

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE HEMBRAS ADULTAS DE *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (DIPTERA: TEPHRITIDAE) A COMPUESTOS VOLÁTILES EMITIDOS POR FRUTOS DE *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret

por

Nicolás YAKIMIK QUINTANILLA

TESIS presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

Tesis aprobada por:

Director: -----

MSc. María Victoria Calvo Silvera

-----

Dr. Andrés González Ritzel

-----

Ing. Agr. Iris Beatriz Scatoni Sánchez

Fecha: 8 de marzo de 2019

Autor: -----

Nicolás Yakimik Quintanilla

## AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Victoria Calvo, Andrés González y Beatriz Scatoni por su apoyo y compromiso en la realización de este trabajo.

A mi madre Tani por impulsarme a seguir siempre adelante.

A mi compañera Soledad por su apoyo emocional y académico en este trabajo.

A mis amigos y compañeros de facultad por todas las horas compartidas a lo largo de la carrera.

A todo el equipo del Laboratorio de Ecología Química por su paciencia para conmigo.

A INIA Las Brujas y a los productores que nos permitieron coleccionar la fruta.

A Elina Zefferino y Felicia Duarte por su contribución en este trabajo.

A la Unidad de Entomología de la Facultad de Agronomía.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	vi
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	3
2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	4
2.3 HOSPEDEROS DE <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	5
2.3.1 <u>Acca sellowiana</u> como hospedero nativo.....	5
2.4 DAÑOS CAUSADOS POR <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	6
2.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	7
2.6 BIOLOGÍA DE <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	8
2.7 MONITOREO Y CONTROL .....	10
2.8 COMUNICACIÓN QUÍMICA EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>Anastrepha</i> .....	11
2.9 ECOLOGÍA COMPORTAMENTAL DE <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	13
2.9.1 <u>Comportamiento relacionado con la oviposición</u> .....	13
2.10 SEMIOQUÍMICOS APLICADOS AL CONTROL DE MOSCAS DE LA FRUTA.....	14
2.11 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	15
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	16
3.1 INSECTOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS.....	16
3.2 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS.....	17
3.2.1 <u>Frutos colectados para extraer los compuestos orgánicos             volátiles</u> .....	17

3.2.2 <u>Colecta de compuestos orgánicos volátiles</u> .....	17
3.3 <u>BIOENSAYOS DE OLFATOMETRÍA</u> .....	18
3.3.1 <u>Bioensayos de elección</u> .....	19
3.3.2 <u>Test estadísticos utilizados</u> .....	20
4. <u>RESULTADOS</u> .....	21
4.1 <u>BIOENSAYO 1: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO MADURO CONTRA CONTROL</u> .....	21
4.2 <u>BIOENSAYO 2: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO INMADURO CONTRA CONTROL</u> .....	21
4.3 <u>BIOENSAYO 3: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO MADURO CONTRA COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO INMADURO</u> .....	22
4.4 <u>COMPORTAMIENTOS OBSERVADOS EN LOS BIOENSAYOS</u> .....	23
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	24
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	27
7. <u>RESUMEN</u> .....	28
8. <u>SUMMARY</u> .....	29
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	30

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura No.	Página
1. Adultos de <i>Anastrepha fraterculus</i> , a la izquierda de la figura una hembra a la derecha un macho.....	3
2. Distribución geográfica de <i>Anastrepha fraterculus</i> ... ..	4
3. Escala de maduración de los diferentes hospederos de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	5
4. Daños causados por <i>Anastrepha fraterculus</i> sobre frutos.....	7
5. Ciclo biológico de <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	9
6. Trampa para monitoreo de tipo McPhail.....	11
7. Recipientes plásticos con frutos infestados por <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	16
8. Equipo para la colecta de volátiles.....	18
9. Olfatómetro de dos vías en forma de Y.....	19
10. Bioensayo 1: compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro contra hexano.....	21
11. Bioensayo 2: compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro contra hexano.....	22
12. Bioensayo 3: compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro contra compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro.....	23

## 1. INTRODUCCIÓN

Las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) de importancia económica reportadas para Uruguay son *Ceratitis capitata* (mosca del Mediterráneo) y *Anastrepha fraterculus* (mosca sudamericana de la fruta). Los tefrítidos son plagas primarias para la citricultura y la fruticultura de hoja caduca. Son capaces de realizar daños directos sobre los frutos producto de la oviposición y posterior desarrollo de las larvas en su interior, reduciendo así la cantidad y calidad de frutos comercializables. Muchas veces estos daños son vía de entrada para microorganismos oportunistas que causan la maduración y caída precoz de los frutos (Bentancourt y Scatoni, 2010). Para acceder a ciertos mercados internacionales las estrategias de manejo para mantener las poblaciones por debajo del nivel de perjuicio económico deben ser eficaces, y de bajo impacto ambiental. Las medidas específicas para el manejo de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en Uruguay son insuficientes, contando solo con herramientas de control químico y medidas culturales.

Este trabajo explora aspectos básicos de las interacciones entre *A. fraterculus* y su hospedero nativo *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (especie frutal de promisorio desarrollo comercial), ambas especies han co-evolucionado por largo tiempo mediando parte de sus interacciones diversos sistemas de comunicación, en particular la comunicación química, involucrando kairomonas. Estas kairomonas son compuestos volátiles emitidos por los frutos de *Acca sellowiana* los cuales son utilizados por *A. fraterculus* para localizar su hospedero. El estudio de este sistema podría brindar información para el desarrollo de estrategias de control (como las antes mencionadas) de las poblaciones de *A. fraterculus* en hospederos nativos y cultivados de importancia económica.

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Este trabajo pretende conocer aspectos básicos de la interacción entre *Anastrepha fraterculus* y su hospedero *Acca sellowiana* mediada por compuestos volátiles emitidos por los frutos del mismo.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1) Determinar la atracción de los compuestos orgánicos volátiles colectados de frutos maduros de *A. sellowiana* (O. Berg) para las hembras adultas de *A. fraterculus*.

- 2) Determinar la atracción de los compuestos orgánicos volátiles colectados de frutos inmaduros de *A. sellowiana* (O. Berg) para las hembras adultas de *A. fraterculus*.
- 3) Determinar la atracción de los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros de *A. sellowiana* frente a los de frutos inmaduros para las hembras de *A. fraterculus*.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESCRIPCIÓN DE *Anastrepha fraterculus*

La mosca sudamericana de la fruta es un insecto holometábolo, por tanto completa su desarrollo a través de cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto. Los adultos (Figura 1) miden de 6 a 7 mm de longitud. Se caracterizan por tener la cabeza de color castaño amarillenta, ojos verdosos, iridiscentes. El tórax es castaño con tres líneas longitudinales amarillas. Se diferencian de los de *Ceratitis capitata* por tener las alas más largas y con un moteado diferente (Bentancourt y Scatoni, 2010). Las alas presentan bandas costales en forma de "S" y otras en forma de "V" invertida de coloración amarilla o marrón (Malavasi y Zucchi, 2000). Los huevos son de forma elíptica, el diámetro mayor se encuentra en el centro del mismo, puede llegar a medir 0,23 mm, decrece hacia las extremidades, son de color blanco-crema. Las larvas tienen un cuerpo vermiforme, no hay una separación nítida entre la cabeza y el cuerpo, son apodas tienen 11 segmentos corporales, de tonalidades blanco a crema, en la región ventral cada uno de estos segmentos presenta denticulos asociados a la adhesión a las superficies. La coloración es blanquecina que puede volverse un tanto amarilla al final del desarrollo debido al aumento del número de células adiposas. Las pupas miden de 5-6 mm de longitud por 2-2,5 mm de ancho, de forma ovoide, tienen una coloración marrón (Malavasi y Zucchi, 2000).



Figura 1. Adultos de *Anastrepha fraterculus*, a la izquierda de la figura una hembra, a la derecha un macho.

Fuente: tomado de Vitaluña et al. (2010).

## 2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *Anastrepha fraterculus*

Las especies del género *Anastrepha* se distribuyen en la región Neotropical, entre las latitudes 35° N a 35° S (Figura 2), ocupando gran diversidad de ambientes (Malavasi y Zucchi, 2000). Dentro del género *Anastrepha*, la especie *A. fraterculus* es originaria de Brasil y es la especie que presenta la distribución más amplia, se extiende desde el Norte de México incluyendo el Caribe, hasta la Patagonia Argentina que es una zona libre de esta especie. Su importancia económica crece hacia el Sur, siendo plagas primarias de los cultivos (Malavasi y Zucchi, 2000). En Uruguay, se constató por primera vez la presencia de *A. fraterculus* en el año 1927 en duraznos provenientes del departamento de Rivera.

Según Hernández-Ortiz et al. (2012) el estatus taxonómico de esta especie es el de complejo de especies crípticas por sus variadas diferencias morfológicas y genéticas que incluyen aislamiento reproductivo y diferencias comportamentales. Estos autores identificaron 7 morfotipos para Sudamérica, dentro del complejo de la especie. El morfotipo presente en la región que se encuentra Uruguay es el “Brasileño-1”, si bien en Uruguay aún no se han hecho estudios para su caracterización, este morfotipo fue encontrado en todas las muestras colectadas en Argentina y en la mayoría de las muestras provenientes del Sur de Brasil.

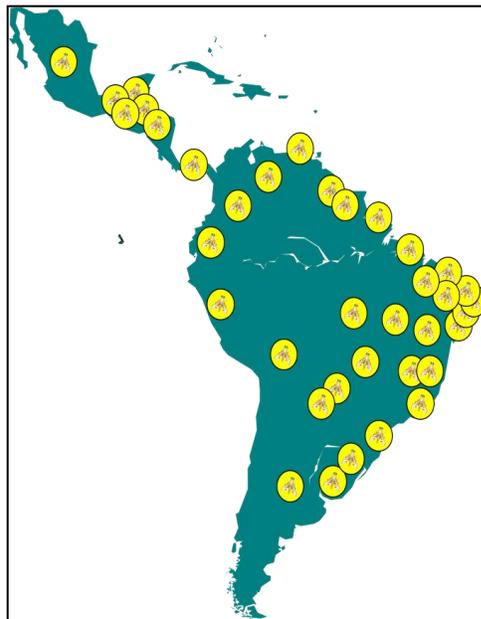


Figura 2. Distribución geográfica de *Anastrepha fraterculus*.  
Fuente: adaptado de CABI (2019).

### 2.3 HOSPEDEROS DE *Anastrepha fraterculus*

El género *Anastrepha* tiene hospederos conocidos en 31 familias de plantas, los cuales el 37 % pertenecen a las mirtáceas (Malavasi y Zucchi, 2000). Delgado et al. (2014) en su trabajo de prospección de hospederos de moscas de la fruta para Uruguay, encontraron que *Anastrepha fraterculus* estaba presente en 11 especies de frutales: *Malus domestica*, *Pyrus communis*, *Citrus paradisi*, *P. cattleianum* f. *lucidum* y *P. cattleianum* f. *cattleianum*, *Acca sellowiana*, *Acanthosyris spinescens*, *Eugenia pungens*, *Eugenia involucrata*, *Haxachlamis edulis*, *Psidium guajaba*. Tanto *Acca sellowiana* como *Psidium cattleianum*, fueron los que presentaron mayores índices de infestación dentro de los frutales nativos más promisorios para el desarrollo comercial. En un trabajo previo de FAO (1989), se citan además como hospederos *Persea americana*, *Eriobotrya japonica* y *Prunus insititia*. Además, Bentancourt y Scatoni (2010) nombran a *Ficus carica* como hospedero. Como se puede observar *A. fraterculus* tiene hospederos susceptibles durante todo el año, pudiendo continuar su ciclo ininterrumpidamente y alcanzar si las condiciones les son favorables poblaciones altas (Figura 3).

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.
Mandarina												
Naranja												
Pomelo												
Manzana												
Pera												
Durazno												
Arándano												
Caqui												
Guayabo												
Arazá												

Figura 3. Escala de maduración de los diferentes hospederos de *Anastrepha fraterculus*.

#### 2.3.1 *Acca sellowiana* como hospedero nativo

El guayabo del país, guayabo criollo o guayabo, *Acca sellowiana*, es un árbol frutal (Brussa y Grela, 2007) perteneciente a la familia de las mirtáceas (Cracco y Muñoz, 2005). Se distribuye de forma espontánea al Norte y Noreste del país en terrenos quebrados y pedregosos (Legrand, 1968), y también se lo

puede encontrar en otras zonas del país, en ocasiones de forma espontánea (Brussa y Grela, 2007).

Vignale y Bisio (2005), en su trabajo de prospección de frutales nativos, lo describen como una especie con un período de floración prolongado desde octubre a fines de noviembre. El crecimiento del fruto oscila entre los 120–150 días post anthesis (Fischer et al., 2003) y el período de cosecha se extiende desde fines de febrero hasta mediados de mayo (Vignale y Bisio, 2005). Presenta un potencial como especie ornamental y principalmente frutícola. Actualmente existen plantaciones comerciales en Nueva Zelanda, California, Georgia, Azerbaijón, Colombia y Chile (Santos et al., 2005).

En Uruguay desde el año 2000 la Facultad de Agronomía e INIA llevan a cabo trabajos de prospección, introducción, evaluación y selección de frutos nativos, con el objetivo de caracterizar y seleccionar materiales que puedan adaptarse a una producción comercial. Una de las especies más promisorias dentro de este programa es el guayabo del país. Se han seleccionado materiales superiores en cuanto a sus características agronómicas, los que están siendo multiplicados mediante métodos de propagación vegetativa, con el objetivo de poder obtener poblaciones homogéneas (INIA, 2000). Por tanto en las plantaciones comerciales de guayabo del país se encuentran actualmente individuos que presentan gran diversidad en cuanto a sus características vegetativas, tamaño y calidad de los frutos y época de madurez, entre otras.

#### 2.4 DAÑOS CAUSADOS POR *Anastrepha fraterculus*

*Anastrepha fraterculus* ocasiona daños directos e indirectos. Estos daños desmerecen los frutos haciendo que los mismos no sean aptos para la comercialización y el consumo (Figura 4). Dentro de los directos los mayores daños son ocasionados por las larvas de *A. fraterculus* (al igual que las de *Ceratitis capitata*) que se alimentan y desarrollan en el interior de los frutos. Además las hembras perforan la epidermis de la fruta con su ovipositor para colocar los huevos dentro del fruto. Esta zona dañada con el correr de los días toma tonalidades parduscas que afectan la calidad comercial del fruto y pueden ser vías de entrada para microorganismos patógenos que causan pudriciones haciendo que los frutos caigan prematuramente (Bentancourt y Scatoni, 2010). Dentro de los daños indirectos, se encuentra el de carácter cuarentenario de las mismas para ciertos mercados de importación.



A= orificios de salida de larvas. B= daños causados con el ovipositor. C= larvas alimentándose del interior del fruto. D= daño por oviposición característico en manzanas verdes.

Figura 4. Daños causados por *Anastrepha fraterculus* sobre frutos.

## 2.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA

En 1937, diez años después de su descubrimiento en el país, los ataques de las moscas de la fruta se incrementaron, por lo que el 26 de junio de ese año el Poder Ejecutivo las declaró plagas de la agricultura. Durante la primera mitad del siglo XX el control de estos insectos se basó fundamentalmente en medidas culturales y en la aplicación de insecticidas minerales (fluosilicatos) mezclados con sustancias azucaradas atractivas. En 1948 el Ing. Agr. Agustín Ruffinelli introdujo al país desde Brasil, el endoparásitoide *Tetrastichus giffardianus* (Hymenoptera, Eulophidae). El mismo fue liberado en plantaciones de Salto, aunque no tuvo éxito en el control de la mosca del Mediterráneo (Trujillo Peluffo, 1942).

En 1964 el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, a través de su Dirección de Sanidad Vegetal, desarrolló un programa de lucha que consistía en la pulverización aérea sobre la ciudad de Salto y alrededores con un insecticida orgánico sintético (Malatión) y un atrayente alimenticio, con el objetivo de bajar las poblaciones de las moscas de la fruta. Por ese entonces el daño estimado causado por *C. capitata* y *A. fraterculus* en conjunto alcanzaba el 15% de la producción citrícola (MGA. DSV, 1964).

Actualmente en Uruguay hay 20900 hectáreas de cultivos susceptibles a ser atacados por estas plagas; 15300 hectáreas de cítricos y 5600 hectáreas de frutales de hoja caduca, además de los frutales nativos y los presentes en jardines, huertos y zonas silvestres (Figura 3). En 2014 se exportaron 107 millones de dólares en frutas cítricas para consumo en fresco, representando el 1,2% del total de exportaciones agropecuarias. Por su parte, la fruticultura de hoja caduca se orienta también para el consumo en fresco aunque

mayoritariamente para el mercado interno, llegando a exportar fruta fresca por 4 millones de dólares (MGAP. DIEA, 2015).

Dado el perfil exportador de la producción de cítricos en el Uruguay, el perjuicio económico causado por los daños indirectos de *A. fraterculus* y *C. capitata* son los más importantes, ya que son plagas cuarentenarias para Estados Unidos, China y además *A. fraterculus* es una plaga cuarentenaria para todos los países de la Unión Europea. Producir fruta cítrica para algunos de esos mercados implica cumplir con ciertos requisitos, como el monitoreo de plagas, control fitosanitario, saneamiento en el campo y control en las plantas empacadoras. En el caso de que las capturas de moscas por trampa por día (MTD) sean mayores a 1, se deben tomar medidas de control químico. Para Estados Unidos, si el MTD es mayor a 2 o si se encuentra un adulto vivo durante el proceso de embalaje, se suspende la exportación de fruta y todos los cítricos que estén en esa área no podrán ser exportados a este destino (MGAP. DGSSAA, 2017).

## 2.6 BIOLOGÍA DE *Anastrepha fraterculus*

Como se mencionó antes *Anastrepha fraterculus* es una especie polífaga. Presenta hábitos diurnos y son activas particularmente durante las horas más cálidas del día. Los adultos alcanzan la madurez sexual en un período que varía entre 7 y 30 días luego de la emergencia. Las hembras jóvenes requieren consumir proteínas para madurar sus ovarios previo a la cópula (Uchôa, 2012). Luego de aparearse deben elegir los frutos que permitan el desarrollo de su descendencia y oviponer en ellos, perforando la superficie con su ovipositor. Estos huevos tienen umbral de desarrollo inferior de 11,9°C y un superior de 13,2°C; la constante térmica para este estado es 52,2 GD. Las larvas se desarrollan dentro de los frutos alimentándose de los mismos, pasando por tres estadios. El umbral de desarrollo inferior para las larvas es de 13,8°C y el superior de 18,8°C; la constante térmica para este estado es 161,4 GD. Luego de completar los tres estadios, las larvas se dejan caer al suelo y pupan allí para emerger luego como adultos. Las pupas de *A. fraterculus* tienen un umbral de desarrollo inferior de 14,7°C y uno superior de 21,8°C; la constante térmica para cumplir este estado es de 227,7 GD (Malavasi y Zucchi, 2000). Los adultos suelen aprovechar cualquier fisura en el suelo para emerger ya que su exoesqueleto aún no adquirió la dureza característica; se ven favorecidos cuando estos son suelos pesados que se agrietan (Figura 5) (Christenson y Foote, 1960). El ciclo completo de *A. fraterculus* tiene una duración de 101,8 días a 25°C, lo que equivale a una constante térmica de 430,6 GD con un umbral de desarrollo de 10,7°C (Malavasi y Zucchi, 2000). Los adultos están presentes la mayor parte del año, en los meses con temperaturas más bajas sus poblaciones disminuyen (Bentancourt y Scatoni, 2010).

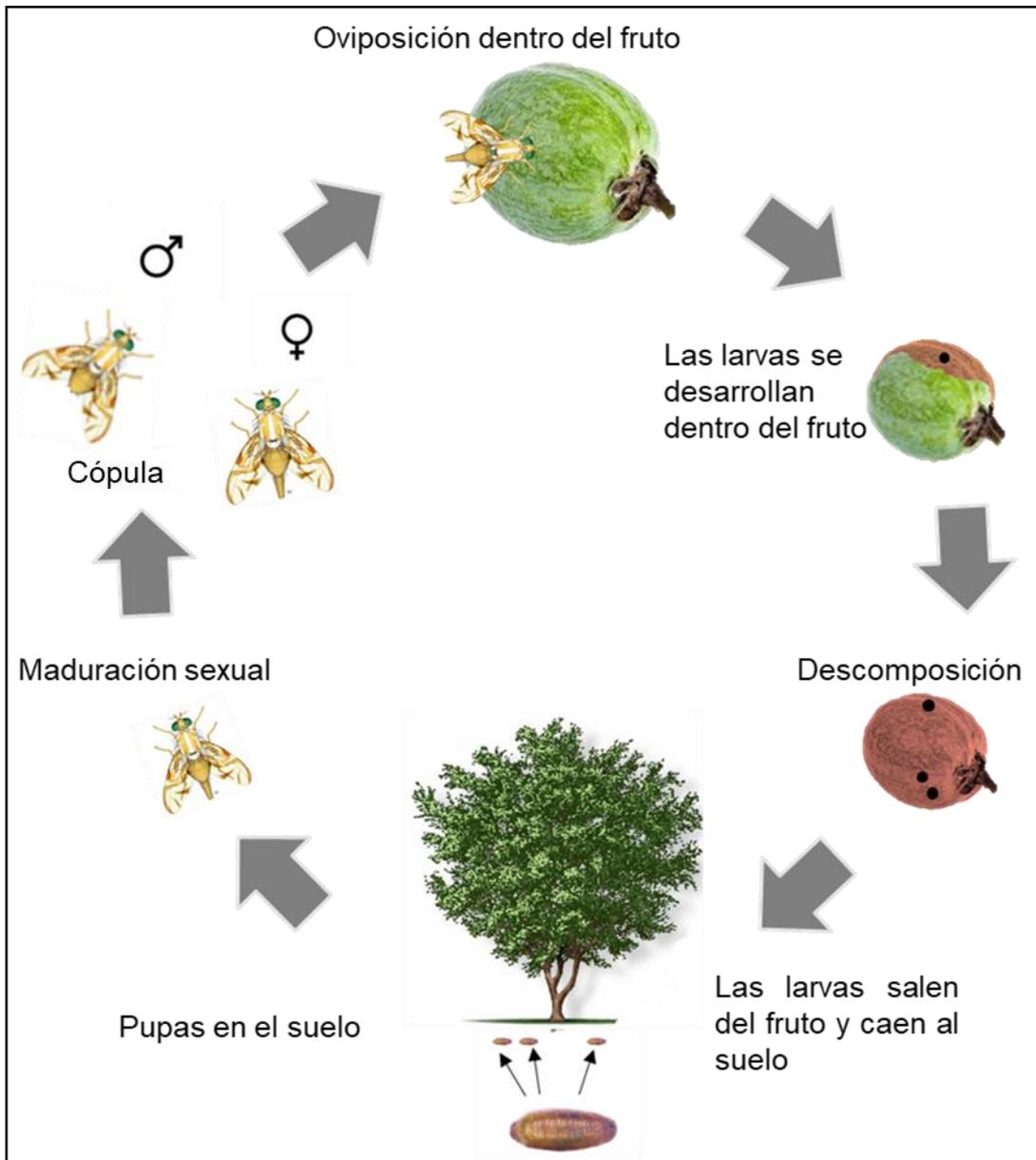


Figura 5. Ciclo biológico de *Anastrepha fraterculus*.  
 Fuente: adaptado de Malavasi y Zucchi (2000).

## 2.7 MONITOREO Y CONTROL

El monitoreo de las poblaciones de *Anastrepha fraterculus* resulta fundamental para tomar adecuadas decisiones de manejo. El programa de vigilancia de mosca de la fruta del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca de Uruguay, en su protocolo de trapeo establece los siguientes requisitos para el monitoreo de *Anastrepha fraterculus*, donde debe utilizarse una trampa de tipo McPhail cebada con proteína hidrolizada cada 100 hectáreas de cítricos en producción comercial (Figura 6). Las trampas deben quedar a la sombra, con la precaución de no obstruir el acceso de las moscas a la misma, a más de 1,5 m del suelo. Se deben colocar 4 pellets de proteína hidrolizada por trampa, más 225 cc de agua una vez por semana (MGAP. DGSSAA, 2017). Las capturas que se obtengan en esas trampas se expresan como MTD (mosca/trampa/día), para luego definir los umbrales de captura a partir del cual se tomarán medidas de control en las diferentes situaciones productivas.

Este método de monitoreo tiene altas dificultades de mantenimiento. Las trampas deben recebarse semanalmente y el análisis de las muestras puede ser dificultoso ya que los tefritidos no se observan fácilmente en las trampas. Estas trampas capturan tanto machos como hembras de *A. fraterculus* así como otros insectos no blanco y no son tan específicas como las trampas de paraferomona utilizadas en el caso de *Ceratitidis capitata* (OIEA, 2005).

Las estrategias más utilizadas para controlar las poblaciones de mosca de la fruta en Uruguay son el control químico y el trapeo masivo. Para control químico de *Anastrepha fraterculus* actualmente hay registrados tres principios activos Malation, Fosmet y Spinosad (Spinosin A + Spinosin D) para cítricos, frutales de carozo y pepita. Los principios activos Malation y Fosmet pertenecen al grupo químico de los organofosforados, grupo con restricciones para su uso en Uruguay y en sus destinos de exportación. Las espinosinas en cambio son productos más selectivos, de origen natural que se obtienen de la fermentación aerobia de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa*. Este producto se utiliza en la forma de cebo toxico combinado con un atrayente alimenticio, en general de origen proteico, que debe ser agregado en caso de que la formulación comercial no lo incluya. Para hacer una aplicación efectiva con este producto se sugiere utilizar boquillas gruesas sin difusor, consiguiendo un chorro fino que logre un tamaño de gota grande, que acentúa el efecto del cebo alimenticio. La aplicación debe realizarse en la porción de la planta más expuesta al sol.

Otra estrategia de control que ha tomado mayor relevancia en los últimos tiempos a nivel mundial para el control de poblaciones de moscas de la fruta es el trapeo masivo (Villalobos et al., 2017). La técnica consiste en poner un elevado número de trampas por hectárea, cebadas con atrayentes de forma de

capturar la mayor cantidad de tefrítidos posibles. Si bien hay varios atrayentes registrados para el control de *Ceratitis capitata* en Uruguay, no los hay para *A. fraterculus*. Los productos registrados para esta plaga son para utilizar en conjunto con insecticidas como se mencionó anteriormente; gluten de maíz hidrolizado y proteína hidrolizada de maíz son los dos atrayentes registrados con este fin. La mayoría de los atrayentes son alimenticios, ya que las hembras de tefrítidos necesitan alimentarse antes de la cópula (Uchôa, 2012), momento oportuno para reducir daños.



Figura 6. Trampa para monitoreo de tipo McPhail.

## 2.8 COMUNICACIÓN QUÍMICA EN ESPECIES DEL GÉNERO *Anastrepha*

En 1971 Law y Regnier proponen la palabra semioquímicos para nombrar todas las sustancias capaces de transmitir un mensaje entre un emisor y un receptor, pudiendo ser de la misma especie (intraespecíficos) o entre especies diferentes (interespecíficos). Los mismos autores proponen además que los semioquímicos interespecíficos se pueden dividir en dos: alomonas (favorecen al emisor) y kairomonas (favorecen al receptor).

Dicke y Sabelis (1988) definen a las kairomonas como sustancias químicas que son pertinentes para la biología de un organismo (organismo 1) y que, cuando entran en contacto con un individuo de otra especie (organismo 2), despiertan en el receptor una respuesta conductual o fisiológica que es favorable para el organismo 2 pero no para el organismo 1.

Los insectos son capaces de detectar estas señales químicas a través del olfato o del gusto. Las señales olfativas se detectan fundamentalmente a través de la antena y en menor medida a través de los palpos labiales y maxilares. Detectan diferentes tipos de semioquímicos que ofician como moduladores del comportamiento, ya sea en la búsqueda de una pareja para aparearse, en la búsqueda de alimento o de un hospedero adecuado para que se desarrolle su progeñie. También se presentan en los insectos variaciones en las respuestas a semioquímicos de acuerdo si son especies polífagas y multivoltinas como los tefrítidos, capaces de percibir un mayor número de señales ya que se mueven en ambientes de mayor complejidad (Siderhurst y Jang, 2006), o en cambio especies monófagas y univoltinas, las que más probablemente responderán a señales más específicas emitidas por su hospedero (Rojas y Malo, 2012).

Rojas y Malo (2012), señalan que, si bien ha habido experiencias exitosas en el uso de volátiles de plantas hospederas como atrayentes de especies de tefrítidos, las dificultades pueden presentarse a la hora de extraerlos de las fuentes naturales o querer sintetizarlos, y que su estructura química pueda ser muy compleja. Los insectos responden mejor a la mezcla de compuestos volátiles que forman el perfil de un fruto, que a sus compuestos individuales. Por lo tanto conocer estos compuestos y cómo afectan el comportamiento de los insectos nos permitirá elaborar mezclas igual atractivas pero más simples químicamente.

Bisotto (2010), evaluó las respuestas electrofisiológicas de antenas de machos y hembras de *A. fraterculus* al ser expuestas a volátiles de frutos (entre otras sustancias). Los individuos utilizados para los experimentos fueron obtenidos a partir una cría artificial iniciada con individuos colectados de frutos del municipio de Porto Alegre, Sur de Brasil. En ese estudio se utilizaron tanto hembras como machos de *A. fraterculus*, con diferentes edades y estatus respecto a la cópula, y se encontraron respuestas electroantenográficas para los extractos de volátiles de frutos de manzano, duraznero y naranjo, respuestas que fueron mayores para las hembras con respecto a los machos, independientemente de su edad o estatus reproductivo. En frutos de manzano y duraznero se encontraron diferencias significativas de acuerdo al estado de maduración de los frutos, teniendo una mayor respuesta los frutos maduros de ambas especies. Por su parte, Cruz-López et al. (2006), demostraron que ambos sexos de *A. obliqua* eran atraídos hacia compuestos volátiles extraídos de frutos de *Spondias mombin* en bioensayos realizados en túnel de viento. Además encontraron respuestas electroantenográficas para 9 compuestos de esta mezcla de volátiles. Una vez identificados los compuestos, fueron sintetizados y probados nuevamente en ensayos de túnel de viento, donde demostraron también ser atractivos para ambos sexos de *A. obliqua*.

## 2.9 ECOLOGÍA COMPORTAMENTAL DE *Anastrepha fraterculus*

La ecología comportamental es un campo del conocimiento de la biología que tiene como objeto estudiar la manera en que cada comportamiento contribuye a la supervivencia y reproducción de los individuos en relación a su medio ambiente. La ecología comportamental no solo se ocupa de aquellas estrategias comportamentales de supervivencia a través de la explotación de recursos y la evitación de depredadores, sino también de cómo el comportamiento contribuye al éxito reproductivo (Steinmann y Bonatto, 2015). A través del comportamiento los animales son capaces de reaccionar a estímulos internos y externos, permitiéndole adaptarse a cambios momentáneos en su hábitat. Los insectos tienen una amplia gama de comportamientos que pueden ser fijos o variables dependiendo de la estrategia de supervivencia de la especie (Malavasi y Zucchi, 2000). Como se describió anteriormente (sección 2.1), los daños directos de *A. fraterculus* son causados por el desarrollo de las larvas en el interior de los frutos, por lo tanto, conocer los comportamientos previos asociados a la selección del hospedero y a la oviposición sobre las frutas son relevantes para el cumplimiento de los objetivos de este trabajo.

### 2.9.1 Comportamiento relacionado con la oviposición

Luego de copular, la hembra está en condiciones de oviponer, por lo cual debe elegir los frutos adecuados que permitan el desarrollo de su descendencia. Este proceso consta de varias etapas. En una primera etapa la hembra debe encontrar el hábitat donde se encuentren sus plantas hospederas, aquí los estímulos olfativos son fundamentales. Una vez localizado el hospedero las hembras siguen una serie de comportamientos descritos por Malavasi y Zucchi (2000):

- Llegada al fruto: a corta distancia la hembra utiliza estímulos visuales como ser color, forma y tamaño para localizar la fruta hospedera.
- Evaluación: la hembra recorre la superficie del fruto tocando el mismo con la parte anterior de la cabeza y con la vaina del ovipositor, de forma perpendicular al fruto. En esta etapa analiza las características físicas y químicas del fruto.
- Punción: la hembra inserta el acúleo en la pulpa del fruto, manteniendo la vaina del ovipositor perpendicular a la superficie. No siempre deposita huevos, en algunos casos las hembras retiran el acúleo sin oviponer.
- Marcaje: la hembra recorre nuevamente la superficie del fruto. En esta etapa la hembra deposita una feromona de marcaje, o HMP (Host Marking Pheromone), cuya utilidad es señalar a otras hembras que ese fruto ya fue infestado.

## 2.10 SEMIOQUÍMICOS APLICADOS AL CONTROL DE MOSCAS DE LA FRUTA

Los seres vivos interactúan de forma diversa con los componentes del medio ambiente, en muchas de estas interacciones se presentan cambios en el contenido químico y la morfología de estos organismos. Estos compuestos químicos liberados al ambiente son capaces de afectar la conducta, salud y biología de otros organismos, es decir muchas de las relaciones ecológicas entre los organismos no son al azar, sino que tienen cierta estructura que se puede medir y entender (Anaya, 2003). A continuación, se describen los principales mecanismos de comunicación química (atrayentes alimenticios, feromonas y kairomonas) para moscas de la fruta y su desarrollo actual como técnica de control.

Dentro de la subfamilia Tephritidae, varias especies dentro de los géneros *Rhagoletis*, *Anastrepha*, *Batrocera* y la especie *Ceratitis capitata* depositan feromonas de marcaje sobre los frutos (Díaz y Castrejón, 2012). Una característica interesante de estas feromonas es que tienen una baja volatilidad lo que aumenta su persistencia y por tanto su residualidad sobre los cultivos (Boller, 1981). La desventaja de utilizar estas feromonas radica en el hecho de que las hembras podrían acostumbrarse rápidamente al contacto con esta feromona, o por no poder ovipositar por un tiempo largo viéndose obligada a hacerlo (Roitberg y Prokopy, 1983). Los estudios sobre feromonas sexuales se han realizado sobre las especies de importancia económica como *C. capitata*, varias especies del género *Anastrepha*. Se han identificado 9 compuestos volátiles en las feromonas de los machos de la especie *C. capitata* (Díaz y Castrejón, 2012). Los compuestos químicos individuales de la feromona sexual de esta especie, no resultaron igual de atractivos que las feromonas producidas por los machos de *C. capitata* (Jacobson et al., 1973). Las feromonas podrían ser utilizadas para controlar las poblaciones o para monitorear las mismas. A campo las feromonas han demostrado ser poco efectivas, solo atraen un solo sexo a diferencia de los cebos alimenticios que atrapan ambos sexos, además las feromonas sexuales son atrayentes a corta distancia. Las paraferomonas son compuestos sintéticos que producen repuestas similares a las feromonas naturales. Son ventajosas en comparación a las feromonas ya que pueden tener estructuras químicas más simples por ende más baratas, y potencialmente menos tóxicas (Díaz y Castrejón, 2012). El trimedlure una paraferomona del  $\alpha$ -copaene, se utiliza en Uruguay para el monitoreo de machos de *C. capitata* siendo un método eficiente con este fin (MGAP. DGSSAA, 2017).

Los tefritidos son insectos sinovigénicos, por tanto, las hembras buscarán los nutrientes básicos para madurar sus huevos durante su vida

reproductiva. En este sentido los cebos proteínicos son muy atractivos para las hembras y para los machos, en el caso del género *Anastrepha* el principal atrayente utilizado para su trapeo es la proteína hidrolizada (Heat y Epsky, 1993). El desarrollo y éxito de este tipo de atrayentes se ve potenciado por la escasez de proteínas en la naturaleza (Díaz y Castrejón, 2012).

Los kairomonas que emiten las plantas hospederas de las moscas de la fruta son usadas como pistas para las hembras a la hora de oviponer y por los machos para encontrar fácilmente al sexo opuesto. Estos compuestos tienen un potencial alto como herramientas de control y/o monitoreo ya que son altamente específicos. Un ejemplo de esto es el poder atrayente del compuesto  $\alpha$ -copaene para con los machos de *C. capitata*, componente de los aceites esenciales de frutos de naranjas, mangos y guayabas, extraerlo de fuentes naturales en cantidades suficientes presenta dificultades y sintetizarlo también dada su compleja estructura química (Díaz y Castrejón, 2012). Un caso exitoso en el uso de kairomonas para controlar moscas de la fruta es el llamado "método de aniquilación del macho". En la Isla Rota, Estados Unidos, se utilizó trampas de caja con 99.6% de metil eugenol y 3% de insecticida. Luego de 7 meses las poblaciones de *Batrocera dorsalis* se redujeron en un 99,6% (Steiner et al., 1965).

## 2.11 HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. Los compuestos orgánicos de frutos de guayabo (*Acca sellowiana*) son utilizados por hembras adultas de *Anastrepha fraterculus* como pistas químicas para encontrar su hospedero para oviponer.

2. Las respuestas comportamental de *Anastrepha fraterculus* no se modifica según el estado de maduración de los frutos de guayabo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 INSECTOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS

Las hembras de *Anastrepha fraterculus* utilizadas en los bioensayos se obtuvieron a partir de frutos infestados con larvas, tanto de hospederos nativos como cultivados. No se utilizaron frutos infestados de guayabo del país para evitar posibles alteraciones de los resultados en los bioensayos. Los frutos colectados fueron llevados al laboratorio de la Unidad de Entomología (UdelaR. Facultad de Agronomía) y se acondicionaron en recipientes de plástico con arena en el fondo y cubiertos por voile blanco, a la espera de la emergencia de adultos (Figura 7). Los adultos de *A. fraterculus* de ambos sexos obtenidos fueron trasladados a recipientes plásticos de mayor tamaño cubiertos también con voile blanco, y permanecieron allí por 12-20 días. En ese período, según Malavasi y Zucchi (2000), tanto hembras como machos alcanzan la madurez sexual y tuvieron las condiciones para copular. La temperatura, humedad relativa y fotoperiodo del laboratorio se mantuvieron constantes durante todas las etapas ( $25 \pm 0.4$  °C,  $55.0 \pm 4.0$  % HR, 14:10 L:O. La dieta utilizada para los adultos se compuso de azúcar, germen de trigo y levadura de cerveza en la proporción 3:1:1 (Goane et al., 2018).



Figura 7. Recipientes plásticos con frutos infestados por *Anastrepha fraterculus*

## 3.2 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS

Las colectas de volátiles fueron realizadas previamente a este trabajo en el marco del proyecto ANII - Fondo María Viñas: “Volátiles emitidos por plantas cultivadas y silvestres hospederas de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) y su rol en las interacciones tritróficas: plantas, moscas de la fruta y sus parasitoides”.

### 3.2.1 Frutos colectados para extraer los compuestos orgánicos volátiles

La extracción de compuestos orgánicos volátiles se realizó a partir de frutos de guayabo del país de la Estación Experimental INIA Las Brujas. En una primera instancia se colectaron frutos verdes y luego con 30 días en promedio de diferencia se colectaron frutos maduros, los cuales duplicaron su peso en ese período. Se colectaron un total de 211 frutos verdes en nueve colectas con un peso promedio por fruto de 10,2 g y 131 frutos maduros en diez colectas con un peso promedio por fruto de 36,8 g. Ambas colectas se realizaron sobre las mismas plantas.

El criterio para determinar la madurez fue el comercial, denominado “Touch-Picking”. Este criterio relaciona la madurez de una fruta a la facilidad con la cual se desprende de la planta. Los frutos que se desprendían con un mínimo esfuerzo se consideran maduros (Thorp y Klein 1987, Rupavatharam et al. 2015). No se colectaron frutos dañados, evitando así una alteración en su perfil normal de compuestos volátiles ante el estrés de un daño, de acuerdo a Dicke et al. (1990). Los frutos cosechados fueron manejados con cuidado para evitar que se contaminaran con otros compuestos volátiles y fueron trasladados inmediatamente al Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química (UdelaR) para realizar la colecta de sus volátiles.

### 3.2.2 Colecta de compuestos orgánicos volátiles

Se colectaron compuestos orgánicos volátiles de guayabos maduros e inmaduros por 24 h, utilizando aire previamente filtrado por carbón activado, una columna de Haysep-Q (100 mg) como adsorbente, y hexano como solvente de elusión (1 mL) (Figura 8). El hexano fue utilizado como control en los experimentos de comportamiento (ver sección 3.3), ya que se usó para eluir los compuestos volátiles de guayabo tanto maduro como inmaduro. Las colectas fueron mantenidas a -15°C, en viales sellados, hasta su uso en los ensayos de comportamiento. Para los bioensayos se utilizó una mezcla de las diez colectas de frutos maduros y de las nueve colectas de frutos inmaduros, de esta manera se uniformizaron los compuestos orgánicos volátiles para cada tratamiento,

evitando las variaciones que pudieran existir entre los diferentes árboles donde se realizaron las colectas.



Figura 8. Equipo para la colecta de volátiles.

### 3.3 BIOENSAYOS DE OLFATOMETRÍA

Para medir la atractividad de las hembras de *A. fraterculus* a los compuestos orgánicos volátiles, se utilizó un olfatómetro de dos vías en forma de "Y". El brazo central tenía una longitud de 20 cm y 4 cm de diámetro, y los brazos menores una longitud de 10 cm y 4 cm de diámetro (Figura 9). A los brazos menores se les anexaron extensiones de vidrio de 10 cm, en las cuales se colocaron papeles de filtro de 1 cm x 1 cm impregnados con 5  $\mu$ L de la solución de compuestos orgánicos volátiles, o bien con 5  $\mu$ L de hexano como control. Esta cantidad era equivalente a la colecta de 24 h de 0,1 fruto maduro (2,4 g) o a la colecta de 24 h de 0,1 fruto inmaduro (1,2 g).

Para evitar que las hembras adultas entraran en contacto con el estímulo, las extensiones de los brazos menores estaban separadas del resto del brazo mediante un tul blanco. En el otro extremo del olfatómetro, en una extensión de vidrio unida al brazo mayor, se colocó una hembra de *A.*

*fraterculus*. El aire ingresó al olfatómetro a través de tubos de teflón conectados a las extensiones de los brazos menores, y circuló con un caudal de 0,6 L/min, previamente filtrado y humedecido.

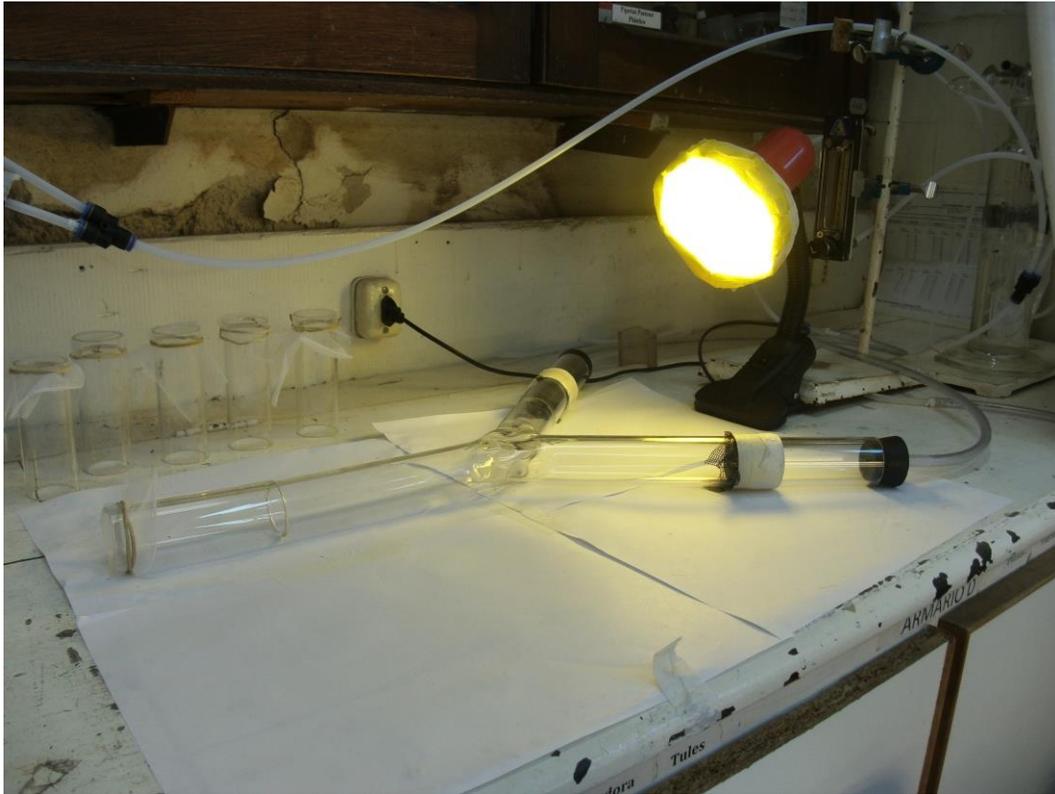


Figura 9. Olfatómetro de dos vías en forma de Y.

### 3.3.1 Bioensayos de elección

A continuación se detallan los experimentos realizados para evaluar la atractividad de las hembras de *A. fraterculus* a los compuestos orgánicos volátiles colectados:

- Compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro contra control.
- Compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro contra control.
- Compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro contra compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro.
- En cada bioensayo se registraron las siguientes variables:

- Primera elección: se refiere a cuál brazo menor fue elegido por la hembra por primera vez.
- Llegada hasta el estímulo: se refiere a si la hembra recorrió todo el brazo menor hasta llegar a la separación de tul con el estímulo.
- Tiempo de permanencia: indica cuánto tiempo se mantuvo en cada brazo.
- Número de visitas: indica cuántas veces visitó cada brazo en un bioensayo.

Previo a los ensayos, las moscas se dejaban 24 h sin alimentación (solo con agua), según lo indicado por Rasgado et al. (2009). Todos los bioensayos fueron realizados entre las 9:00 y las 15:00 horas, y duraron 15 minutos, más 2 minutos previos de aclimatación al sistema de olfatometría antes de iniciar los experimentos. Todo el material de vidrio fue lavado y secado en estufa antes de cada día de ensayos.

Cada hembra de *A. fraterculus* se utilizó una única vez y fueron descartadas al finalizar el bioensayo. Aquellas que no optaron por ninguno de los brazos no se consideraron en los análisis estadísticos. Luego de cada bioensayo los papeles de filtro utilizados eran descartados y, para evitar sesgos, las extensiones de los brazos menores eran cambiadas de lugar y se giraba el olfatómetro. Se utilizó una fuente de luz amarilla difusa colocada a igual distancia de ambos brazos menores para evitar sesgos de luz, y se aisló el sistema a estímulos visuales externos.

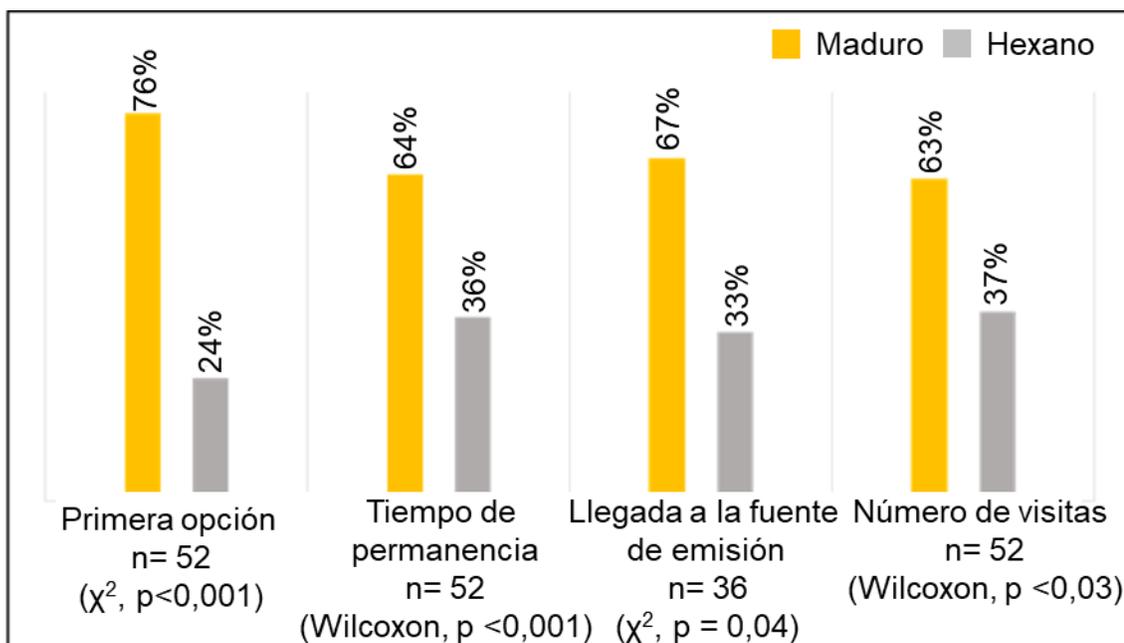
### 3.3.2 Test estadísticos utilizados

La prueba estadística utilizada para las variables “primera elección” y “llegada hasta el estímulo” fue la de Chi Cuadrado ( $\chi^2$ ). Para las variables “tiempo de permanencia” y “número de visitas” se utilizó la prueba estadística de Wilcoxon.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 BIOENSAYO 1: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO MADURO CONTRA CONTROL

Para este bioensayo se realizaron 123 repeticiones y se obtuvieron 52 respuestas, que se utilizaron luego para las pruebas estadísticas que se describen a continuación. Las moscas eligieron como primera opción el brazo que contenía los compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ) respecto al control. A su vez permanecieron por más tiempo (Wilcoxon,  $p < 0,001$ ) en este brazo, lo visitaron (Wilcoxon,  $p < 0,03$ ) y llegaron hasta la fuente de emisión ( $\chi^2$ ,  $p = 0,04$ ) en más ocasiones respecto del control (Figura 10).



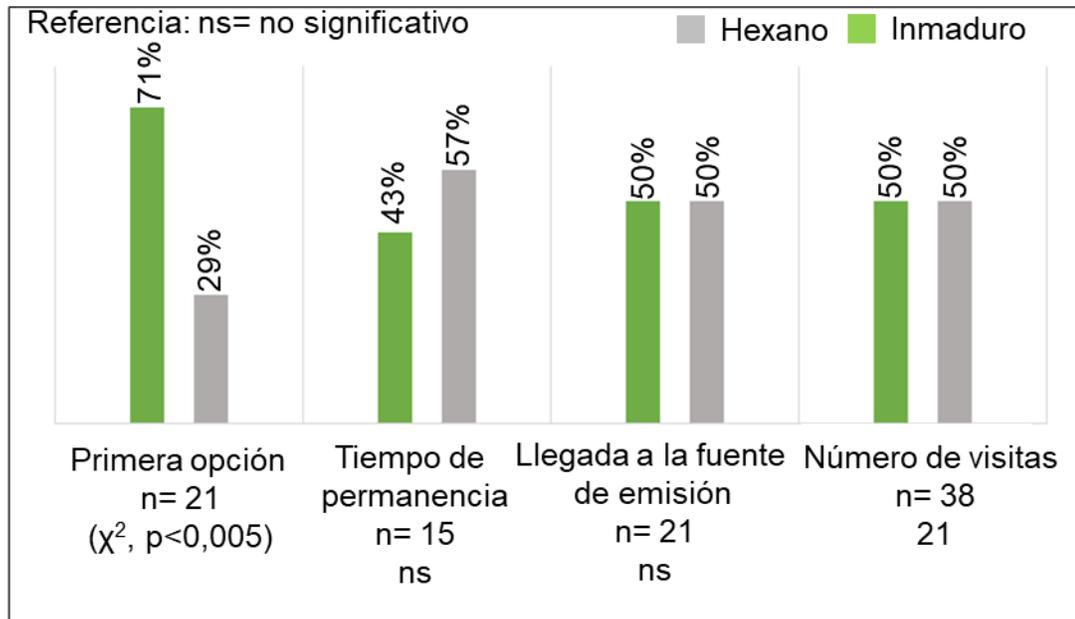
Compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro (barras amarillas) contra control (hexano, barras grises).

Figura 10. Bioensayo 1.

### 4.2 BIOENSAYO 2: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO INMADURO CONTRA CONTROL

Para este bioensayo se realizaron 114 repeticiones y se obtuvieron 21 respuestas, que se utilizaron luego para las pruebas estadísticas que se

describen a continuación. Las hembras de *A. fraterculus* eligieron mayor número de veces como primera opción el brazo que contenía los compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) respecto al control. Sin embargo, el número de visitas a cada brazo, el tiempo de permanencia y la llegada a la fuente de emisión no mostraron diferencias significativas respecto al control (Figura 11).

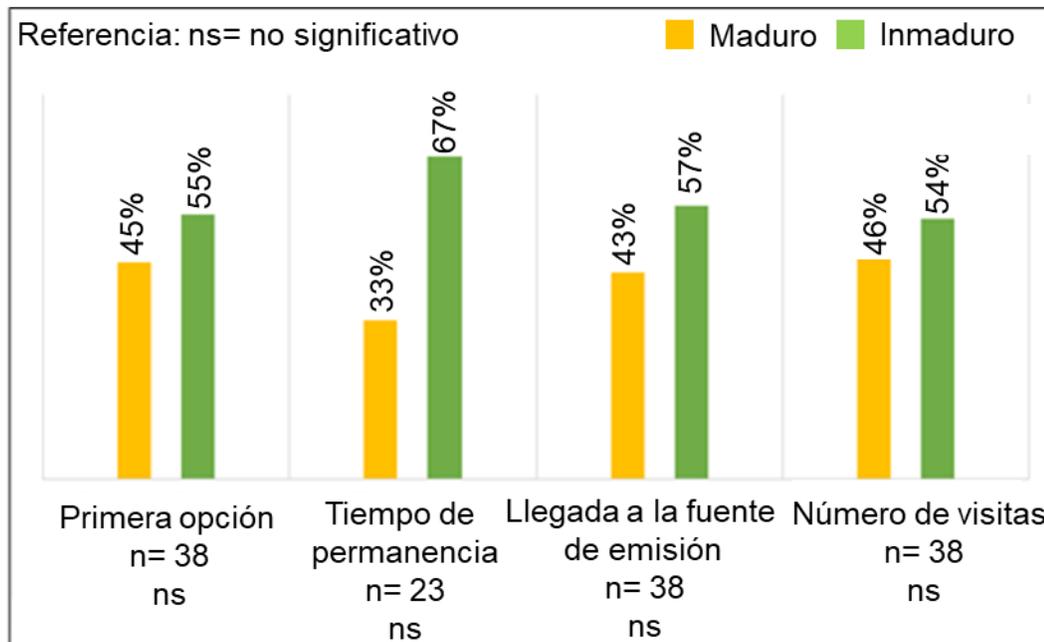


Compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro (barras verdes) contra control (hexano, barras grises).

Figura 11. Bioensayo 2.

#### 4.3 BIOENSAYO 3: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO MADURO CONTRA COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE GUAYABO INMADURO

Para este bioensayo se realizaron 90 repeticiones y se obtuvieron 38 respuestas. Ninguna de las medidas tomadas en este experimento mostraron diferencias significativas; sin embargo, la variable tiempo de permanencia mostró cierta tendencia hacia los compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro (Figura 12).



Compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro (barras amarillas) contra compuestos orgánicos volátiles de guayabo verde (barras verdes).

Figura 12. Bioensayo 3.

#### 4.4 COMPORTAMIENTOS OBSERVADOS EN LOS BIOENSAYOS

A continuación se describen los comportamientos relevantes observados durante los bioensayos. Estas observaciones son de carácter cualitativo y no cuantitativo.

Previo a optar por uno de los brazos del olfatómetro se pudo observar cómo las moscas limpiaban sucesivamente sus antenas con las patas delanteras. Este comportamiento lo realizan para quitar impurezas presentes en las sensilias de sus antenas, las que impiden recibir correctamente las señales químicas de su entorno (Böröczky et al., 2012). En varias ocasiones se observó cómo tiempo después que las moscas llegaban al estímulo, arrastraban el ovipositor sobre la superficie del olfatómetro. Este comportamiento es similar al que realizan luego de oviponer sobre el fruto de un hospedero, arrastrando el ovipositor y depositando una feromona de marcaje (Aluja et al. 1993, Malavasi y Zucchi 2000). Las hembras que se mostraban más activas durante el tiempo de aclimatación en la extensión de vidrio unida al brazo central del olfatómetro, eran las que respondían normalmente luego en los bioensayos.

## 5. DISCUSIÓN

En los bioensayos de elección realizados, los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros de guayabo mostraron potencial a ser utilizados como claves químicas para *Anastrepha fraterculus* en su búsqueda de hospedero. Potencialmente, los compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro pueden ser más atractivos que los compuestos orgánicos volátiles de guayabo inmaduro, dado que en este último caso, las diferencias con el control fueron menores que con los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros. Para todas las variables medidas, que en su conjunto representan la atracción hacia estos compuestos, solamente los compuestos orgánicos volátiles de guayabo maduro mostraron diferencias significativas respecto al control. Mientras tanto, los compuestos orgánicos volátiles de frutos inmaduros fueron atractivos pero únicamente determinaron una diferencia respecto al control en la primera elección de las hembras, no así en las otras variables estudiadas. Esto sugiere que los compuestos orgánicos volátiles de frutos inmaduros incluyen compuestos que las hembras perciben como claves para encontrar su hospedero, pero no incluyen otros compuestos que en su conjunto conformarían una clave química más completa.

Análogo a los resultados obtenidos en este trabajo, Bisotto (2010), sugiere que las hembras de *A. fraterculus* utilizan los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros de manzanos, durazneros y naranjos como pistas olfativas para localizar sus hospederos. Este autor, obtuvo respuestas electroantenográficas de adultos de *A. fraterculus* al ser expuestos a compuestos orgánicos volátiles de frutos (manzanas, duraznos y naranjas) con diferentes grados de maduración. A su vez, los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros obtuvieron respuestas significativamente mayores con respecto a los compuestos orgánicos volátiles de frutos inmaduros. Además, los insectos utilizados eran originarios del Sur de Brasil, donde predomina el morfotipo 1 de *A. fraterculus*, probablemente el mismo morfotipo presente en Uruguay.

En el mismo sentido, dentro del género *Anastrepha*, Cruz-López et al. (2006), demostraron que tanto hembras como machos de *A. obliqua* eran atraídos hacia compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros de *Spondias mombin* L. en ensayos realizados en túnel de viento, con respecto a un control. Además, observaron comportamientos asociados a la oviposición, entre otros, y sugieren para estudios posteriores determinar si están usando estos compuestos orgánicos volátiles como pistas para encontrar su hospedero para oviponer, encontrar alimento o buscar pareja. Por su parte Rasgado et al. (2009), demostraron que ambos sexos de *A. ludens* eran más atraídos hacia compuestos orgánicos volátiles de frutas verdes (maduras fisiológicamente) de

*Citrus aurantium* que a compuestos orgánicos volátiles de frutas amarillas (maduras comercialmente) de *C. aurantium*, en bioensayos realizados en túnel de viento. Suponen que esto se debe a que en la naturaleza las hembras de *A. ludens* oviponen mayormente sobre frutas verdes (maduras fisiológicamente), sugiriendo nuevamente que estos compuestos orgánicos volátiles pueden servir de pistas para encontrar su hospedero.

Dentro de otro género perteneciente a los tefrítidos, se encontraron también resultados similares. Siderhurst y Jang (2006), demostraron que los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros de *Terminalia catappa* eran más atractivos para hembras maduras y apareadas de *Bactrocera dorsalis* que para hembras inmaduras y vírgenes tanto en ensayos de túnel de viento como en ensayos con olfatómetro. Según los autores estos resultados se correlacionan con el cambio en el comportamiento que experimentan las hembras maduras, apareadas y prontas para oviponer al responder fuertemente a los compuestos orgánicos volátiles de sus hospederos.

La atracción débil pero significativa de hembras de *A. fraterculus* hacia los compuestos orgánicos volátiles de frutos inmaduros representa un hecho relevante a la hora de diseñar estrategias de control, ya que implica que las hembras de esta especie podrían verse atraídas a los frutos mucho antes del periodo probable de ataque (cercano a la maduración). De este resultado surgen interrogantes que podrán ser contestadas en estudios posteriores. Por ejemplo: ¿son capaces las hembras de *A. fraterculus* de infestar guayabos inmaduros?, ¿es una estrategia de adaptación frente a competidores más prolíficos como *Ceratitidis capitata*?, ¿se deben controlar antes las poblaciones de *A. fraterculus* en el caso del guayabo?. En relación a estas interrogantes, los autores Díaz-Santiz et al. (2015), encontraron que las hembras de *A. seriata*, tanto apareadas como vírgenes, eran más atraídas hacia trampas de tipo McPhail cebadas con compuestos orgánicos volátiles de frutos inmaduros de *Psidium guajava* y *Citrus sinensis* L., que hacia trampas McPhail sin cebar. En el caso de las hembras apareadas, la atracción se puede explicar por la búsqueda de un hospedero para oviponer. En el caso de las hembras vírgenes, la explicación resulta más difícil, siendo una posibilidad que las hembras busquen un lugar para aparearse, ya que el llamado de apareamiento de los machos en estas especies ocurre sobre los hospederos.

Al comparar ambas mezclas de volátiles, en forma contrapuesta en un mismo bioensayo, ninguna de las variables estudiadas mostró diferencias significativas. Este resultado puede deberse a que el bioensayo utilizado no es suficientemente discriminatorio para dos claves químicas que si bien son diferentes, ambas presentan cierto grado de atracción. En este sentido, es posible que experimentos complementarios, por ejemplo de capturas en campo,

muestren diferencias no observadas en los ensayos. Análogamente, Biasazin et al. (2014), en bioensayos realizados en un olfatómetro de 2 vías en forma de Y, encontraron resultados similares al evaluar la respuesta de hembras de *Bactrocera invadens* a volátiles de frutos maduros e inmaduros de mango (*Magnifera indica*) y banana (*Mussa* spp. var. *Granny*). Los autores consideran que la falta de discriminación sobre la madurez de los frutos de banana y mango de *B. invadens* puede deberse a lo que ellos consideraron como maduro e inmaduro, un factor no relevante para los ensayos realizados en esta tesis, ya que se usaron compuestos orgánicos volátiles que mostraron diferencias cuando fueron analizados químicamente (resultados no incluidos en esta tesis).

## 6. CONCLUSIONES

Las hembras apareadas de *Anastrepha fraterculus* fueron atraídas hacia los compuestos volátiles de frutos maduros de guayabo (*Acca sellowiana*), posiblemente utilizándolos como pistas para encontrar su hospedero.

Las moscas son también atraídas, aunque en menor medida, hacia los compuestos volátiles de guayabo inmaduro.

Las dos mezclas de compuestos volátiles evaluadas no mostraron diferencias en cuanto a la atracción de hembras cuando fueron ensayadas en forma contrapuesta.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los compuestos volátiles orgánicos emitidos por frutos de un hospedero nativo de *A. fraterculus* podrían resultar atractivos de hembras, y potencialmente podrían ser utilizados como cebos en trampas de monitoreo o control.

## 7. RESUMEN

El guayabo del país (*Acca sellowiana*) es un hospedero nativo de *Anastrepha fraterculus* en el Uruguay. Entender cómo las hembras de *A. fraterculus* seleccionan a su hospedero para oviponer, particularmente a través de señales químicas, puede resultar en el desarrollo de nuevas herramientas de manejo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de los compuestos volátiles orgánicos (VOCs) emitidos por frutos de *A. sellowiana*, como atrayentes para las hembras de *A. fraterculus*. Frutos maduros e inmaduros fueron colectados en la Estación Experimental de INIA Las Brujas. Los frutos fueron llevados inmediatamente al laboratorio, contados, pesados, y sus compuestos orgánicos volátiles fueron muestreados durante 24 horas mediante una corriente de aire, usando Haysep-Q como adsorbente. Los volátiles retenidos fueron eluidos con hexano (1 mL). Las hembras de *A. fraterculus* utilizadas en los bioensayos se obtuvieron a partir de frutos infestados con larvas, tanto de hospederos nativos como cultivados. Las hembras alcanzaron la madurez sexual y tuvieron las condiciones para copular. Para evaluar la respuesta de hembras de *A. fraterculus* a los compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros e inmaduros, se realizaron ensayos con olfatómetro de dos vías con el extracto aplicado en papel de filtro. En los bioensayos las hembras de *A. fraterculus* prefirieron el extracto de compuestos orgánicos volátiles cuando se lo ensayó contra un papel de filtro con hexano como control, independientemente de la madurez de la fruta ( $X^2$ ,  $p < 0.05$ ). Cuando los extractos de compuestos orgánicos volátiles de frutos maduros e inmaduros fueron ensayados simultáneamente como estímulos, no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados sugieren que los compuestos orgánicos volátiles de los frutos proporcionan a las hembras de *A. fraterculus* señales que permiten localizar su hospedero. Palabras clave: moscas de la fruta, guayabo del país, semioquímicos.

Palabras clave: Moscas de la fruta; Guayabo del país; Semioquímicos.

## 8. SUMMARY

The pineapple guava (*Acca sellowiana*) is a native host of *Anastrepha fraterculus* in Uruguay. Understanding how *A. fraterculus* females select their hosts for oviposition, in particular regarding volatile chemical cues, may result in new alternative management tools. The objective of this study was to evaluate the potential of volatile organic compounds (VOCs) emitted by *A. sellowiana* fruits, as attractants for *A. fraterculus* females. Mature and immature fruits were collected at the INIA Las Brujas Experimental Station. The fruits were taken immediately to the laboratory, counted, weighed, and their VOCs were sampled for 24 hours by an air current, using Haysep-Q as an adsorbent. The retained volatiles were eluted with hexane (1 mL). Females of *A. fraterculus* used in the bioassays were obtained from fruits infested with larvae, both from native and cultivated hosts. The females reached sexual maturity and had the conditions to copulate. To test the behavioral response of *A. fraterculus* females towards VOCs from unripe and ripe fruits, Y-tube olfactometer tests were conducted with VOC extracts applied on filter paper. In behavioral bioassays, *A. fraterculus* females preferred VOCs extracted from either of the two host fruits when tested against a control (hexane-treated filter paper), regardless of fruit maturity ( $X^2$ ,  $p < 0.05$ ). When extracts of VOCs of mature and immature fruits were tested simultaneously as stimuli, no significant differences were found. These results suggest that fruit VOCs may provide *A. fraterculus* females with cues for host location.

Key words: Fruit flies; Pineapple guava; Semiochemicals.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aluja, M.; Jácome, I.; Birke, A.; Lozada, N.; Quintero, G. 1993. Basic Patterns of behavior in wild *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) flies under field-cage conditions. *Annals of the Entomological Society of America*. 86(6): 776-793.
2. Anaya, A. L. 2003. *Ecología química*. San Rafael, Plaza y Valdés. 352 p.
3. Bentancourt, C. M.; Scatoni, I. B. 2010. *Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay*. 3a. ed. rev. y ampl. Montevideo, Hemisferio Sur. 582 p.
4. Bisazin, D.; Karlsson, F.; Hillbur, Y.; Seyoum, E.; Dekker, T. 2014. Identification of host blends that attract the african invasive fruit fly, *Bactrocera invadens*. *Journal of Chemical Ecology*. 40(9): 966-976.
5. Bisotto, R. B. 2010. *Sensilas antenais de Anastrepha fraterculus (Diptera, Tephritidae) e repostas a voláteis de frutíferas, substâncias sintéticas e a produtos fitossanitários utilizados na produção orgânico*. Tesis de doctorado. Porto Alegre, Universidad Federal de Río Grande do Sul. Facultad de Agronomía. 88 p.
6. Boller, E. F. 1981. Oviposition-detering pheromone of the european cherry fruit fly: status of research and potential applications. In: Everett, R. M. ed. *Management of insect pests with semiochemicals*. Boston, Springer. pp. 457-462.
7. Böröczky, K.; Wada-Katsumata, A.; Batchelor, D.; Zhukovskaya, M.; Coby, S. C. 2012. Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(9): 3615-3620.
8. Brussa, C. A.; Grela, I. A. 2007. *Flora arbórea del Uruguay: con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. Rivera, COFUSA. 544 p.
9. CABI (Centre for Agricultural Bioscience International, UK). 2019. *Invasive Species Compendium. Anastrepha fraterculus data sheet*. (en línea). Wallingford. s.p. Consultado feb. 2019 Disponible en <https://www.cabi.org/ISC/datasheet/5648>

10. Christenson, L. D.; Foote, H. R. 1960. Biology of fruit flies. Annual Review of Entomology. 5(1): 171-192.
11. Cracco, P.; Muñoz, J. 2005. Flora indígena del Uruguay: árboles y arbustos ornamentales. 2a. ed. rev. y ampl. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 320 p.
12. Cruz-López, L.; Malo, E. A.; Toledo, J.; Virgen, A.; Del Mazo, A.; Rojas, J. 2006. A new potential attractant for *Anastrepha obliqua* from *Spondias mombin* fruits. Journal of Chemical Ecology. 32(2): 351-365.
13. Delgado, S.; Calvo, M. V.; Araújo, E.; Duarte, F.; Lorenzo, M. E.; Techeira, W.; Zefferino, E.; Asplanato, G.; García, F.; Scatoni, I. B. 2014. Hospederos de las mosca de la frutas, *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), en Uruguay. In: Simposio Nacional (4º), Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus (1º., 2014, Salto, Uruguay). Trabajos presentados. Salto, Facultad de Agronomía. pp. 1-4.
14. Díaz, F.; Castrejón, V. R. 2012. El papel de los semioquímicos en el manejo de las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). In: Rojas, J. C.; Malo, E. A. eds. Temas selectos en ecología química de insectos. Tapachula, El Colegio de la Frontera Sur. pp. 401-426.
15. Díaz-Santiz, E.; Rojas, J. C.; Cruz-López, L.; Hernández, E.; Malo, E. A. 2015. Olfactory response of *Anastrepha seriata* to guava and sweet orange volatiles. Insect Science. 23(5): 1-8.
16. Dicke, M.; Sabelis M. W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. Functional Ecology. 2(2): 131-139.
17. \_\_\_\_\_; Van Beek, T. A.; Posthumus, M. A.; Ben Dom, N.; Van Bokhoven, H.; De Groot, A. E. 1990. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions involvement of host plant in its production. Journal of Chemical Ecology. 16(2): 383-396.
18. FAO (Food and Agriculture Organization, IT). 1989. Avances en las investigaciones sobre moscas de las frutas en el litoral del Río Uruguay. Montevideo, MGA. 15 p.

19. Fischer, G. D.; Miranda, G.; Mazorra, M. 2003. Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (*Acca sellowiana* Berg). Bogotá, Produmedios. 115 p.
20. Goane, L.; Pereyra, P. M.; Castro, F.; Ruiz, M. J.; Juárez, M. L.; Segura, D. F.; Vera, M. T. 2018. Yeast derivatives and wheat germ in the adult diet modulates fecundity in a tephritid pest. (en línea). Bulletin of Entomological Research. 108(3): 1-13. Consultado dic. 2018. Disponible en <https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/yeast-derivatives-and-wheat-germ-in-the-adult-diet-modulates-fecundity-in-a-tephritid-pest/8EEE163A2082365BE6F62D3C5448307E>
21. Heath, R. R.; Epsky, N. D. 1993. Recent progress in the development of attractants for monitoring the mediterranean fruit fly and several *Anastrepha* species. In: Management of insect pests: nuclear and related molecular and genetic techniques. Vienna, IAEA. pp. 463-472.
22. Hernández-Ortiz, V.; Bartolucci, A. F.; Morales-Valles, P.; Frías, D.; Denise Selivon, D. 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of south american morphotypes. Annals of the Entomological Society of America. 105(2): 305-318.
23. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 2000. Nuestros frutos nativos. (en línea). INIA. Ficha temática no. 1. 2 p. Consultado may. 2018. Disponible en <http://www.inia.org.uy/online/site/web/articulos/Ficha%201%20Gua%20yabo%20del%20pais.pdf>
24. Jacobson, M.; Ohinata, K.; Chambers, D. L.; Jones, W. A.; Fujimoto, M. S. 1973. Isolation, identification, and synthesis of sex pheromones of the male Mediterranean fruit fly. Journal of Medicinal Chemistry. 16(3): 248-251.
25. Law, J. H.; Regnier, F. E. 1971. Pheromones. Annual Review of Biochemistry. 40(1): 533-548.
26. Legrand, D. 1968. Las mirtáceas del Uruguay, III. Boletín Facultad de Agronomía (Montevideo). Boletín no. 101. 80 p.

27. Malavasi, A.; Zucchi, R. A. 2000. Moscas das frutas de importância econômica no Brasil. Ribeirão Preto, Brasil, Holos Editora. 325 p.
28. MGA. DSV (Ministerio de Ganadería y Agricultura. Departamento de Sanidad Vegetal, UY). 1964. Contralor de las “moscas de las frutas” con pulverizaciones aéreas en la ciudad de Salto y sus alrededores. Montevideo. 23 p.
29. MGAP. DGSSAA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas, UY). 2017. Sistema de certificación de fruta cítrica anexos 4 y 5. Montevideo. 76 p.
30. \_\_\_\_\_. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2015. Anuario estadístico agropecuario 2015. Montevideo. 215 p.
31. OIEA (Organización Internacional de Energía Atómica, AT). 2005. Guía para el trampeo en programas de control de la mosca de la fruta en áreas amplias. Viena. 47 p.
32. Rasgado, A. M.; Malo, E. A.; Cruz-López, L.; Rojas, J. C.; Toledo, J. 2009. Olfactory response of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to *Citrus aurantium* volatiles. Journal of Economic Entomology. 102(2): 585 – 594.
33. Roitberg, B. D.; Prokopy, R. J. 1983. Host deprivation influence on response of *Rhagoletis pomonella* to its oviposition deterring pheromone. Physiological Entomology. 8(1): 69-72.
34. Rojas, J. C.; Malo, E. A. 2012. Temas selectos de ecología química de insectos. Tapachula, El Colegio de la Frontera Sur. 446 p.
35. Rupavatharam, S.; East, A.; Heyes, J. A. 2015. Re-evaluation of harvest timing in ‘Unique’ feijoa using 1-MCP and exogenous ethylene treatments. Postharvest Biology and Technology. 99(1): 152 - 159.
36. Santos, K. L.; Steiner, N.; Ducroquet, J. P. H. J.; Guerra, M. P.; Nodari, R. O. 2005. Domesticação da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) no sul de Brasil. Agrociencia. 19(2): 29-33.
37. Siderhurst, M. S.; Jang, E. B. 2006. Attraction of female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, to *Terminalia catappa* fruit extracts in wind

tunnel and olfactometer tests. Formosan Entomologist. 26(1): 45-55.

38. Steiner, L. F.; Mitchell, W. C.; Harris, E. J., Kozuma, T. T.; Fujimoto, M. S. 1965. Oriental fruit fly eradication by male annihilation. Journal of Economic Entomology. 58(5): 961-964.
39. Steinmann, A.; Bonatto, F. 2015. Ecología comportamental: una introducción al estudio del comportamiento animal. 2ª. ed. de Río Cuarto, Argentina, UniRio. 258 p.
40. Thorp, T. G.; Klein, J. 1987. Export feijoas: post-harvest handling and storage techniques to maintain optimum fruit quality. The Orchardist of New Zealand. 60(5): 164-166.
41. Trujillo Peluffo, A. 1942. Estudio de la mosca de la fruta desde su aparición en nuestro medio. Ministerio de Ganadería y Agricultura. Boletín no. 103. 32 p.
42. Uchôa, M. 2012. Fruit flies (Diptera: Tephritoidea): biology, host plants, natural enemies, and the implications to their natural control. In: Larramendy, M.; Soloneski, S. eds. Integrated pest management and pest control – current and future tactics. La Plata, IntechOpen. pp. 217-300.
43. Vignale, B.; Bisio, L. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. Agrociencia (Uruguay). 9(2): 35-39.
44. Villalobos J.; Flores S.; Liedo, P.; Malo E. A. 2017. Mass trapping is as effective as ground bait sprays for the control of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) fruit flies in mango orchards. Pest Management Science. 73(10): 2105-2110.
45. Vitaluña, J.; Sandoval, D.; Trigero, J. 2010. Manejo y control de moscas de la fruta. Quito, Agrocalidad. 146 p.