1873	X	459.9	
	NI 20	X	2106	X		1.7
	NI	X	2129	X	50.1	

## Tannat

Grupo estructural	Compuesto	% sim.	IR calc.	IR bibl.	Estado fenológico			
					flores	uva verde	uva envero	uva madura
alcoholes	1-hexanol	94	861	863	25.6			
	1-octen-3-ol	97	974	974				0.7
	alcohol bencílico (y 1,8-cineol)	94/90	1030	1026/1026	127.6			
aldehídos	<i>E</i> -2-hexenal	88	843	846	34.8			
	heptanal	85	891	901	19.3			
	benzaldehído	90	953	952	25.3			
	nonanal	89	1101	1100	13.8	1.6	2.2	1.1
	decanal	90	1200	1201			1.9	1.1
cetonas	2-tridecanona	91	1495	1495	735.6			
	2-pentadecanona	97	1696	1697	769.8			
ésteres	tetradecanoato de metilo	95	1722	1722	79.1			
	hexadecanoato de metilo	95	1920	1921	61.3			
éteres	p-metil anisol	89	1005	1015	31.5			
	1,2-dimetoxi-benceno (veratrol)	94	1140	1141	913.2			
	1,4-dimetoxi-benceno	91	1160	1161	26.3			
hidrocarburos	1-tetradeceno	92	1392	1392	192.8			
	tetradecano	95	1401	1400	26.9			
	pentadecano	94	1503	1500	444.3			
	heptadecano	94	1701	1700	215.6			
	nonadecano	92	1899	1900	353.6			
	heneicosano	94	2111	2100	80.5			
monoterpenos no oxigenados	sabineno	89	970	969	7.5			
	$\beta$ -mirceno	89	988	988	15.3			
	<i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	88	1047	1044	25.0	1.0		

monoterpenos	óxido de <i>Z</i> -linalool (furanoide)	90	1071	1067	27.1	1.1	
oxigenados	óxido de <i>E</i> -linalool (furanoide)	85	1087	1084	12.7	1.7	
	linalool	92	1098	1095	15.1	1.3	
	feniletil alcohol	97	1110	1106	159.0		
	óxido de <i>Z</i> -linalool (piranoide)	89	1171	1170			0.7
	$\alpha$ -terpineol	91	1189	1186	8.6		
terpenos irregulares	6-metil-5-hepten-2-ona	94	979	981	104.6		0.7
	geranil acetona	93	1450	1453	159.6		
	<i>E</i> - $\beta$ -ionona	93	1488	1487	126.8		
	$\alpha$ - <i>E</i> -ionol	89	1379	1376	20.0		
	dihidro- $\beta$ -ionona	92	1440	1434	125.3		
sesquiterpenos no oxigenados	$\alpha$ -ylangeno	93	1379	1373			0.5
	$\alpha$ -copaeno	89	1383	1374	18.3	0.9	
	$\beta$ -elemeno	88	1397	1389	396.6		
	<i>E</i> -cariofileno	90	1433	1417	4829.1	3.6	
	<i>Z</i> - $\beta$ -farneseno	85	1447	1440	95.6		
	204 NI	X	1450	X		0.8	
	<i>E</i> - $\beta$ -farneseno	92	1460	1454	4099.9		
	$\alpha$ -humuleno	91	1464	1452	918.2	1.7	
	$\gamma$ -himachaleno	85	1479	1481	85.9		
	$\alpha$ -zingibereno	85	1495	1493	636.1		
	$\alpha$ -selineno	88	1506	1498	844.6		
	<i>E,E</i> - $\alpha$ -farneseno	93	1511	1505	2504.9	0.8	
	$\gamma$ -cadineno	94	1522	1513			0.6
	$\beta$ -sesquifelandreno	85	1529	1521	85.7		
	$\delta$ -cadineno	89	1530	1522		1.1	
sesquiterpenos oxigenados	<i>E</i> -nerolidol	86	1563	1561	152.4		
	óxido de cariofileno	91	1592	1582	1044.4		

diterpenos	<i>E,E</i> -geranil linalool	89	2035	2026	30.6	
otros	salicilato de metilo	92	1192	1190	31.9	1.1
no identificados	NI 1	X	1116	X	62.5	5.2
	NI	X	1202	X	19.3	
	NI 2	X	1206	X		2.9
	NI	X	1360	X	9.6	
	NI 4	X	1390	X	23.7	
	NI	X	1415	X	18.1	
	NI 6	X	1470	X	263.3	
	NI 7	X	1485	X	403.9	
	NI	X	1491	X	92.9	
	NI	X	1516	X	146.1	
	NI 8	X	1534	X	133.1	
	NI	X	1545	X	25.1	
	NI	X	1549	X	27.2	
	NI 10	X	1554	X	251.4	
	NI	X	1561	X	203.9	
	NI	X	1570	X	66.6	
	NI	X	1579	X	53.9	
	NI	X	1582	X	50.1	
	NI	X	1598	X	52.6	
	NI 12	X	1604	X	56.0	
	NI 13	X	1613	X	57.4	
	NI	X	1617	X	177.0	
	NI	X	1627	X	42.0	
	NI	X	1639	X	79.7	
	NI	X	1644	X	166.5	
	NI	X	1659	X	78.4	

NI	X	1664	X	72.8
NI 14	X	1671	X	130.5
NI 15	X	1675	X	639.9
NI 16	X	1680	X	1725.9
NI	X	1690	X	112.8
NI 17	X	1874	X	282.0
NI 18	X	1877	X	233.6
NI 19	X	2085	X	16.7
NI 20	X	2106	X	0.7

Segunda temporada: verano 2010/2011

Gewürztraminer

Grupo estructural	Compuesto	% sim.	IR calc.	IR bibl.	Estado fenológico			
					flores	uva verde	uva envero	uva madura
alcoholes	1-octen-3-ol	98	X	974		5.9		1.1
	<i>E</i> -2-octen-1-ol	92	1063	1060		2.0		
	1-octanol	96	1067	1063		2.8		
aldehídos	<i>E</i> -2-hexenal	95	X	846	111.1			
	heptanal	86	X	901	98.8	2.7		
	<i>E</i> -2-heptenal	92	X	947		11.8		
	octanal	94	1001	998	59.5	3.7		
	<i>E</i> -2-octen-1-al	92	1053	1049		4.3		
	nonanal	96	1101	1100	251.8	12.9	4.0	3.3
	<i>E</i> -2-nonen-1-al	92	1154	1157		1.6		
	decanal	97	1200	1201	161.1	5.2	2.7	1.1
	<i>E</i> -2-decenal	90	1257	1260		4.1		
	<i>E</i> -2-undecenal	91	1358	1357		2.1		
cetonas	1-octen-3-ona	95	X	972		4.7		
	<i>E</i> -3-octen-2-ona	92	1034	1030		2.1		
	2-tridecanona	96	1490	1495	92.4			
	2-pentadecanona	97	1691	1697	343.5			
ésteres	benzoato de bencilo	91	1752	1759	83.2			
hidrocarburos	heptadecano	96	1695	1700	154.4			
	nonadecano	93	1894	1900	339.0			
	heneicosano	95	2091	2100	93.8			
monoterpenos no oxi.	<i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	92	1043	1044	46.1	3.6		
monoterpenos oxigenados	1,8-cineol	93	1027	1026	96.1			
	óxido de <i>Z</i> -linalool (furanoide)	87	1065	1067		3.3		
	óxido de <i>E</i> -linalool (furanoide)	90	1081	1084		9.2		
	linalool	90	1096	1095	95.4	2.7	2.9	1.9



	feniletil alcohol	89	1105	1106				1.5
	Z-óxido de rosa	85	1105	1106		2.1		
	óxido de Z-linalool (piranoide)	90	1167	1170		5.6		
	citronelato de metilo	88	1253	1257				2.9
	geraniol	94	1245	1249				1.2
	nerolato de metilo	87	1272	1280				1.4
	geranato de metilo	89	1322	1322			4.2	49.2
	geranato de etilo	89	1387	1394				1.1
terpenos irregulares	6-metil-5-hepten-2-ona	94	X	981	539.9	4.7	2.4	11.0
	geranil acetona	93	1441	1453	297.5			1.4
sesquiterpenos no oxigenados	<i>E</i> -cariofileno	87	1409	1417	62.0			
	<i>E</i> - $\beta$ -farneseno	92	1449	1454	116.3			17.4
	aristoloqueno	88	1475	1487	64.8			
	valenceno	92	1484	1496	404.6			
	$\alpha$ -zingibereno	88	1487	1493				13.6
	<i>E,E</i> - $\alpha$ -farneseno	90	1499	1505	387.0		1.3	41.4
	7-epi- $\alpha$ -selineno	91	1509	1520	215.1			
sesquiterpenos oxigenados	<i>E</i> -nerolidol	85	1552	1561				1.5
	óxido de cariofileno	89	1569	1582	55.3			
	<i>E,E</i> -2,6-farnesoato de metilo	93	1767	1783				2.5
otros	salicilato de metilo	96	1184	1190	120.9			
no identificados	NI	X	1218	X				1.2
	NI	X	1235	X				3.9
	NI	X	1269	X				1.0
	NI 3	X	1350	X				1.2
	NI	X	1369	X				1.5
	NI	X	1414	X				1.0
	NI	X	1417	X				2.2
	NI 5	X	1431	X				4.8
	NI	X	1518	X				1.2
	NI	X	1521	X				1.6
	NI 8	X	1522	X				1.2

NI 9	X	1539	X		1.3
NI 10	X	1542	X		1.7
NI 11	X	1588	X		7.8
NI 12	X	1590	X		1.2
NI 13	X	1604	X		3.8
NI 15	X	1666	X	51.4	
NI 16	X	1670	X	312.1	
NI	X	1698	X		1.0
NI 17	X	1865	X	82.1	

## Tannat

Grupo estructural	Compuesto	% sim.	IR calc.	IR bibl.	Estado fenológico			
					flores	uva verde	uva envero	uva madura
alcoholes	2-etil-1-hexanol	93	1025	1032*			1.2	
	alcohol bencílico	97	1028	1026	755.6			
aldehídos	<i>E</i> -2-hexenal	96	836	846	170.7			
	heptanal	93	883	901	103.6			
	benzaldehído	96	948	952	119.6			
	octanal	94	1001	998		0.8		
	nonanal	96	1100	1101	127.8	3.6	2.7	1.1
	decanal	96	1200	1201	145.5		2.4	1.0
cetonas	2-tridecanona	94	1491	1495	1011.5			
	2-pentadecanona	97	1690	1697	1619.7			
ésteres	acetato de <i>E</i> -3-hexenilo	91	1003	1001		1.2		
	tetradecanoato de metilo	93	1716	1722	200.1			
	benzoato de bencilo	95	1752	1759	259.2			
	salicilato de bencilo	90	1853	1864	117.8			
	hexadecanoato de metilo	93	1916	1921	176.7			
éteres	<i>p</i> -metil anisol	86	1002	1015	55.1			
	1,2-dimetoxi-benceno (veratrol)	90	1139	1141	1421.4			
hidrocarburos	heptadecano	95	1695	1700	291.3			
	nonadecano	92	1893	1900	995.6			
	heneicosano	90	2091	2100	375.1			
monoterpenos no oxigenados	limoneno	91	1023	1024	51.0			
	<i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	93	1042	1043	42.3	0.9		
monoterpenos oxigenados	cineol	92	1025	1026	83.6			
	linalool	91	1095	1095	63.7			
	feniletíl alcohol	95	1105	1106	850.5			
	$\alpha$ -terpineol	89	1187	1186	48.4			
terpenos irregulares	6-metil-5-hepten-2-ona	92	979	981	480.1	0.8	1.0	
	geranil acetona	93	1442	1453	670.0			

	<i>E</i> -β-ionona (y germacreno D)	90/90	1472	1484/1487	433.5	
	dihidro-β-ionona	91	1425	1434	90.0	
sesquiterpenos no oxigenados	α-copaeno	85	1368	1374	73.3	0.8
	β-elemeno	93	1383	1389	857.4	
	<i>E</i> -cariofileno	93	1417	1417	11761.5	2.9
	<i>Z</i> -β-farneseno	87	1434	1440	108.4	
	α-humuleno	94	1445	1452		1.1
	<i>E</i> -β-farneseno (y α-humuleno)	92/91	1453	1452/1454	10696.6	
	204 NI	X	1467	X	208.6	
	α-amorfenol	91	1470	1483		1.0
	β-selineno	91	1481	1489	252.5	
	α-zingibereno	85	1487	1493	2535.4	
	α-muuroleno	92	1490	1500		0.9
	<i>E,E</i> -α-farneseno	93	1505	1505	11436.8	
	δ-amorfenol	87	1509	1511		1.2
	β-sesquifelandreno	91	1518	1521	75.6	
sesquiterpenos oxigenados	<i>E</i> -nerolidol	91	1553	1561	216.8	
	óxido de cariofileno	90	1570	1582	1130.4	
diterpenos	<i>E,E</i> -geranil linalool	91	2009	2026	139.4	
otros	salicilato de metilo	95	1184	1190	160.1	0.5
no identificados	NI	X	912	X	90.4	
	NI	X	933	X	49.1	
	NI 1	X	1109	X	112.3	3.3
	NI 2	X	1200	X		6.8
	NI	X	1329	X	45.2	
	NI 4	X	1375	X	84.5	
	NI 6	X	1464	X	280.4	
	NI 8	X	1523	X	69.6	
	NI	X	1540	X	114.0	
	NI 10	X	1543	X	157.6	
	NI	X	1587	X	80.3	
	NI 12	X	1590	X	47.6	

NI	X	1595	X	101.7	
NI 13	X	1605	X	54.0	
NI	X	1644	X	74.3	
NI	X	1649	X	45.5	
NI	X	1653	X	120.3	
NI 14	X	1661	X	189.8	
NI 15	X	1667	X	1441.2	
NI 16	X	1672	X	3613.2	1.6
NI	X	1676	X	190.8	
NI	X	1859	X	274.0	
NI 17	X	1866	X	637.5	
NI 18	X	1868	X	774.4	
NI 19	X	2062	X	51.0	

## CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo general de la tesis fue la investigación de aspectos químicos y biológicos de la comunicación química intra- e inter-específica de *Cryptoblabes gnidiella*, en particular apuntando al desarrollo de estrategias para el manejo ecológico de dicha plaga en viñedos de Uruguay. En este marco, se estudió la respuesta electrofisiológica y comportamental de machos de *C. gnidiella* a los formiatos análogos estructurales de la feromona sexual, así como el potencial de estos análogos en el control de esta especie. Asimismo, se estudió la emisión de compuestos orgánicos volátiles de uvas de dos variedades con diferencias en la susceptibilidad al ataque de *C. gnidiella*. En este caso, el objetivo fue identificar compuestos con posible actividad como kairomonas en la selección de la planta hospedera por parte de hembras de *C. gnidiella*.

Nuestros resultados permiten concluir que el sistema sensorial de los machos de *C. gnidiella* detecta ambos análogos de la feromona sexual, formiato de (Z)-9-tetradecenilo y formiato de (Z)-11-hexadecenilo, siendo la respuesta de la antena similar en magnitud a la de los componentes de la feromona. De acuerdo a nuestros experimentos, los receptores de la antena de machos *C. gnidiella* no parecen ser bloqueados por los formiatos, manteniéndose inalterada la respuesta de la antena a la feromona sexual.

Comportamentalmente, los análogos no son reconocidos como miméticos de la feromona sexual sino como antagonistas, ya que los mismos inhiben la respuesta de los machos a la feromona sintética o natural (hembras llamando), como se observó en los estudios de comportamiento en túnel de viento y en el experimento a campo donde se evaluó la actividad de los formiatos. En el experimento a campo se observó este efecto antagonista a lo largo de toda la temporada, independientemente de la densidad de población de *C. gnidiella*. Los resultados del estudio electrofisiológico y comportamental en túnel de viento, así como la evaluación de la actividad a campo, fueron publicados en la revista *Journal of Chemical Ecology*.

Los resultados obtenidos en el experimento a campo para evaluar la eficiencia de los formiatos para el control de *C. gnidiella* indican que éstos son promisorios como método de control. El número total de larvas de *C. gnidiella*, así como el número de insectos por racimo, fue significativamente menor en el cuadro tratado con formiatos, obteniéndose una reducción de daño de 42 % con una dosis aproximada de 10 g/hectárea. Teniendo en cuenta además que existen varios parámetros que pueden optimizarse a futuro como la cantidad de análogos aplicada, el tipo de dispensador, o el tamaño del área tratada, entre otros, esta estrategia de control por inhibición de la respuesta a la feromona sexual amerita un desarrollo posterior a esta tesis. De los mecanismos que se consideran importantes en la disrupción de la comunicación entre machos y hembras por confusión sexual, el que podría estar actuando en nuestro caso es el desequilibrio sensorial, donde la presencia de los formiatos en el aire modificaría la relación de componentes percibida por los machos, y necesaria para que éstos respondan adecuadamente. Los resultados obtenidos en esta primera evaluación proporcionan un punto de partida para el desarrollo de una estrategia de manejo ecológico de *C. gnidiella* en viñedos.

En cuanto a los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las uvas, se comprobó que existen diferencias cuali y cuantitativas, tanto al comparar las dos variedades estudiadas como al comparar los diferentes estados fenológicos de una misma variedad (flores, uvas verdes, uvas en envero, uvas maduras). La cantidad de volátiles emitida, disminuyó en ambas variedades desde el fin de la floración hasta el envero y luego de éste se observó un aumento significativo en Gewürztraminer, la variedad más susceptible, mientras que en Tannat la emisión siguió disminuyendo. La respuesta electrofisiológica de las antenas de hembras de *C. gnidiella*, fue evaluada para ambas variedades en los diferentes estados fenológicos, no observándose una respuesta clara (superior al ruido) y reproducible bajo las condiciones utilizadas. Es probable sin embargo, que las hembras de *C. gnidiella* utilicen señales volátiles para encontrar y seleccionar su planta hospedera, por lo que deberían realizarse nuevos estudios electrofisiológicos con un instrumento más sensible y estudios comportamentales en túnel de viento con hembras copuladas para completar este estudio.