

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACEITES ESENCIALES COMO AGENTES SEMIOQUÍMICOS
DE DIFERENTES COMPORTAMIENTOS PLAUSIBLES DE
CONTROL DE LA MOSCA DE LOS FRUTOS *Ceratitis*
capitata WIEDEMANN**

Lic. Flavia Jofré Barud

Directora: Dra. María Liza López

Instituto de Biotecnología – Facultad de Ingeniería – UNSJ



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2018

COMISIÓN ASESORA

DRA MARÍA LIZA LÓPEZ. Lugar de trabajo: Estación Experimental Agropecuaria San Juan del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

DRA. ERIKA BANCHIO. Lugar de Trabajo: Dpto. Biología Molecular - Lab. 10. Universidad Nacional de Río Cuarto.

DRA. MARÍA PAULA ZUNINO. Lugar de trabajo: Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales. IMBIV-CONICET. Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

Firma: Aclaración:

A mi nona, Irma

A mi madre, Juana Iris

A mi hermano, mi mano derecha, Juan José

“La incondicionalidad es la virtud más
extraordinaria de una persona”

Agradecimientos

De manera muy especial, agradezco a mi directora de tesis Dra. María Liza López, por confiar en mí para llevar a cabo este trabajo. Gracias por tus enseñanzas, tu dedicación y sobre todo por mostrarme y demostrarme que todo se puede lograr, sólo hay que pensarlo.

A todos los que compartimos intereses y estudios de moscas de los frutos. Especialmente a Jose y Tere, gracias por sus aportes y predisposición desmedida; y a Guille, gracias por tus consejos y predisposición. A todos los integrantes de la de la cátedra de Terapéutica Vegetal de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la Beca Doctoral para poder realizar mi trabajo de tesis doctoral.

A las entidades que financiaron los proyectos en el marco de los cuales se desarrolló el presente trabajo de tesis: 1. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Presidencia de la Nación; 2. Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación, Gobierno de San Juan; 3. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación; 4. Universidad Nacional de San Juan.

A la Dirección de Sanidad Vegetal, Animal y Alimentos, Gobierno de San Juan. Al personal del Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de los Frutos (PROCEM-San Juan), del Instituto de Calidad y Sanidad Agroalimentaria de la provincia de Mendoza (ISCAMen) y del Instituto Ewald A. Favret, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria que ayudaron en la logística en los ensayos de apareamiento. A la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan donde realicé los últimos ensayos de la tesis.

A los miembros de mi comisión asesora que me guiaron en esta experiencia y sus valiosos aportes, que han enriquecido y mejorado este trabajo.

A todas las personas que trabajan en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan.

Gracias a mis padres y hermanos que siempre me alentaron y me han hecho la persona que soy.

A mi familia y a mis amigos, que me han acompañado a lo largo de todo el recorrido, gracias por su apoyo y la confianza que demuestran tener en mí.

A mis compañeras de aventuras, María Pía y Ceci. Gracias por siempre estar cada vez que las necesite.

A mi amor. Gracias por acompañarme y apoyarme para finalizar esta etapa.

Agradezco muchísimo a todas aquellas personas que de alguna manera participaron en la realización de esta tesis y me brindaron su apoyo para poder llegar a la meta.

... sólo lo impensado es imposible...

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN _____	14
SUMMARY _____	17
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL _____	20
I. Introducción general. _____	21
1.1. Producción frutícola en Argentina _____	21
1.2. Moscas de los frutos: Plaga cuarentenaria presente en Argentina _____	22
1.3. <i>Ceratitis capitata</i> _____	23
1.3.1. Descripción del adulto _____	23
1.3.2. Ciclo de vida _____	24
1.4. Estrategias de control en Argentina: Manejo Integrado de Plagas (M.I.P.) __	25
1.4.1. Control químico _____	27
1.4.2. Control cultural y mecánico _____	27
1.4.3. Técnica del Insecto Estéril (T.I.E.) _____	28
1.4.4. Sistema de cuarentena: barreras fitosanitarias _____	28
1.5. Métodos alternativos de lucha contra plagas _____	28
II. <i>Aceites esenciales.</i> _____	30
1.6. Aceites esenciales (AEs): Definición _____	30
1.7. Aceites esenciales y actividad biológica sobre insectos plaga. _____	31
1.7.1. Antecedentes _____	31
1.7.2. Antecedentes de las especies botánicas elegidas _____	33
1.8. Objetivo general _____	35
1.8.1. Objetivos específicos _____	35
CAPITULO II: RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE <i>C. CAPITATA</i> FRENTE A LOS ACEITES ESENCIALES: ATRACCIÓN _____	36
2.1. Introducción _____	37

2.2.	Hipótesis _____	41
2.3.	Objetivos específicos: _____	41
2.4.	Materiales y métodos _____	42
2.4.1.	Material vegetal _____	42
2.4.2.	Obtención y análisis químico de los aceites esenciales _____	42
2.4.3.	Material biológico _____	43
2.4.4.	Ensayo biológico en laboratorio: Y-olfatómetro _____	44
2.4.4.1.	Análisis estadístico de los datos. _____	45
2.4.5.	Ensayo biológico bajo condiciones de semi-campo _____	45
2.4.6.	Análisis estadístico de datos _____	46
2.5.	Resultados _____	47
2.5.1.	Composición de los aceites esenciales de las especies <i>Baccharis spartioides</i>, <i>Schinus areira</i> y <i>S. polygama</i>. _____	47
2.5.2.	Respuesta olfatoria de adultos de <i>C. capitata</i> a los aceites esenciales: Ensayos de laboratorio. _____	49
2.5.3.	Respuesta olfatoria de adultos de <i>C. capitata</i> a los aceites esenciales: Ensayos de semicampo. _____	53
2.6	Discusión _____	54
2.7	Conclusiones _____	57
CAPÍTULO III: RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE <i>C. CAPITATA</i> FRENTE A LOS ACEITES ESENCIALES: APAREAMIENTO Y OVIPOSICIÓN _____		58
3.1.	Introducción _____	59
3.1.1.	Comportamiento sexual de la mosca de la fruta _____	59
3.1.2.	Técnica del Insecto Estéril (TIE) _____	61
3.2.	Hipótesis _____	65
3.3.	Objetivos específicos: _____	65

I. Evaluación de la influencia de los aceites esenciales de <i>B. spartioides</i>, <i>S. areira</i> y <i>S. polygama</i> sobre el éxito de apareamiento de <i>C. capitata</i>.	66
3.4. Materiales y métodos	66
3.4.1. Evaluación de los aceites como estimuladores de la persuasión sexual de machos sobre hembras	66
3.4.1.1. Ensayos de competitividad en laboratorio.	66
3.4.1.1.1. Material biológico	66
3.4.1.1.2. Tratamientos	67
3.4.1.1.3. Diferenciación de los machos	68
3.4.1.1.4. Exposición a los aceites	68
3.4.1.1.5. Ensayo de apareamiento	69
3.4.1.1.6. Análisis de datos	70
3.4.1.2. Ensayos de competitividad en jaulas de campo: macho estéril vs macho fértil.	70
3.4.1.2.1. Material biológico	70
3.4.1.2.2. Tratamientos	71
3.4.1.2.3. Ensayo de apareamiento	71
3.4.1.2.4. Análisis de datos	72
3.4.1.3. Ensayos de competitividad en jaulas de campo: macho estéril vs macho silvestre.	73
3.4.1.3.1. Material biológico	73
3.4.1.3.2. Tratamientos	73
3.4.1.3.3. Diferenciación de machos	74
3.4.1.3.4. Ensayo de apareamiento	74
3.4.1.3.5. Análisis de datos	76
3.5. Resultados	77

3.5.1. Ensayos de competitividad en laboratorio: estéril vs fértil.	77
3.5.2. Ensayos de competitividad en jaulas de campo, estéril vs fértil	78
3.5.3. Ensayos de competitividad en jaulas de campo: estéril vs silvestre	81
3.6. Discusión	83
II. Evaluación de la influencia de los aceites esenciales como estimulantes o disuasivos de la oviposición de las hembras.	87
3.7 Materiales y métodos	87
3.7.1 Evaluación a distancia del estímulo químico: ensayo en Y- olfatómetro.	87
3.7.1.1. Material biológico	87
3.7.1.2. Ensayo biológico	87
3.7.1.3. Análisis estadísticos de los datos	87
3.7.2 Ensayo de oviposición en sustrato artificial: domos de agar	88
3.7.2.1 Metodología	88
3.7.2.2 Ensayo de oviposición	88
3.7.2.3 Análisis de datos	89
3.7.3 Ensayo de oviposición en fruta: uvas tratadas superficialmente	89
3.7.3.1 Metodología:	89
3.7.3.2 Ensayo de oviposición sin elección:	90
3.7.3.3 Ensayo de oviposición “dual-choice”	90
3.7.3.3.1 Análisis de datos	91
3.8 Resultados	92
3.8.1 Evaluación a distancia del estímulo químico: ensayo en Y- olfatómetro.	92
3.8.2 Ensayo de oviposición en sustrato artificial: domos de agar	93
3.8.3 Ensayo de oviposición en sustrato natural: uvas	95
3.8.3.1 Ensayo de oviposición sin elección	95

3.8.3.2	Ensayo de oviposición “dual-choice”	96
3.9	Discusión	97
3.10	Conclusiones	101
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIONES		102
BIBLIOGRAFÍA		105
ANEXO		118

Lista de figuras

Figura 1. A. Hembra y B. Macho de <i>C. capitata</i> , donde puede observarse su marcado dimorfismo sexual.	24
Figura 2. Ciclo de vida de <i>C. capitata</i>	25
Figura 3. Destilador de arrastre por atrastre con vapor con trampa tipo Clevenger.	42
Figura 4. Acondicionamiento secuencial de los individuos de <i>C. capitata</i> . A. Fruta larvada. B. Cámara de emergencia de adultos. C. Cámara de mantenimiento con dieta y agua.....	44
Figura 5. Y-olfatómetro.....	45
Figura 6. A. Jaulas de tul colgadas B. Individuos sobre la fuente	46
Figura 7. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>B. spartioides</i>	48
Figura 8. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>S. areira</i>	48
Figura 9. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>S. polygama</i>	49
Figura 10. Porcentaje de respuesta realizada por machos y hembras para los distintos tratamientos.....	50
Figura 11. Proporción de respuestas de machos (A) y hembras (B). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.	51
Figura 12. Machos de <i>C. capitata</i> marcados con pintura de color para reconocer el tratamiento aplicado en los ensayos de apareamiento.....	68
Figura 13. Sistema de exposición a los volátiles de los AEs.	69
Figura 14. Recipientes utilizados para el ensayo de apareamiento, donde se pusieron a competir un macho estéril frente a un macho fértil por una hembra fértil.	69
Figura 15. A. Jaulas de campo dispuestas a la intemperie. B. Individuos en cópula.	72
Figura 16. Machos de <i>C. capitata</i> diferenciados por suministro de dieta coloreada para reconocer el tratamiento aplicado en los ensayos de apareamiento.....	74
Figura 17. A. Planta de limón dentro una la jaula. B. Cópulas en la cara inferior de la hoja. C. Macho llamando (emitiendo feromona).....	75
Figura 18. Porcentaje de cópulas para cada tipo de macho. En todos los casos el porcentaje de cópulas esperado por azar para cada tipo de macho es 50%.....	79
Figura 19. Porcentaje de cópulas obtenidas por los diferentes machos en el árbol en relación a las combinaciones ensayadas.....	80
Figura 20. Proporción de cópulas logradas por el macho <i>tsl</i> en relación al total de cópulas (RSI) en los tratamientos con aceites esenciales de especies nativas y Jengibre (Media \pm error estándar). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).	81

Figura 21. Porcentaje de cópulas obtenidas por los machos <i>tsl</i> sobre el árbol en los tratamientos probados.	83
Figura 22. A. vista superior del recipiente donde se dispuso el domo de agar (color amarillo) como sustrato de oviposición. B. Domo de agar con huevos depositados.	89
Figura 23. A. Recipientes de oviposición. B. Uva montada bajo lupa esteroscópica. C. huevos depositados en una postura.....	91
Figura 24. Porcentaje de respuesta obtenido para las hembras grávidas frente a los diferentes tratamientos.....	92
Figura 25. A. Número de huevos (media \pm EE) para cada concentración evaluada (gráfico izquierdo) y porcentaje de infestación (gráfico derecho) para el tratamiento de <i>S. areira</i>	93
Figura 26. Número de huevos (media \pm EE) para cada concentración evaluada (gráfico izquierdo) y porcentaje de infestación (gráfico derecho) para el tratamiento de <i>S. polygama</i>	94
Figura 27. Número de huevos (media \pm EE) depositados en sustratos artificiales tratados con los AE de <i>S. areira</i> y <i>S. polygama</i>	94
Figura 28. Porcentaje de infestación en uvas tratadas con 0 ppm (control), 4000 ppm (alta) y 400 ppm (baja) de <i>S. areira</i>	95
Figura 29. Ensayo de elección simple. Gráfico de cajas y bigotes para el número de huevos depositados por las hembras en las uvas, en los distintos tratamientos de concentración del AE de <i>S. areira</i> . Letras distintas indican diferencias significativas.	96
Figura 30. Ensayos “dual-choice”. Gráfico de cajas y bigotes para número de huevos depositados en uvas en los tratamientos de concentración del AE de <i>S. areira</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas.	97

Lista de tablas

Tabla 1. Porcentaje del área ocupada por los distintos grupos químicos en los aceites esenciales estudiados. _____	47
Tabla 2. Proporción de respuesta (media \pm error estándar, N) de machos y hembras de <i>C. capitata</i> frente a los 3 aceites evaluados. _____	50
Tabla 3. Tiempo promedio de permanencia de individuos silvestres de <i>C. capitata</i> en cada rama del Y-olfatómetro frente a los compuestos volátiles de los aceites esenciales de <i>B. spartioides</i> , <i>S. areira</i> y <i>S. polygama</i> _____	52
Tabla 4. Frecuencia de elecciones en el Y-olfatómetro frente al estímulo químico de los volátiles de los aceites esenciales de <i>B. spartioides</i> , <i>S. areira</i> y <i>S. polygama</i> al comienzo y final del ensayo. __	53
Tabla 5. Frecuencia de elecciones en las jaulas de campo frente al estímulo químico de los volátiles de los aceites esenciales de <i>S. polygama</i> . _____	54
Tabla 6. Características de las cepas con las cuales se trabajó. _____	67
Tabla 7. Combinaciones de aceites, cepas evaluadas y la pregunta asociada _____	67
Tabla 8. Frecuencia de cópulas logradas por machos de <i>C. capitata</i> de diferentes cepas expuestos (Exp) y no expuestos (NoExp) en los diferentes tratamientos con aceites esenciales. _____	77
Tabla 9. Frecuencia de cópulas logradas por machos de <i>C. capitata</i> de la cepa <i>tsl</i> expuestos (Exp) y no expuestos (NoExp) de distinta cepa, en los diferentes tratamientos con aceites esenciales. __	78
Tabla 10. Valores de RSI y ajuste a un modelo mixto para cada combinación de cepas. _____	79
Tabla 11. Ajuste a un modelo mixto para la latencia y duración de las cópulas para las tres combinaciones de cepas con un solo tipo de hembra. _____	80
Tabla 12. Efectos de la exposición a los aceites esenciales sobre el éxito de copula de machos <i>tsl</i> . Tratamientos con repeticiones homogéneas. _____	82
Tabla 13. Respuesta en tiempo de permanencia y frecuencia de distribución en la elección inicial (EI) y en la elección final (EF) de las hembras grávidas en el Y-olfatómetro frente a los volátiles de los aceites de <i>B. spartioides</i> , <i>S. areira</i> y <i>S. polygama</i> . _____	93

Listado de acrónimos y abreviaturas

- ∅ °C: grados centígrados
- ∅ **AE:** aceite esencial
- ∅ **AEs:** aceites esenciales
- ∅ **CG-EM:** cromatografía gaseosa – espectrometría de masas
- ∅ **cm:** centímetro
- ∅ **conc.:** Concentración
- ∅ **EAG:** electroantenografía
- ∅ **EE:** Error Estándar
- ∅ **g:** gramo
- ∅ **GRO:** *Ginger root oil*
- ∅ **h:** Hora
- ∅ **ISCAMEN:** Instituto de Sanidad y Calidad Agropecuaria de Mendoza
- ∅ **Km²:** kilómetro cuadrado
- ∅ **m:** minutos
- ∅ **MIP:** Manejo Integrado de Plagas
- ∅ **mL:** mililitro
- ∅ **ProCEM:** Programa de Control y Erradicación de la Mosca de los Frutos
- ∅ **RSI:** *Relative Sterile Index*
- ∅ **s:** segundos
- ∅ **SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- ∅ **TIE:** Técnica del Insecto Estéril
- ∅ **TML:** trimedlure.
- ∅ **tsl:** *Thermo Sensitive Lethal*
- ∅ **UNT:** Universidad Nacional de Tucumán
- ∅ **vs:** versus
- ∅ **Y-olf:** Y-olfatómetro
- ∅ **µg:** microgramo
- ∅ **µL:** microlitro

RESUMEN

En Argentina se encuentra presente la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) considerada una de las plagas más importantes para la producción frutihortícola. El daño causado por la mosca resulta de la oviposición de la hembra en la fruta, dentro de la cual se desarrolla la larva. Este desarrollo está asociado con un rápido deterioro de la fruta y una gran pérdida de la cosecha, se estima entre un 15 y 20% de la producción general anual. La sola presencia de estos insectos en las regiones frutihortícolas del país representa un impedimento para la exportación de fruta fresca debido a las limitaciones impuestas por países importadores, causando la necesidad de implementación de costosos tratamientos cuarentenarios y programas de monitoreo.

El control de insectos plaga mediante alteraciones comportamentales ha cobrado importancia en las últimas décadas. El uso de compuestos volátiles permite prevenir y controlar daños con un costo ambiental casi nulo. Aunque los estímulos visuales y auditivos han sido utilizados en numerosas ocasiones, el olfato es probablemente la vía más efectiva utilizada a la hora de guiar el comportamiento de un insecto hacia un objetivo específico. En los últimos años, los aceites esenciales (AEs) se han presentado como una potencial alternativa en el control de insectos plaga. Los AEs no sólo pueden ser tóxicos, sino que también pueden actuar a través de efectos subletales provocando cambios en las respuestas de atracción o repelencia, que guían los comportamientos de alimentación y reproducción.

Por otro lado, la técnica del insecto estéril (TIE) es ampliamente utilizada para la erradicación o el control de plagas tefritidas. La TIE se basa en la cría masiva, esterilización y liberación de machos que al copular con hembras salvajes interrumpen el ciclo biológico en la naturaleza. Por razones inherentes a la cría masiva, es que los machos estériles suelen presentar el problema de una disminución en la competitividad sexual frente a los silvestres. En las últimas décadas, la investigación sobre el comportamiento de los insectos criados en masa ha recibido considerable atención. Se avanzó en la búsqueda de nuevas herramientas que permitan una mejora en la competitividad de los machos de moscas de la fruta. Existen antecedentes que la

exposición de machos de algunos tefrítidos a sustancias químicas vegetales influye en su comportamiento sexual.

El objetivo general de esta tesis fue conocer el potencial de los aceites esenciales de plantas nativas de San Juan, como agentes semioquímicos, por medio de la determinación de su influencia sobre comportamientos reproductivos y preferencia en adultos de la Mosca de los Frutos, *C. capitata*.

Se trabajó con las especies *Baccharis spartioides* (Asteraceae), *Schinus areira* (Anacardiaceae) y *Schinus polygama* (Anacardiaceae). Se estudió la composición de los aceites esenciales por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. Del análisis químico se observó que los aceites presentan en su composición compuestos de tipo monoterpenos y sesquiterpenos, que difieren entre los aceites tanto cuali- como cuantitativamente.

De los estudios de preferencia se observó que, en ensayos de olfatometría en laboratorio, los machos de *C. capitata* fueron atraídos por los aceites *B. spartioides* y *S. polygama*, mientras que las hembras mostraron ser atraídas por el aceite de *S. areira*. Por otro lado, en ensayos bajo condiciones seminaturales se observó que los individuos de ambos sexos no respondieron ante el aceite de *S. areira*; por el contrario, los machos mostraron una fuerte atracción hacia el aceite de *S. polygama*; reforzando estos resultados a los obtenidos en los ensayos realizados en el laboratorio.

Se evaluó la influencia de los aceites en los comportamientos reproductivos de apareamiento y oviposición. Se llevaron a cabo ensayos de apareamiento en condiciones de laboratorio y semicampo, donde se evaluó si una exposición previa a los aceites esenciales incrementaba el éxito de apareamiento de machos estériles a la hora de competir con machos fértiles y silvestres por una hembra. Se observó que de los 3 aceites con los que se trabajó el aceite de *S. polygama* siempre tuvo una influencia positiva sobre el éxito de apareamiento de los machos expuestos. Por otro lado, cuando se probó el aceite de *B. spartioides* los resultados no fueron tan contundentes, mostrando sólo en algunos casos una mejora en la competitividad, mientras que la exposición al aceite de *S. areira* no mostró tener una influencia sobre el éxito de apareamiento.

Respecto de la influencia de los aceites sobre el comportamiento de oviposición, la evaluación de este objetivo involucró: evaluación del estímulo químico a larga y corta distancia, en ensayos en Y-olfatómetro, y ensayos de oviposición en diferentes sustratos. De los resultados en cuanto a la evaluación del estímulo químico a distancia, de los 3 aceites ensayados, sólo *S. polygama* mostró ser preferido por las hembras grávidas. Además, se evaluó si las hembras diferían en su comportamiento entre tratamientos cuando percibían el estímulo químico a corta distancia del sustrato de oviposición. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Las hembras pusieron una mayor cantidad de huevos en el sustrato tratado con AE de *S. areira*.

Por otro lado, se realizaron ensayos de oviposición donde se ofrecieron uvas tratadas superficialmente con distintas concentraciones del AE de *S. areira*, se observaron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones evaluadas. Aun así, estos resultados no son contundentes, evaluaciones posteriores son necesarias.

Todo avance en el conocimiento de los factores que modifiquen el comportamiento de *C. capitata* es ventajoso al momento de desarrollar y transferir herramientas que incrementen la eficacia de los métodos de control utilizados contra esta especie. Los comportamientos de atracción y reproducción son componentes claves del ciclo biológico de *C. capitata*, lo que ha validado el desarrollo de cebos para trampas alimenticias y sexuales, la implementación de la técnica del insecto estéril y la búsqueda de atrayentes para hembras grávidas. Esta tesis representa un aporte a dicha búsqueda desde la perspectiva del potencial de los aceites esenciales de especies de la flora nativa, sin perder de vista la plausibilidad de su implementación tecnológica.

SUMMARY

In Argentina, the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) is one of the most important pests affecting fruit and vegetable production. The damage caused by the fruit fly results from the oviposition of the female into the fruit, where the development of the larvae takes place. Larval development is associated with a rapid spoilage of the fruit and a great losses of fruit production; estimated between 15 and 20% of the overall annual production. The mere presence of these insects in horticultural regions of the country represents an obstacle to exportation of fresh fruits due to the limitations imposed by importing countries, which cause costly quarantine treatments and monitoring programs.

The control of insect pests through behavioural alterations has gained importance in recent decades. The use of volatile compounds might be useful in prevention and control of fruit damage with almost no environmental cost. Although visual and auditory stimuli have been used in numerous occasions, olfaction is likely the best guide of insect's behaviour towards a specific target. In recent years, essential oils (EO) represent a potential alternative to the control of insect pests. EOs not only can be toxic but they can also have sub-lethal effects, thus causing changes in attraction or repellence, which guide feeding and reproductive behaviours.

On the other hand, the sterile insect technique (SIT) is used for the eradication or control of tephritid pests. SIT is based on mass rearing, sterilization and release of males that mate with wild females leading to the interruption of the life cycle in nature. For reasons inherent to mass rearing, males usually present a decreased sexual competitiveness over wild males. In recent decades, research on the behaviour of mass-reared insects received considerable attention. Progress has been made in the search for new tools to enhance the sexual competitiveness of fruit fly males. There is evidence that the exposure of males of some tephritids to some plant chemicals influences their sexual behaviour.

The main objective of this doctoral thesis was to know the potential of the essential oils of native plants from San Juan as semiochemical agents, by means of the evaluation of

their influence on reproductive behaviours and of adult's preference of the Mediterranean Fruit Fly, *C. capitata*.

The selected botanical species to work with were *Baccharis spartioides* (Asteraceae), *Schinus areira* (Anacardiaceae) and *Schinus polygama* (Anacardiaceae). The composition of the essential oils was studied by gas chromatography-mass spectrometry. The essential oils showed in their composition, monoterpene and sesquiterpene type compounds, which differed between oils both qualitatively and quantitatively. In olfactometry tests under laboratory conditions, males of *C. capitata* were attracted by the oils of *B. spartioides* and *S. polygama*, while the females were attracted by the oil of *S. areira*. On the other hand, under semi-natural conditions, none of the sexes responded to the oil of *S. areira*; on the contrary, the males showed a strong attraction towards the oil of *S. polygama*; strengthening the results obtained in the tests carried out in the laboratory.

The influence of essential oils on reproductive behaviours, mating and oviposition, were evaluated. Mating tests were carried out in the laboratory and under semi-field conditions. It was evaluated whether a prior exposure to the essential oils conferred some mating success advantage of sterile males when competing with fertile, wild males for a female. It was observed that of the 3 essential oils evaluated, the essential oil of *S. polygama* had a positive influence on the mating success of the exposed males. On the other hand, the effects of the essential oil of *B. spartioides* were not so marked, showing only in some cases an improvement in sexual competitiveness, while the exposure to the essential oil of *S. areira* did not affect mating success.

Regarding the influence of oils on the oviposition behaviour, this objective involved evaluation of long distance chemical stimuli (in Y-tube olfactometer) and short distance stimuli (oviposition tests on different substrates). Regarding the long distance chemical stimuli, of the 3 essential oils tested, only the essential oil of *S. polygama* was preferred by gravid females. In addition, it was evaluated whether the females differed in their behaviour between treatments when they perceived the chemical stimulus at a short distance in the oviposition substrate. No significant differences were found between the concentrations evaluated. Females laid a greater number of eggs on the artificial

substrate treated with the essential oil of *S. areira*.

On the other hand, oviposition tests were carried out with grapes treated superficially with two concentrations of the essential oil of *S. areira*. Significant differences were observed regarding the concentrations evaluated. Even so, these results were not conclusive, subsequent evaluations are necessary.

Any advance in the knowledge of the factors that modify the behaviour of *C. capitata* is advantageous for development of tools and technological implementation to increase the effectiveness of control methods used against this species. Attraction and reproduction are key behaviours of the life cycle of *C. capitata*, which has allowed different bait developments for food and sexual traps, the implementation of the sterile insect technique and the search for attractants of gravid females. This thesis is a contribution to this ambitious task from the perspective of the potential of the essential oils of native species, without losing sight of the feasibility of its technological implementation.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

I. Introducción general.

1.1. Producción frutícola en Argentina

Argentina destina más de medio millón de hectáreas al cultivo de frutales. La superficie de cultivo a lo largo de todo su territorio se encuentra distribuida en diferentes regiones. Desde el año 2002 la producción de frutas ha sufrido un gran impulso llegando a superar los 7 millones de toneladas, las que principalmente corresponden a uva: 3 millones; cítricos: 2,7 millones; frutas de pepita: 1,5 millones; carozos: 400.000 aproximadamente; olivo: 45.000; correspondiendo el resto de la producción a los cultivos tropicales (palta, banana, mango), frutos secos y fruta fina (Idigoras, 2014). En particular, la provincia de San Juan presenta grandes plantaciones de vid, ocupa el primer puesto en la producción de higos, y son de relativa importancia las producciones de damasco (23% del total nacional), melones (22%), membrillo (14%) y en menores cantidades duraznos, ciruelas, manzanas y almendras.

Según Idigoras (2014), el sector frutícola argentino en general presenta antecedentes de operar de manera eficiente la producción, logística, procesamiento y comercialización tanto interna como externa. Esto obliga a poseer un preciso conocimiento de las exigencias oficiales de los países compradores en cuanto a plagas y enfermedades cuarentenarias (identificación, biología, etiología, epidemiología, métodos de diagnóstico y predicción, manejo sanitario), registro y tolerancia de plaguicidas en frutos y productos derivados.

Una exigencia de los países importadores de fruta fresca es la exclusión de plagas exóticas, de potencial importancia económica asociada, que no están presentes aún o no están ampliamente distribuidas en el país importador. Estas plagas son llamadas cuarentenarias ya que se utilizan tratamientos cuarentenarios para desinfectar/desinsectar el producto hospedero de las plagas antes de que los mismos sean movilizados a áreas donde no se encuentran. Garantizar, por lo tanto, la ausencia de riesgo de introducción de plagas es un factor decisivo en el momento de las negociaciones bilaterales (Ruiz et al. 2013).

1.2. Moscas de los frutos: Plaga cuarentenaria presente en Argentina

La producción frutícola de regiones tropicales, subtropicales y templadas se ve afectada por moscas de la fruta pertenecientes a la familia Tephritidae. En América del Sur, se conocen varias especies de “Mosca de la Fruta” (Diptera: Tephritidae), la mayoría de las cuales se incluyen en los géneros *Anastrepha*, *Rhagoletis* y *Toxotrypana* todos endémicos del área. Además, se encuentra presente hace varias décadas, la Mosca del Mediterráneo -*Ceratitis capitata* (Wiedemann)- y la Mosca de la Carambola -*Bactrocera carambolae* Drew y Hancock-, ambas exóticas para el continente (Lobos Aguirre, 1997).

En Argentina, existen dos especies de mosca de los frutos de importancia económica: la mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) y la mosca del Mediterráneo, *C. capitata*. Ambas especies son importantes plagas de una amplia gama de cultivos comerciales de frutas, y limitan severamente la exportación de la fruta debido a las restricciones cuarentenarias. Los niveles de infestación de la fruta por parte de estas dos especies varían entre el 15% y el 20% de la producción de fruta argentina en general, lo que representa una reducción en la ganancia en todo el país de hasta US\$ 90 millones por año (Ovruski y Schliserman, 2012).

Anastrepha fraterculus, es una especie nativa de América del Sur, en Argentina está limitada a las regiones con clima subtropical a templado cálido, se la encuentra principalmente en regiones húmedas del noroeste abarcando las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y La Rioja, y del noreste incluyendo las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Ovruski et al., 2003), aunque también existen poblaciones establecidas en valles irrigados de la región cuyana con clima más templado (Guillén y Sánchez, 2007).

La mosca del Mediterráneo, *C. capitata*, es una especie exótica de la región mediterránea, ha logrado proliferar en las regiones donde hay disponibilidad de frutos susceptibles a su ataque, distribuyéndose de esta manera en casi todo el territorio argentino (Vera et al., 2010; Ovruski et al., 2003).

Estas especies de tefrítidos son polífagas, atacando a varias familias de especies frutales en muchos países. Desde el punto de vista económico, estas especies son consideradas

importantes plagas debido al daño ocasionado tanto directa como indirectamente. En el primer caso, el daño se produce debido al ataque directo al fruto, ya que las hembras depositan sus huevos dentro de la fruta que le servirá de alimento a sus larvas, ocasionando un inminente deterioro del fruto. En el segundo caso, además de los efectos que pudieren tener algunas herramientas usadas para el control de la plaga, como ser intoxicaciones, contaminación ambiental y aparición de nuevas plagas relacionadas al uso recurrente de plaguicidas; se incluyen las limitaciones en la comercialización de los frutos por restricciones cuarentenarias (Guillén y Sánchez, 2007). La sola presencia de estos insectos en las regiones frutihortícolas del país representa un impedimento para la exportación de fruta fresca debido a las limitaciones impuestas por países importadores (Ovruski *et al.*, 2003).

1.3. Ceratitis capitata

El género *Ceratitis* comprende unas 78 especies, algunas de gran importancia económica; la principal es *C. capitata* considerada una de las plagas de mayor importancia para la fruticultura mundial debido a su marcado carácter polífago y cosmopolita. El gran éxito biológico de las moscas, es producto de numerosas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento, que les permiten prosperar en hábitats diferentes (Yuval y Hendrichs, 2001).

Ceratitis capitata es una especie multivoltina, puede tener hasta 7 u 8 generaciones/año, y es altamente polífaga siendo capaz de utilizar por lo menos 250 hospederos diferentes, incluyendo frutas, nueces y verduras (Levinson, *et al.*, 2003; Liquido, *et al.* 1991). Mientras la fruta huésped esté siempre disponible y con condiciones climáticas favorables durante muchos meses, las sucesivas generaciones serán grandes y continuas (Thomas *et al.*, 2010). Por tanto, gozar de un elevado número de hospederos, con frutas maduras en diferentes estaciones, permite a *C. capitata* mantener su actividad prácticamente de forma continua a lo largo de todo el año.

1.3.1. Descripción del adulto

La mosca adulta de *C. capitata* mide entre 3,5 y 5 mm de longitud. Es de color amarillento con tinte marrón, especialmente sobre el abdomen, las patas y alas. Tiene 3 bandas de

color amarillo parduzco sobre alas transparentes. El tórax es de color blanco cremoso a amarillo con un patrón característico de manchas negras. El abdomen presenta franjas amarillas y grises (Thomas *et al.*, 2010). La especie presenta un marcado dimorfismo sexual, la hembra se distingue claramente por la presencia de un oviscapto alargado con forma triangular. Los machos presentan en la frente una larga seta que termina en una paleta romboidal de color negro, carácter que no se encuentra en el resto de las especies de tefrítidos de importancia agrícola (**Figura 1.1**).

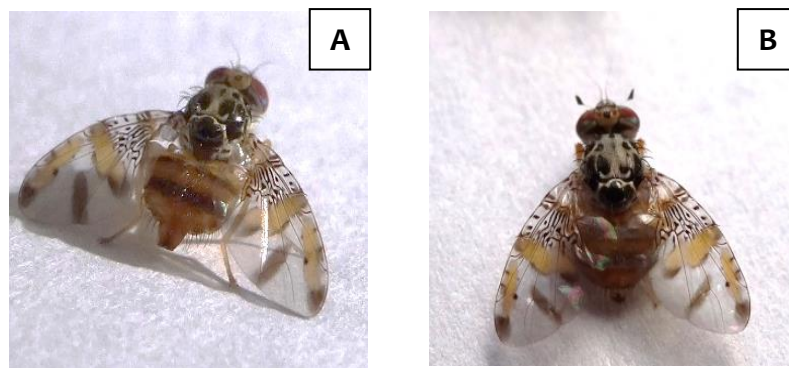


Figura 1. A. Hembra y B. Macho de *C. capitata*, donde puede observarse su marcado dimorfismo sexual.

1.3.2. Ciclo de vida

Esta especie pertenece al grupo de insectos holometábolos; a lo largo de su desarrollo atraviesa 4 estadios diferentes: huevo, larva, pupa y adulto (figura 2). La duración de su ciclo biológico depende de la temperatura. El desarrollo de huevos, larvas y pupas se detiene por debajo de los 10 °C (Thomas *et al.*, 2010). En condiciones favorables, las hembras al cabo de 3-5 días desde su emergencia, están preparadas para poner huevos por lo que el desarrollo de las distintas generaciones puede ser muy rápido, pudiéndose completar en unos 20 días.

Una vez copulada, la hembra elige frutos próximos a la madurez y utiliza su oviscapto para penetrar unos milímetros por debajo de la epidermis del fruto y depositar los huevos en su interior. Los huevos son de color blanco, de forma ovoide alargados de no más de 1 mm de longitud. Generalmente en cada postura la hembra libera entre 6 y 8 huevos. Luego de un periodo de 2 a 4 días de desarrollo, eclosionan las larvas que miden escasamente 2 mm. Éstas son ápodas, blanquecinas, y con la cabeza no diferenciada.

Posee ganchos bucales que le permiten alimentarse de la pulpa de la fruta. El desarrollo de las larvas se completa en unos 6-7 días, periodo en el que atraviesa por 3 estadios larvales, al cabo de los cuales la larva sale a la superficie del fruto y mediante un impulso, salta al suelo y se entierra unos centímetros para pupar. Los puparios son de forma cilíndrica, de 5 mm de longitud, superficie lisa y ligera segmentación. En condiciones favorables ($\sim 26^{\circ}\text{C}$) después de 10 días emerge el adulto.

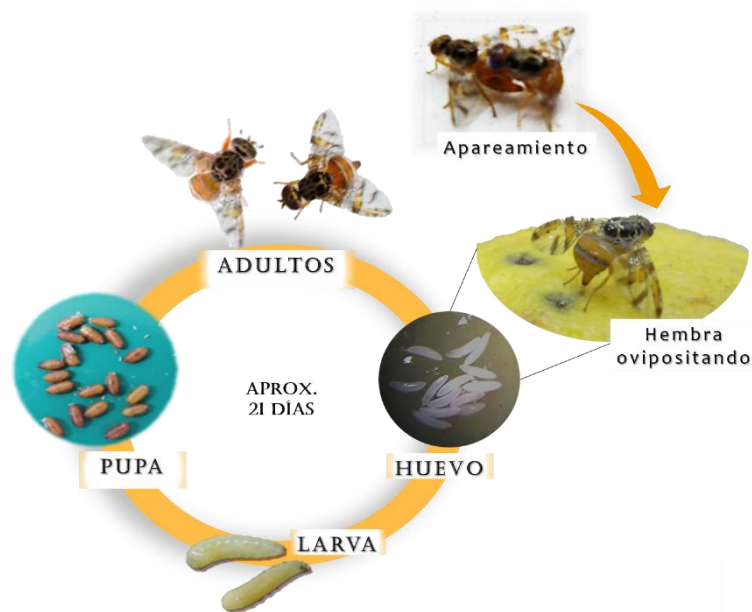


Figura 2. Ciclo de vida de *C. capitata*

1.4. Estrategias de control en Argentina: Manejo Integrado de Plagas (M.I.P.)

Históricamente las plagas han sido combatidas con el uso de pesticidas sintéticos de diversos grupos químicos que se aplican a los cultivos alimentarios, árboles frutales, cultivos de raíces, plantas ornamentales y flores, y los cultivos industriales (Pérez *et al* 2013). Sin embargo, el uso excesivo de agroquímicos de amplio espectro causó graves problemas tales como intoxicaciones de los trabajadores agrícolas, la presencia de residuos de los plaguicidas en los alimentos y riesgos para la salud de los consumidores. A su vez, por no ser selectivos, afectan a otros organismos benéficos tales como

polinizadores o enemigos naturales de las plagas de insectos; ésto sumado al desarrollo de resistencia en las poblaciones de plagas a uno o más grupos de plaguicidas (Gahukar, 2014), impulsó la búsqueda de diferentes estrategias ecológicamente aceptables para el control de plagas.

Hacia finales de los años 50 en los Estados Unidos, con la preocupación acerca de los efectos negativos sobre el ambiente derivados del uso masivo de plaguicidas, comienzan a discutirse las principales ideas que sentarían las bases del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Esta filosofía, promueve la integración de estrategias y tácticas de control con el fin de mejorar su eficacia, retrasar la generación de resistencia de las plagas a los plaguicidas y minimizar los efectos de las prácticas de fitoprotección sobre el ambiente y la salud humana (Blanco-Metzler, 1996).

Entre las tácticas utilizadas se incluyen: el uso de enemigos naturales (control biológico), las prácticas culturales como solarización o cultivos asociados (control cultural), utilizar variedades resistentes (control filogenético), el control mecánico y físico, la liberación masiva de insectos estériles (control autocida), el uso de medidas legales; el uso de sustancias químicas que modifican el comportamiento de los insectos (control etológico) y el uso de insecticidas (control químico) (Blanco–Metzler, 1996); este último restringido a momentos donde otras medidas de control hayan fallado o cuando el tamaño poblacional de la plaga sea tal que el daño económico que pueda generar sea relevante (Pérez *et al* 2013).

En Argentina, para el control de las “moscas de la fruta” se puso en marcha desde la década de 1990, el Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de la Fruta (ProCEM Nacional) dependiente del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) del entonces, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Resolución 134/1994 (SENASA, 1994).

Este programa tiene la finalidad de lograr el establecimiento de zonas libres y de baja prevalencia de la plaga. Se basa en el uso integrado de la técnica del insecto estéril (TIE), el control cultural, biológico y químico y un sistema de cuarentena estricta (Guillén y Sánchez, 2007; Ovruski y Schliserman, 2012), conjuntamente con la aplicación de un sistema de detección mediante el uso de trampas y muestreo de frutos. Existen

numerosos métodos de control de los cuales se destacarán a continuación aquellos considerados más relevantes, y que son implementados por el ProCEM en la provincia de San Juan.

1.4.1. Control químico

Es un componente importante dentro del manejo integrado de plagas y en el caso de moscas de la fruta está basado en una técnica atracticida. Con base en el comportamiento alimenticio de la mosca de la fruta, se utiliza una mezcla de insecticida y atrayente alimenticio para elaborar un cebo atractivo que incremente la efectividad del control, en comparación con las aplicaciones de cobertura completa convencional de insecticidas, ineficaces tanto para tratar al adulto volador como a la pupa que se entierra en el suelo. La mosca de la fruta es susceptible a la mayoría de los insecticidas, sin embargo, los productos autorizados en Argentina para su control, son el malathión y el Spinosad. El Malathión es un insecticida organofosforado que presenta toxicidad por contacto sobre una amplia gama de insectos y cuando se combina con un cebo (a base de alimento) proporciona un control selectivo de moscas de la fruta (Gazit y Akiva, 2017). El Spinosad es un insecticida producto de la fermentación aeróbica del actinomiceto del suelo *Saccharopolyspora spinosa*. Este compuesto tiene un modo de acción que provee una alternativa a los insecticidas convencionales (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides). Debido a su rápida degradación, baja toxicidad en humanos y bajas dosis de uso, el spinosad ha sido clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como un material de reducido riesgo ambiental y toxicológico (Pineda, *et al.* 2007).

1.4.2. Control cultural y mecánico

Está dirigido a destruir huevos y larvas de moscas de la fruta, y se realiza cuando el muestreo de frutos reporta la presencia de la plaga. Sirve para controlar al 60-80% de la población plaga (Aluja, 1993) por lo que su inclusión en los esquemas de manejo integrado es primordial. Consiste en actividades de recolección y destrucción de frutos, barbecho, rastreo y podas sanitarias. Este procedimiento, permite el control de focos de infestación, eliminando los frutos o arrancando los frutales asilados dentro del área que puedan ser hospedantes de la mosca.

1.4.3. Técnica del Insecto Estéril (T.I.E.)

La Técnica del Insecto Estéril (TIE) se basa en la cría, esterilización y posterior liberación de machos al ambiente para que se apareen con las hembras silvestres, resultando en la producción de huevos infértiles (Barry, et al. 2003) con el objetivo de reducir al mínimo su descendencia. La TIE está entre los métodos de control de plagas menos perjudiciales. A diferencia de otros métodos con base biológica, la TIE es específica a nivel de especie, no transfiere agentes exóticos hacia nuevos ambientes ni introduce nuevo material genético dentro de las poblaciones existentes debido a que los organismos liberados no se pueden auto-replicar (Hendrichs, et al. 2002). Requiere niveles bajos de población de la plaga.

1.4.4. Sistema de cuarentena: barreras fitosanitarias

El control legal se basa en el cumplimiento de actividades de carácter obligatorio para el público en general, productores, transportistas, comerciantes y empaques. Su objetivo es controlar, suprimir, confinar o eliminar la fruta infestada a través de barreras fitosanitarias donde se realiza control vehicular y de documentación según un protocolo consensuado nacionalmente (SENASA, 2002).

Además, se pretende incorporar el control biológico como una herramienta complementaria a las prácticas de control y erradicación de la mosca de la fruta actualmente implantadas en las áreas de cultivo de frutales de San Juan (Ovruski y Schliserman, 2012). Así, desde el año 2008 la especie Indo-Pacífica, *Diachasmimorpha longicaudata*, se está criando en masa en la BioPlanta San Juan con el objetivo de liberar masivamente esta especie contra *C. capitata* (Suarez, et al. 2014).

1.5. Métodos alternativos de lucha contra plagas

Es innegable que el control químico convencional para erradicar las plagas de los cultivos ha sido, durante varias décadas, y sigue siendo una herramienta necesaria. Pero, como ya se ha mencionado, el uso y abuso de los plaguicidas sintéticos dio lugar a graves consecuencias como desarrollo de resistencia, aparición de plagas secundarias, residuos tóxicos, y problemas de intoxicaciones (Vacas Gonzalez, 2011). En respuesta a esto es

que surge la necesidad de buscar nuevos métodos de control de plagas más amigables con el ambiente.

Desde hace ya algunas décadas, se comenzaron a desarrollar investigaciones sobre los llamados “métodos biorracionales”, cuya estrategia de acción se basa en el conocimiento de procesos fisiológicos y bioquímicos específicos, la patología de los insectos y los sistemas de comunicación intra e interespecífica, con el objetivo de obtener agentes capaces de interferir en cualquiera de estos procesos (Vives de Quadras, 1988; Primo-Yúfera, 1991).

La investigación se ha dirigido fundamentalmente hacia cuatro líneas; reguladores del crecimiento de insectos (RCIs), insecticidas de origen natural, control biológico y uso de semioquímicos. De todos los métodos anteriormente citados, la presente tesis se centra en la búsqueda y aplicación de semioquímicos para el control de plagas.

Los semioquímicos (del griego “*semeon*”, que significa signo o señal) son sustancias químicas que median las interacciones entre organismos (Agelopoulos, *et al.* 1999). Los insectos dependen en gran medida del olfato para detectar su entorno externo, este es un proceso muy importante en su desarrollo, ya que les permite identificar distintos tipos de recursos. En consecuencia, la comunicación por medio de sustancias químicas, es una de las principales guías de su comportamiento, ya que está involucrada en los patrones más importantes como el reconocimiento del alimento, en la elección de la pareja correcta y en la oviposición, entre otros. El sistema olfativo de insectos tiene la capacidad de resolución espacio-temporal a muy pequeña escala de los recursos periféricos (Bruce y Pickett, 2011).

Las comunidades vegetales pueden considerarse como el marco o hábitat donde los insectos desarrollan sus ciclos biológicos, y ese marco posee una estructura que lo define (Southwood, 1978). En las plantas, los insectos fitófagos (como las “moscas de la fruta”) no sólo consiguen alimento, sino también refugio contra condiciones climáticas extremas, protección frente a sus enemigos naturales, sitios para el cortejo, apareamiento, oviposición, descanso e hibernación (Strong *et al.*, 1986). En los últimos años, este tipo de comunicación química es objeto de intensa investigación por las repercusiones que se pueden derivar en el manejo de insectos plagas.

Dentro de los derivados de las plantas aromáticas, se encuentran los aceites esenciales, de gran interés en la actualidad por la amplia información que existe sobre su participación en las interacciones ecológicas, especialmente la interacción planta-insecto (revisado en Regnault-Roger, *et al.* 2012). El interés suscitado por los aceites esenciales se puso de manifiesto a partir del siglo XIX cuando comenzaron a ser posibles los análisis de estas mezclas complejas para el aislamiento y caracterización de sus constituyentes. Gracias a ello, numerosos estudios han demostrado que los aceites esenciales exhiben múltiples propiedades sobre los insectos; como toxicidad, acción repelente (Tolosa, *et al.* 2006) (Erler, *et al.* 2006), ovicida (Tunç, *et al.* 2000), larvicida (Cheng, *et al.* 2009), antialimentaria (Isman, 2002).

A raíz de estas propiedades biológicas ha crecido la atención en los aceites esenciales como fuentes alternativas para el control de plagas. Además, los aceites esenciales son biodegradables y en general, no tóxicos para el hombre, características que alientan la posible implementación en programas de MIP (Ovruski, *et al.* 1999).

II. Aceites esenciales.

1.6. Aceites esenciales (AEs): Definición

Se definen como “aceites esenciales” a las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos y saborizantes). Los AEs son producidos en más de 17 500 especies aromáticas de las plantas superiores que pertenecen en su mayoría a unas pocas familias, incluyendo Myrtaceae, Lauraceae, Lamiaceae y Asteraceae. La biosíntesis y la acumulación de AEs ocurre generalmente en células epidérmicas modificadas, es decir, se asocian con la presencia de estructuras secretoras complejas tales como tricomas glandulares (Lamiaceae), cavidades secretoras (Myrtaceae, Rutaceae) y los conductos resiníferos (Asteraceae, Apiaceae) (Rodríguez *et al.* 1984). Dependiendo de la familia o género pueden acumularse en diferentes órganos como tallos, raíces, flores y frutos.

Los aceites esenciales son mezclas complejas sintetizadas a partir de distintas rutas metabólicas que pueden tener la siguiente naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides. Los terpenos son los compuestos orgánicos volátiles más abundantes. Su unidad estructural básica es el isopreno, constituido por cinco átomos de carbono (Palá Paúl, 2002) (Giuliano, 2001). Existe un sorprendente número de estructuras, que resultan de la combinación secuencial de estas unidades básicas en categorías de C₁₀ (mono-), C₁₅ (sesqui-), C₂₀ (di-), C₃₀ (tri-), C₄₀ (tetra-) y C_{>40} (poli-) terpenoides. Los terpenos son emitidos en mezclas cuantitativa y cualitativamente diversas, las cuales llegan al ambiente a través de la volatilización, la lixiviación, o la descomposición de los restos vegetales. Su información es recibida por otras partes de la planta, por otras plantas, por animales y por microorganismos.

1.7. Aceites esenciales y actividad biológica sobre insectos plaga.

1.7.1. Antecedentes

El interés suscitado por los aceites esenciales se puso de manifiesto a partir del siglo XIX cuando comenzaron los análisis de estas mezclas complejas para el aislamiento y caracterización de sus constituyentes. Por siglos los aceites esenciales se han aislado de diferentes partes de plantas y se utilizan para fines similares. Los AEs cubren un amplio espectro de actividades. Varios AEs causan efectos farmacológicos, se han demostrado propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Otros, son biocidas contra una amplia gama de organismos tales como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas (Kalemba & Kunicka, 2003) (Lima, et al., 2011).

Además, los AEs exhiben múltiples propiedades sobre los insectos; sus efectos pueden ser negativos como toxicidad, acción repelente (Tolosa et al., 2010, Erler et al., 2006), ovicida (Tunç et al., 2000), larvicida (Cheng et al., 2009), antialimentaria (Isman, 2002), por lo que existe consenso sobre su función de defensa en las plantas protegiéndolas de herbívoros y patógenos. La actividad insecticida de AEs y/o sus componentes y en menor medida, la actividad atrayente, ha sido comprobada para plagas de granos

almacenados, e insectos de importancia sanitaria, veterinaria y médica (Isman et al. 1990).

Los AEs de *Gymnophyton polycephalum* y *Lippia integrifolia* presentan excelentes propiedades repelentes contra *Triatoma infestans*, el vector de la enfermedad del Chagas (Lima, et al., 2011). Por otro lado, López et al (2011) evaluaron el efecto toxico del AE de *Azorella cryptantha* de dos poblaciones diferentes sobre *T. infestans* y *C. capitata*, encontrando que en ambos insectos estos AE presentan actividad insecticida (Lopez, et al., 2012). Oviedo, et al. (2017) evaluaron los extractos alcohólicos de *Solanum granulosoleprosum* y *Ricinus communis* y los AEs obtenidos de las especies *Baccharis dracunculifolia* y *Pinnus elliottii* sobre la emergencia y mortalidad de adultos de *A. fraterculus* y *C. capitata*. De sus resultados se destaca que los AEs de *B. dracunculifolia* y *P. elliottii* provocaron el 100% de mortalidad de pupas de *C. capitata*.

Según una revisión realizada por Ghabbari (2018), los aceites esenciales de varias plantas o sus componentes han sido investigados por su actividad insecticida contra *C. capitata*, entre ellos *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Miller, *Hyptis suaveolens* L., *Ocimum basilicum* L., *Mentha pulegium* L., *Thymbra capitata* L., *Thymus* spp. (Lamiales Lamiaceae), *Thuja occidentalis* L. (Pinales Cupressaceae), *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtales Myrtaceae), *Melia azedarach* L. (Sapindales Meliaceae), *Ruta graveolens* L. (Sapindales Rutaceae), *Zingiber officinalis* Roscoe (Zingiberales Zingiberaceae), *Allium sativum* L. (Liliales Amaryllidaceae), *Citrus* spp. (Sapindales Rutaceae), *Tagetes* spp. (Asterales Asteraceae).

Además, los extractos etanólicos de las especies de plantas *Eriobotrya japonica* (Rosaceae), *Ficus carica* (Moraceae), *Rubus ulmifolius* (Rosaceae), and *R. graveolens*, se analizaron y probaron en bioensayos de laboratorio con adultos de *C. capitata* para evaluar la respuesta electroantenográfica, la atracción / repelencia de las hembras grávidas y la toxicidad en los adultos (Ghabbari, et al., 2018). El uso de estas cuatro especies se ve alentado por su bajo costo, debido a su amplia disponibilidad en muchos países de la cuenca mediterránea. Por lo tanto, pueden considerarse una fuente económicamente sostenible de extractos de plantas como herramientas útiles en los programas de manejo de plagas (Ghosh et al., 2012).

1.7.2. Antecedentes de las especies botánicas elegidas

El género *Baccharis* (Asteraceae) comprende aproximadamente entre 400 y 500 especies distribuidas en el continente americano, desde el Sur de EEUU hasta la parte más austral de Chile y Argentina, representado en la última por 96 especies. (Giuliano, 2001). *Baccharis spartioides*, conocida vulgarmente en Argentina como “Pichana”, es una especie nativa común en acequias y sitios salobres cercanos a las fincas de producción con distribución natural en la eco-región del Monte. Se trata de una especie que produce aceites esenciales cuya composición varía de acuerdo al sitio de recolección (Oliva *et al.*, 2007) sin estar claro aún, si ello responde a variaciones genéticas (quimiotipos) o constituyen respuestas a condiciones ambientales (quimiodemos). Existen trabajos que indican que el aceite esencial posee propiedades antimicrobianas (Oliva *et al.*, 2007) y repelente contra mosquitos (Gillij *et al.*, 2008).

El género *Schinus* (Anacardiaceae) comprende 22 especies, seis de las cuales son endémicas en Argentina (Murray *et al.*, 2005). *S. areira* es un árbol siempre verde de gran porte (puede alcanzar 10 m de altura), localmente es conocido como “Aguaribay” y está ampliamente distribuido en América. Históricamente ha sido utilizado en la medicina popular, se le atribuyen cualidades como diurético, antiparasitario, desinfectante tópico, entre otras (Gupta, 1995). El aceite esencial tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas; además ha sido estudiado como agente alelopático mostrando actividad inhibitoria sobre plántulas de maíz (*Zea mays*) (Scrivanti *et al.*, 2003). Por otro lado, *Schinus polygama* es un arbusto, en ocasiones de hábito arbóreo (Kiesling, 2003). La composición de su aceite esencial y la actividad antimicrobiana ha sido informada para poblaciones de la Patagonia Argentina (González *et al.*, 2009) y Chile (Erazo, *et al.*, 2006). Sobre la evaluación de los aceites de *B. spartioides* y *S. polygama* como modificadores de comportamientos en insectos, existe sólo un antecedente sobre moscas estériles donde fueron evaluados como señales químicas sobre diferentes comportamientos de la mosca de los frutos (Jofré Barud, *et al.* 2014). Se encontró que el aceite de *B. spartioides* presenta actividad atrayente de hembras de *C. capitata* de la línea *tsl*. Sobre la misma cepa de cría, los machos tendieron a ser atraídos más por el aceite de *S. polygama*. Ambos aceites mostraron un efecto sobre el comportamiento de cópula.


Como ya se mencionó, *S. areira*, ha recibido gran interés en el estudio de sus propiedades, también sobre insectos. Las hojas son tradicionalmente utilizadas como repelentes contra la mosca doméstica (*Musca domestica*). Existen antecedentes de su actividad repelente sobre la cucaracha (*Blattella germanica*) (Ferrero, et al. 2007) y propiedades repelentes e insecticidas a través de ninfas de *Triatoma infestans* (Ferrero, et al. 2006).

1.8. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue conocer el potencial de los aceites esenciales de plantas nativas de San Juan, como agentes semioquímicos, por medio de la determinación de su influencia sobre comportamientos reproductivos y de preferencia en adultos de la Mosca de los Frutos, *Ceratitis capitata*.

1.8.1. **Objetivos específicos**

1. Evaluar si los aceites esenciales de las tres especies botánicas seleccionadas poseen el potencial para modificar el comportamiento de atracción de adultos silvestres de *C. capitata*.
2. Determinar si los aceites esenciales influyen en el comportamiento sexual de adultos silvestres y de cría masiva de *C. capitata*.



CAPITULO II:
RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE
C. CAPITATA FRENTE A LOS ACEITES
ESENCIALES: ATRACCIÓN

2.1. Introducción

Los insectos utilizan diferentes mecanismos para comunicarse entre sí o con otros organismos. Esto ocurre al guiarse por la visión, a través de órganos sensoriales táctiles, produciendo sonidos mediante la adaptación de órganos que los producen y los reciben, o a través de la emisión de mensajes mediados por sustancias químicas que ellos mismos producen o que son capaces de percibir de individuos de su misma especie o de otras especies (Cocroft y Rodriguez, 2005; Schiestl, 2010).

En hábitats naturales, las plantas hospederas comúnmente crecen juntas con plantas no hospederas en vegetaciones mixtas y complejas, así la capacidad de encontrar y reconocer plantas hospedadoras en estos hábitats es crucial (Schoonhoven, et al., 2005). Es la ecología química la encargada del estudio de las interacciones intra e interespecíficas entre organismos, poniendo especial atención a las sustancias químicas involucradas en tal interacción. Hace un par de décadas se ha acuñado el término semioquímicos (del griego semeon= señal) involucrando a todos los productos químicos que sirven de intermediarios en las interacciones entre organismos (Bell y Cardé, 2013; Metcalf, 1990). Los semioquímicos se pueden clasificar dependiendo de si las interacciones son interespecíficas, en cuyo caso se denominan aleloquímicos; o si éstas son intraespecíficas, y reciben el nombre de feromonas (Jones y Lewis, 1981).

Todas las actividades de la mosca de la fruta se centran en las plantas hospederas y no hospederas. La mayoría de estas actividades están mediadas por semioquímicos (Ansari, et al. 2012; Metcalf, 1990). El potencial de los semioquímicos como herramienta de control de las moscas es importante por su especificidad. Además, el comportamiento de selección del huésped puede cambiar con la fase de desarrollo del insecto, y las diferentes etapas de la vida a menudo difieren en la preferencia de su planta huésped o su capacidad para usar una especie de planta como huésped (Schoonhoven, et al., 2005).

Los volátiles emanados o emitidos por las plantas hospederas proporcionan señales que son aprovechadas por los insectos para el reconocimiento del huésped y que los utilizan para determinar no sólo si se están acercando a la especie huésped correcta sino también para juzgar la calidad nutricional y la presencia de otros insectos en él (Bruce y

Pickett, 2011) así como también son señales para la localización de los recursos de oviposición para las hembras y son usados por los machos para facilitar el encuentro con el sexo opuesto.

La técnica para controlar insectos plaga mediante alteraciones comportamentales ha cobrado importancia en las últimas décadas (Foster y Harris, 1997). El uso de compuestos volátiles permite prevenir y controlar daños con un costo ambiental casi nulo. Aunque estímulos visuales y auditivos han sido utilizados en numerosas ocasiones, el olfato es probablemente la vía más efectiva y utilizada a la hora de guiar el comportamiento de un insecto con un objetivo específico (Benzi, *et al.* 2009; Metcalf y Metcalf, 1992). Dicho sistema de codificación de olores tiene la ventaja de proporcionar flexibilidad; permite la adaptación a entornos cambiantes mediante alteraciones en el procesamiento de señales mientras se mantienen los mismos receptores olfatorios periféricos (Bruce y Pickett, 2011).

En los programas de detección, delimitación y control de plagas, la detección temprana de individuos siempre ha sido una prioridad, ya que los costos de la intervención y la eventual erradicación aumentan drásticamente si la población se establece y se propaga. Los esfuerzos para mejorar los métodos de control y detección de la mosca del Mediterráneo incluyeron inicialmente el desarrollo de cebos para machos y, posteriormente, atrayentes para hembras. Durante los últimos treinta años, el Trimedlure (TML) (tert-butyl 4 (y 5) chloro-2-metilciclohexano 1-carboxilato) contenido en las trampas Jackson, junto con trampas cebadas con proteína hidrolizada, fueron las principales herramientas utilizadas en los programas de detección de mosca del Mediterráneo. Así, cada año, decenas de miles de trampas basadas en semioquímicos se implementan en todo el mundo para detectar o controlar las poblaciones de la mosca del Mediterráneo (Cristofaro, *et al.* 2007).

El crecimiento de esta rama científica se debe principalmente a la importancia que se les ha brindado a las sustancias químicas involucradas en interacciones tróficas con enfoque ecológico, y al avance de las técnicas químicas para purificar y caracterizar productos naturales. En los últimos años, los aceites esenciales se han presentado como una alternativa en el control de insectos plaga (Benzi, *et al.* 2009). En la naturaleza, los

aceites esenciales desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra los herbívoros. También pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión del polen y las semillas, o repeler a los indeseables (Rani, 2015).

Los AEs no sólo pueden ser tóxicos, sino que también pueden actuar a través de efectos subletales provocando cambios en los comportamientos de atracción o repelencia, alimentación u oviposición provocando efectos fisiológicos sobre procesos como la metamorfosis o la fertilidad (Copping y Duke, 2007).

Para ayudar a identificar los componentes bioactivos de las emisiones volátiles de la planta hospedadora, se emplea la técnica de electroantenografía (EAG). La EAG es una herramienta efectiva para evaluar y registrar electrofisiológicamente las respuestas olfatorias de un insecto a través de sus receptores antenales. El proceso de evaluación de la EAG puede ayudar a reducir la cantidad de volátiles probados para identificar componentes bioactivos promisorios. Sin embargo, los ensayos de EAG solo brindan información sobre la activación de los receptores antenales. No proporciona información sobre el tipo de comportamiento del insecto que provoca el compuesto, que podría ser un atrayente, repelente u otro tipo de respuesta conductual (Beck, et al., 2012). Por esta razón, los ensayos biológicos son necesarios para conocer si la quimiorrecepción de moléculas se traduce en un cambio comportamental útil para el control de la plaga.

Los constituyentes de los aceites esenciales pertenecen principalmente a dos grupos fitoquímicos: terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos de bajo peso molecular) y, en menor medida, fenilpropanoides (Regnault-Roger, et al., 2012; Niogret, et al., 2017). Son odorantes relativamente débiles para los humanos, pero sirven como importantes señales olfativas para los insectos (Schoonhoven, et al., 2005). El procesamiento olfativo de las mezclas volátiles conduce a las respuestas de comportamiento que son diferentes de las respuestas producidas por los compuestos individuales. Existe un nivel de percepción de la calidad del aroma que depende de las combinaciones de compuestos volátiles para formar la percepción completa detectada por el insecto (Bruce y Pickett, 2011). Esta es una tarea compleja debido a que los insectos deben realizar el

reconocimiento detectando mezclas de compuestos ubicuos, dependiendo de proporciones de volátiles vegetales y no de la detección de un compuesto particular (Bruce, et al., 2005).

El desarrollo de AEs como productos fitosanitarios es especialmente adecuado para la agricultura orgánica y para el manejo integrado de plagas. Son de origen natural y biodegradables, tienen diversos objetivos fisiológicos dentro de los insectos y, en consecuencia, pueden retrasar la evolución de la resistencia (Regnault-Roger, et al., 2012).

El contexto teórico planteado señala que los constituyentes de aceites esenciales exhiben diferentes actividades sobre insectos. La flora nativa de San Juan presenta numerosas especies aromáticas productoras de aceites esenciales que podrían contar con este potencial. El objetivo de este capítulo fue evaluar si los aceites esenciales de las 3 especies vegetales seleccionadas poseen el potencial para modificar el comportamiento de atracción de adultos de *C. capitata*.

El objetivo de este capítulo fue evaluar si los aceites esenciales de *Baccharis spartioides*, *Schinus areira* y *S. polygama* poseen el potencial para modificar la respuesta de atracción de adultos silvestres de *C. capitata*.

2.2. Hipótesis

Los aceites esenciales de plantas nativas actúan como semioquímicos sobre la respuesta olfatoria de adultos de la mosca de los frutos.

2.3. Objetivos específicos:

1. Caracterizar la composición de los aceites esenciales de las especies *Baccharis spartioides*, *Schinus areira* y *S. polygama* a partir de ejemplares recolectados en ambientes naturales de San Juan.
2. Evaluar la respuesta de atracción de machos y hembras adultos de moscas de los frutos frente a los aceites esenciales de las tres especies aromáticas, bajo condiciones de laboratorio.
3. Evaluar en condiciones de semi-campo la respuesta de atracción de machos y hembras de moscas de los frutos frente a los aceites esenciales de *S. areira* y *S. polygama*.

2.4. Materiales y métodos

2.4.1. **Material vegetal**

La colecta del material vegetal se realizó sobre individuos en estado reproductivo de plantas nativas recolectadas de ambientes naturales de la provincia de San Juan. Muestras de *Baccharis spartioides* y de *Schinus polygama* fueron obtenidas de poblaciones naturales establecidas en el departamento de Jáchal, San Juan. Por otro lado, *Schinus areira* fue recolectado de árboles situados en el departamento de Ullum, San Juan (esta especie es utilizada en el arbolado público).

2.4.2. **Obtención y análisis químico de los aceites esenciales**

Las partes aéreas del material vegetal se sometieron a destilación por arrastre con vapor de agua en un equipo con trampa tipo Clevenger durante 2 h (Figura 3). El aceite obtenido se colocó en un microtubo hermético tipo Eppendorf. Posteriormente se almacenó a -18 °C hasta su utilización para el análisis químico y ensayos biológicos.



Figura 3. Destilador de arrastre con vapor de agua con trampa tipo Clevenger.

La composición del aceite fue determinada por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de acuerdo a Jofre Barud *et al.*, (2014). Se utilizó un espectrómetro de masa Perkin Elmer Clarus 600, equipado con una columna capilar de

sílica fundida DB-5 MS (60 m y 0,25 mm d.i. con una película de 0,25 μm de espesor), acoplado a un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Series Clarus 600 (EM-CG). El gas portador fue helio (49,6 psi) y se operó en modo de inyección *Split*.

Las muestras fueron analizadas utilizando las siguientes condiciones: programa de temperatura del horno: temperatura inicial 60 °C (durante 5 min.), incrementando a razón de 5 °C/min hasta 240 °C (durante 10 min). La presión en la cabeza de la columna fue de 15 psi y el inyector de temperatura y detector FID se trabajaron a 250 °C. La línea de transferencia de GC se mantuvo a 200 °C. La ionización se llevó a cabo en el espectrómetro de masas por impacto de electrones bajo alto vacío con una energía de ionización 70-eV. Los cromatogramas se adquirieron en modo *scan* desde 50 m/z hasta 300 m/z (tiempo de *scan*: 0,2 s, tiempo *inter-scan*: 0,1 s).

La identificación de los componentes se realizó por comparación de su índice de retención (IR) con referencia a una serie homóloga de n-alcenos (C₉-C₂₅), mediante la comparación de sus espectros de masas con los descritos en la literatura y por medio de las bibliotecas Wiley 8 (NIST) y Adams (2001).

2.4.3. Material biológico

Se trabajó con individuos silvestres de *Ceratitis capitata* de ambos sexos, obtenidos de larvas colectadas de frutos infestados de diferentes especies hospederas, especialmente duraznos, ciruelas e higos. Los frutos infestados fueron colocados en recipientes cerrados que contenían en su base aserrín de madera como sustrato de pupación.

Las pupas colectadas se colocaron dentro de cajas de acrílico (30 x 40 x 40 cm³) hasta la emergencia de los adultos. A medida que emergieron, los adultos fueron separados por sexo y edad, estableciendo diferentes cohortes cada 2 o 3 días. Los individuos se acondicionaron en recipientes de vidrio de 3 L a razón de 30 individuos/L suministrándoles agua y alimento *ad libitum*. La dieta consiste en una mezcla de tres partes de azúcar y una de proteína (levadura en polvo). En la Figura 4 se encuentra en detalle el proceso de acondicionamiento de los individuos.



Figura 4. Acondicionamiento secuencial de los individuos de *C. capitata*. **A.** Fruta larvada. **B.** Cámara de emergencia de adultos. **C.** Cámara de mantenimiento con dieta y agua.

2.4.4. Ensayo biológico en laboratorio: Y-olfatómetro

Las pruebas biológicas se llevaron a cabo en laboratorio bajo condiciones controladas (24 ± 2 °C, $50 \pm 5\%$ HR). Se realizaron en un olfatómetro de vidrio en forma de “Y” (Figura 5). Se utilizó una bomba eléctrica para impulsar aire dentro del Y-olfatómetro, previo a su ingreso el aire fue humedecido y filtrado con carbón activado. El caudal de aire se estableció en 120 mL/min con un regulador de flujo (Supelco). Cada una de las ramas menores de la Y se conectaron a dos viales individuales de 250 mL.

La prueba consistió en colocar en uno de los viales un papel de filtro de 1 cm² tratado con 2 µL de una solución de aceite esencial en acetona (2,5mg/mL) y en el vial opuesto se colocó sólo acetona, identificándolas como “rama tratamiento” y “rama control” respectivamente. El Y-olfatómetro se mantuvo en un ángulo de 25°, experimentos anteriores en nuestro laboratorio determinaron que esa inclinación fue la que mostró mejor respuesta de las moscas. Se utilizaron individuos vírgenes de 10 a 15 días de edad. Se colocó un individuo por vez en la rama principal del Y-olfatómetro (“tallo”) durante 2 minutos sin flujo de aire, permitiéndole explorar el Y-olfatómetro. Luego se activó la corriente de aire durante dos minutos más. Durante este periodo las variables registradas fueron: la elección inicial (el primer lugar al cuál se dirigió cada individuo), el tiempo de permanencia (en segundos) de cada individuo en las ramas “tratamiento” y/o “control”, y elección final (lugar donde se encontró el insecto transcurridos los dos minutos). Cada cinco insectos, se giró 180° todo el Y-olfatómetro para evitar efectos de posición. Los ensayos se llevaron a cabo a partir de las 9AM y hasta las 13PM. Dos grupos de 10 individuos de cada sexo fueron ensayados por día, intercalando su ocurrencia respecto del sexo. El Y-olfatómetro se lavó completamente cuando se comenzaba la

prueba con el sexo opuesto. El ensayo se repitió hasta obtener al menos un N de 110 individuos por sexo.

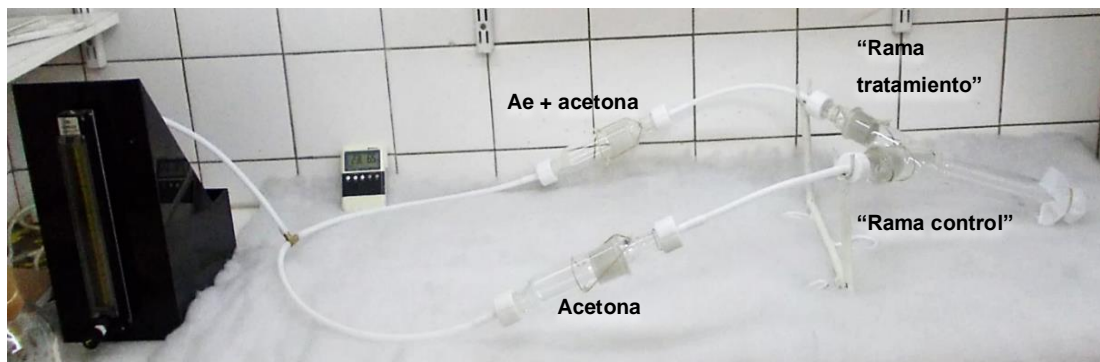


Figura 5. Y-olfatómetro

2.4.4.1. Análisis estadístico de los datos.

Para determinar si existía una diferencia en la proporción de respuesta frente a un aceite entre machos y hembras, y si existía diferencia en la respuesta de machos y hembras a los distintos aceites, se realizó un análisis de modelos lineales, generalizados mixtos (MLGM). Para ello se evaluó la proporción de respuesta de los individuos, realizando un cociente entre individuos que realizaron algún tipo de elección (excluye al tallo del Y-olfatómetro) y el total de individuos ensayados, empleando una distribución Binomial del error (función de enlace *logit*). Los datos de las elecciones inicial y final se analizaron mediante un test Chi². Por otro lado, los datos del tiempo de permanencia fueron analizados con el test de Friedman con el fin de comparar el control con el tratamiento. En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el programa estadístico Infostat (versión profesional 2017).

2.4.5. Ensayo biológico bajo condiciones de semi-campo

Se seleccionaron para ser evaluados en condiciones de semi-campo los AEs que mejores resultados arrojaron sobre cada sexo en el ensayo de atracción bajo condiciones de laboratorio. Los AEs seleccionados fueron: *S. areira* y *S. polygama*. El ensayo se realizó en jaulas de tul de 35 cm de diámetro por 100 cm de alto (Figura 6). Las jaulas fueron distribuidas aleatoriamente dentro de los jardines de la Facultad de Ingeniería de la UNSJ. Dentro de cada jaula se colocó una rama artificial, proporcionándoles sitio de

apoyo a los individuos. La prueba consistió en colocar sobre dos hojas opuestas de la rama, un papel de filtro tratado con una solución de aceite esencial en acetona (10mg/mL) frente a otro papel donde se colocó sólo acetona. Se liberaron grupos de 10 individuos dentro de cada jaula por un periodo de 2h. Cada vez que los individuos hacían una elección se los retiraba, registrando el número que se posaba sobre una u otra fuente disponible. Se realizaron 4 réplicas por día para cada sexo y el ensayo se repitió durante 3 días.



Figura 6. **A.** Jaulas de tul colgadas **B.** Individuos sobre la fuente

2.4.6. Análisis estadístico de datos

Los datos fueron analizados con pruebas χ^2 de independencia (software Infostat/Versión profesional 2017). Se trabajó con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$).

2.5. Resultados

2.5.1. Composición de los aceites esenciales de las especies *Baccharis spartioides*, *Schinus areira* y *S. polygama*.

En la tabla 1 se detallan los porcentajes de área relativa que representan los distintos grupos químicos obtenidos como resultado de los análisis de los aceites esenciales utilizados. En todos los AEs, los componentes del tipo “Monoterpenos” se presentaron en una alta proporción (>65%). En el anexo I se encuentra la composición total de los aceites esenciales.

Tabla 1. Porcentaje del área ocupada por los distintos grupos químicos en los aceites esenciales estudiados.

Grupos químicos	<i>B. spartioides</i>	<i>S. areira</i>	<i>S. polygama</i>
HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS	1,10	0,23	1,20
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS	2,40	0,09	-
MONOTERPENOS HIDROCARBONADOS	67,90	65,53	65,10
MONOTERPENOS OXIGENADOS	10,80	2,29	2,10
No identificado	5,80	3,84	2,30
SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS	1,80	19,05	23,70
SESQUITERPENOS OXIGENADOS	5,80	7,24	3,70
TOTAL	95,60	98,27	98,10

El aceite esencial de *Baccharis spartioides* presentó mayoritariamente monoterpenos (78,7%). Se identificaron compuestos que constituyen el 95,6% del total de componentes del aceite. Los monoterpenos mayoritarios son tipo hidrocarburo: β -Felandreno, Sabineno y β -Pino. Sólo un 7,6% estuvo representado por sesquiterpenos. En la Figura 7 se muestra el perfil cromatográfico obtenido para este aceite.

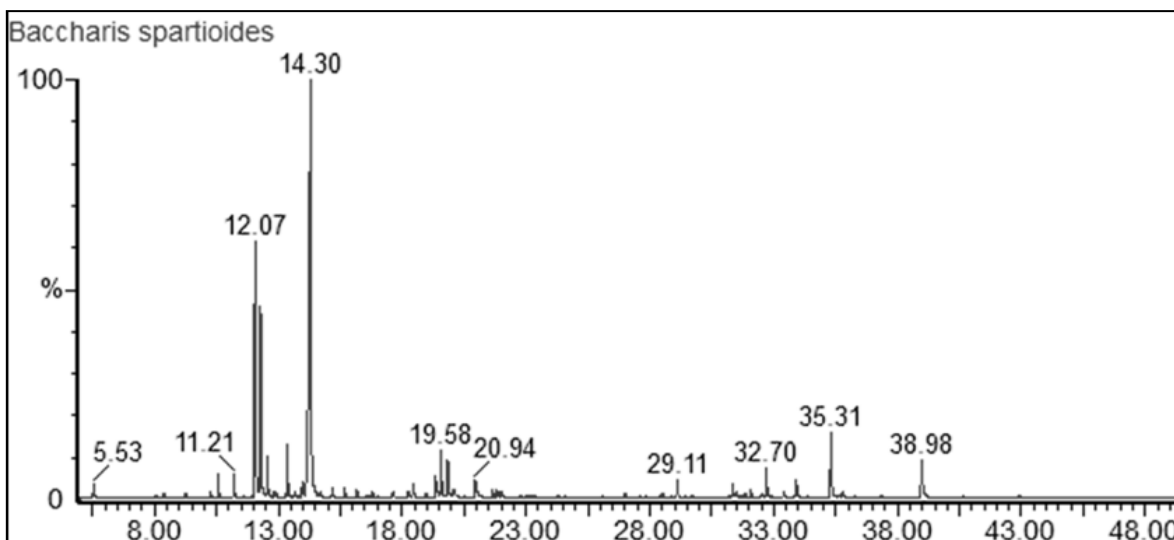


Figura 7. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *B. spartioides*

El aceite esencial de *Schinus areira* mostró del 98,3% identificado, un 67,8% fueron monoterpenos y un 26,3% sesquiterpenos, tanto mono- como sesquiterpenos fueron en su mayoría del tipo hidrocarburo. Entre los principales monoterpenos se encontraron: α -Felandreno, Limoneno, Camfeno, β -Felandreno, α -Pineno, p-Cymeno y β -Mirceno. Dentro de los sesquiterpenos se hallaron Biciclogermacreno (4,4%), δ -Amorfeno (3,7%) y β -Cariofileno (1,9%). La Figura 8 muestra el perfil cromatográfico completo de *S. areira*.

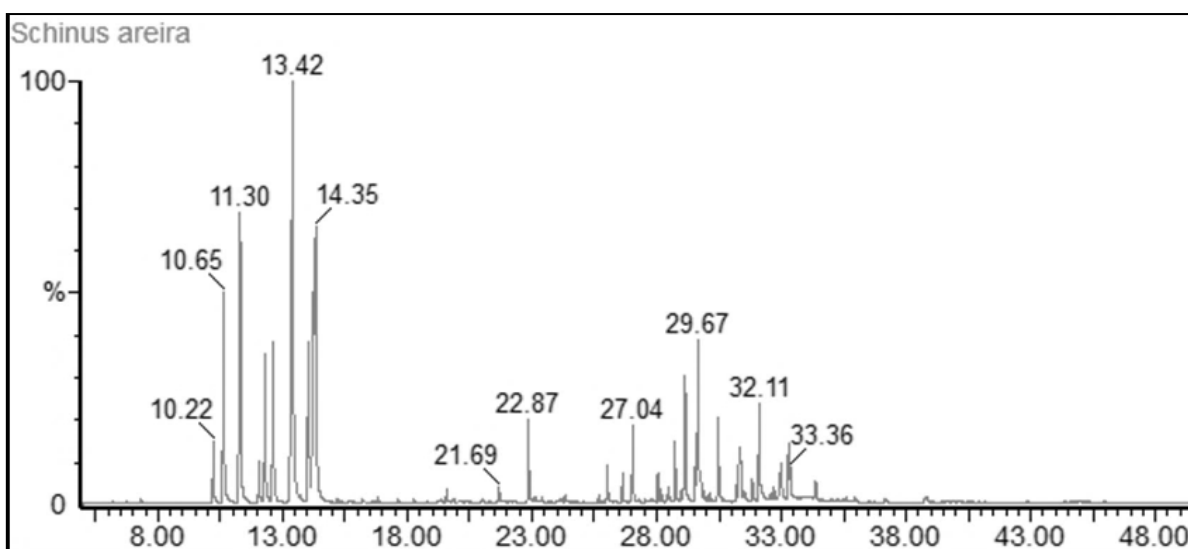


Figura 8. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *S. areira*.

En el aceite esencial de *Schinus polygama*, los compuestos identificados representan el 97,9% del total de componentes del aceite, tanto los mono- como los sesquiterpenos que se presentaron en mayor proporción fueron de tipo hidrocarburo, 65,1% y 27,3% respectivamente. Entre los principales monoterpenos encontrados: α -Tujeno, δ -2-Careno, α -Felandreno, mientras que, entre los sesquiterpenos, biciclogermacreno, δ -cadineno, β -Cariofileno y Germacreno D. En la Figura 9 se muestra el perfil cromatográfico.

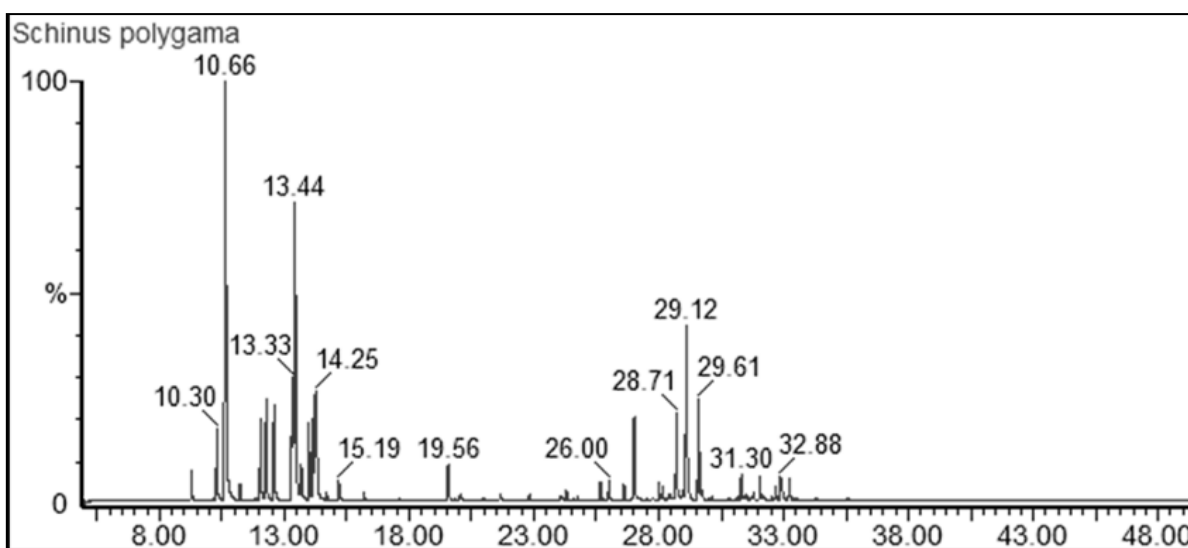


Figura 9. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *S. polygama*.

2.5.2. Respuesta olfatoria de adultos de *C. capitata* a los aceites esenciales:

Ensayos de laboratorio.

La respuesta olfatoria de los individuos a los aceites fue positiva. Para los aceites de *B. spartioides* y *S. areira* más del 68% de los individuos realizaron alguna elección. Por el contrario, se observó que cuando los individuos fueron expuestos al aceite de *S. polygama* un gran porcentaje (>50%) se mantuvo en el tallo del Y-olfatómetro (Figura 10).

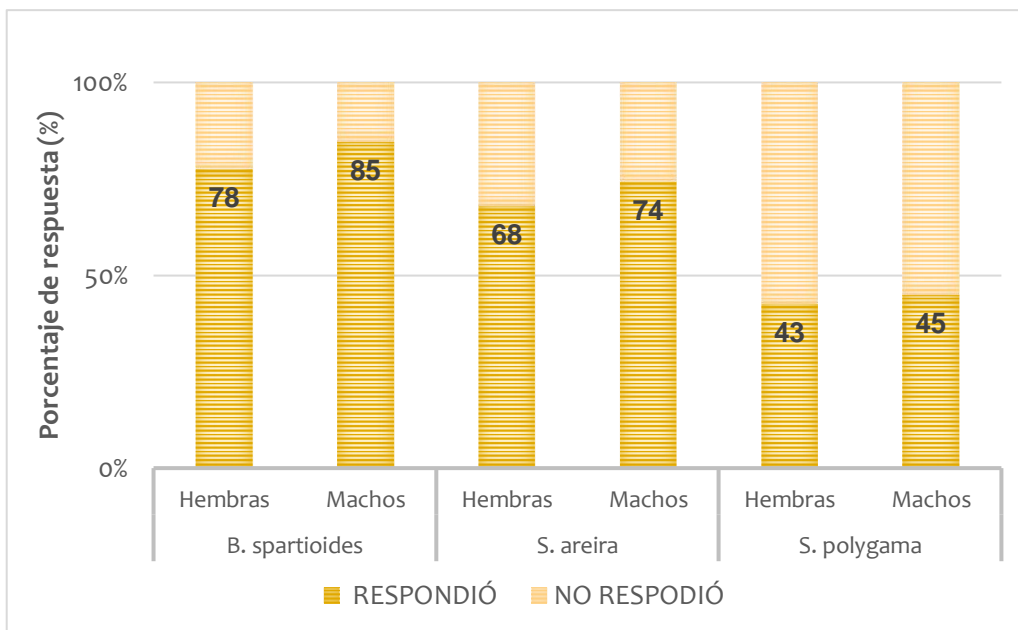


Figura 10. Porcentaje de respuesta realizada por machos y hembras para los distintos tratamientos.

En la tabla 2 se presentan los datos de la proporción de respuesta de machos y hembras para los aceites probados. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de respuesta de machos y hembras para ninguno de los aceites evaluados (*B. spartioides*, $F= 0,32$, $p= 0,570$; *S. areira*, $F=0,38$, $p=0,538$ y *S. polygama*, $F=0,08$, $p=0,774$).

Tabla 2. Proporción de respuesta (media \pm error estándar, N) de machos y hembras de *C. capitata* frente a los 3 aceites evaluados.

Sexo	Aceites Esenciales		
	<i>B. spartioides</i>	<i>S. areira</i>	<i>S. polygama</i>
Macho	0,85 \pm 0,09 (110) ^a	0,74 \pm 0,07 (140) ^a	0,45 \pm 0,05 (158) ^a
Hembra	0,78 \pm 0,08 (112) ^a	0,68 \pm 0,07 (141) ^a	0,43 \pm 0,06 (115) ^a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas.

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la proporción de respuesta de los machos ($F= 8,70$, $p= 0,0002$) y de las hembras ($F= 5,85$, $p= 0,0031$) entre los aceites evaluados (Figura 11).

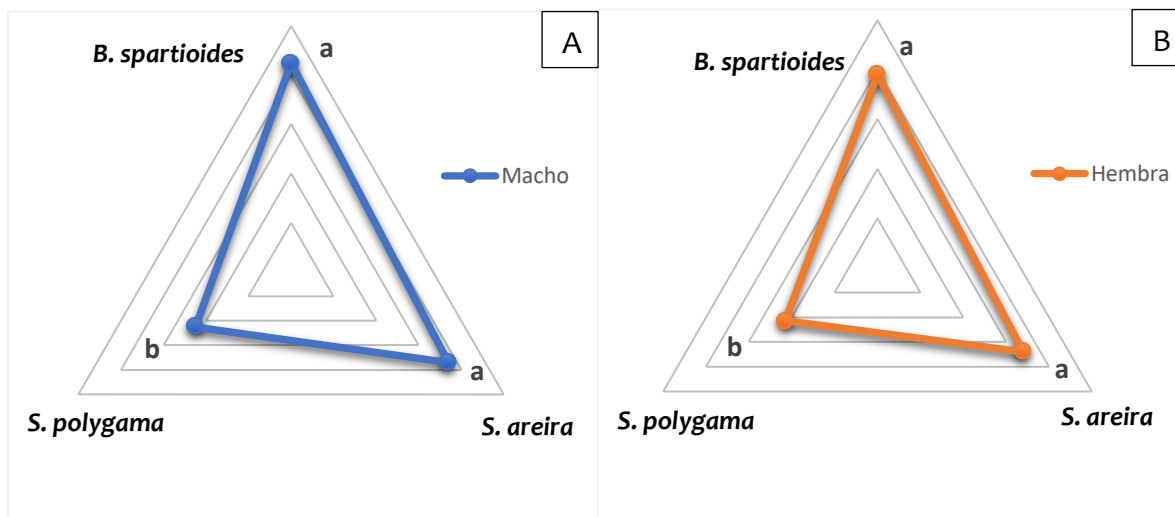


Figura 11. Proporción de respuestas de machos (A) y hembras (B). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

En los ensayos llevados a cabo con los aceites de *B. spartioides* y *S. polygama*, el tiempo medio de permanencia en la rama del aceite esencial para los machos fue de 1,4 y 1,6 veces en relación al permanecido en la rama control, respectivamente. Se observaron diferencias significativas respecto a la preferencia tanto por el aceite de *B. spartioides* ($p=0,028$, $T^2=4,94$) como por el AE de *S. polygama* ($p= 0,002$; $T^2=9,91$), por el contrario, las hembras no se mostraron atraídas por ninguno de estos dos aceites ($p>0,05$). Cuando los individuos fueron expuestos el aceite de *Schinus areira* el tiempo de permanencia en la rama con aceite fue mayor tanto para los machos como para las hembras. Para los machos, el tiempo fue 1,3 veces en la rama aceite, aun así, no se encontraron diferencias significativas en relación a la preferencia por el aceite ($p>0,05$). Las hembras se mostraron atraídas por el aceite ($p=0,040$; $T^2=4,31$), permaneciendo 1,6 veces en la rama del aceite respecto al tiempo permanecido en la rama control. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Tiempo promedio de permanencia de individuos silvestres de *C. capitata* en cada rama del Y-olfatómetro frente a los compuestos volátiles de los aceites esenciales de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama*

Aceite	Sexo	n	Tiempo promedio (s)		T ²	p
			Rama Aceite	Rama Control		
<i>B. spartioides</i>	hembras	87	58,3	50,7	0,56	0,456
	machos	93	63,2	44,3	4,94	0,028
<i>S. areira</i>	hembras	96	68,8	43,0	4,31	0,040
	machos	104	60,7	46,8	3,18	0,077
<i>S. polygama</i>	hembras	49	51,6	46,5	0,51	0,480
	machos	71	60,4	36,5	9,91	0,002

n (número de individuos que hicieron algún tipo de elección)

Con respecto a la frecuencia de distribución de individuos en el Y-olfatómetro frente al AE de *B. spartioides* los machos prefirieron la rama con aceite tanto al inicio como al final del ensayo ($\chi^2= 6,37$, $p= 0,01$ y $\chi^2= 7,05$, $p= 0,008$ respectivamente, mientras que las hembras no mostraron preferencia ($p>0,05$). Resultados similares fueron encontrados para el AE de *S. polygama*. Sólo los machos reflejaron tener preferencia hacia la rama aceite, tanto al inicio como al final de la prueba ($p<0,05$). Por otro lado, cuando los machos fueron expuestos al AE de *S. areira* se observó una preferencia sólo en la elección final ($\chi^2= 4,75$; $p=0,03$), al inicio del ensayo se observó una tendencia hacia la elección de la rama aceite, aunque el número de individuos en esta rama fue mayor, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). El comportamiento de las hembras con el aceite de *S. areira*, tanto al inicio como al final del ensayo, mostró una preferencia hacia la rama con aceite esencial ($p<0,05$). Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Frecuencia de elecciones en el Y-olfatómetro frente al estímulo químico de los volátiles de los aceites esenciales de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama* al comienzo y final del ensayo.

Aceite	Sexo	Elección	Ramas		χ^2	p
			AE	control		
<i>B. spartioides</i>	hembra	inicial	46	41	0,29	0,59
		final	43	42	0,01	0,91
	macho	inicial	56	37	3,88	0,05
		final	57	34	5,81	0,01
<i>S. areira</i>	hembra	inicial	58	38	4,17	0,04
		final	55	38	3,11	0,08
	macho	inicial	60	44	2,46	0,12
		final	62	40	4,75	0,03
<i>S. polygama</i>	hembra	inicial	27	22	0,51	0,47
		final	26	22	0,33	0,56
	macho	inicial	46	25	6,21	0,01
		final	42	23	5,55	0,02

2.5.3. Respuesta olfatoria de adultos de *C. capitata* a los aceites esenciales: Ensayos de semicampo.

En la tabla 5 se presentan los resultados de las elecciones de los individuos de *C. capitata* cuando se probaron bajo condiciones seminaturales los aceites esenciales de *S. areira* y *S. polygama*. Se observó que los individuos de ambos sexos no respondieron ante el aceite de *S. areira*, la respuesta fue menor al 10% del total probado. Por el contrario, los machos de *C. capitata* mostraron una fuerte atracción ($p < 0,0001$, $\chi^2 = 59,2$) hacia el aceite de *S. polygama*; reforzando estos resultados a los obtenidos en los ensayos realizados en el Y-olfatómetro.

Tabla 5. Frecuencia de elecciones en las jaulas de campo frente al estímulo químico de los volátiles de los aceites esenciales de *S. polygama*.

Aceite	Sexo	N	Elección		x ²	p
			AE	Control		
<i>S. areira</i>	♀	120	2	5	1,3	0,25
	♂	120	0	3	sd	sd
<i>S. polygama</i>	♀	120	6	8	0,3	0,5
	♂	120	85	10	59,2	<0,0001*

2.6 Discusión

Comprender las interacciones insecto-planta es de interés no solo desde una perspectiva ecológica y evolutiva, sino también para el desarrollo de nuevas estrategias de protección de cultivos, ya sea diseñando o seleccionando plantas de cultivo para resistencia endógena a plagas de insectos, tratando cultivos con semioquímicos para hacerlos menos atractivos (Bruce, et al., 2005) o siendo implementados para desarrollar nuevas tecnologías de control (por ej. cebos).

En este capítulo fue posible evaluar la preferencia de la mosca de la fruta frente a aceites esenciales de tres plantas nativas, mediante métodos olfatométricos, en condiciones de laboratorio y de semi-campo.

Del análisis químico de los aceites, se observó que sus constituyentes varían entre las especies en número, identidad y cantidades relativas de sus componentes. Los constituyentes que se encontraron en mayor proporción fueron monoterpenos (>65%) en todos los casos, los sesquiterpenos superaron el 25% en los AEs del género *Schinus*, para *B. spartioides* solo un 7% estuvo representado por este tipo de compuestos. Estas clases de constituyentes se encuentran presentes en flores y frutos de una amplia gama de especies vegetales que son hospederos de la mosca del Mediterráneo.

El reconocimiento de una planta huésped por señales olfativas podría ocurrir utilizando compuestos característicos de especie o relaciones específicas de compuestos ubicuos (Rani, 2015; Pickett, et al. 2012) debido a que a menudo existe redundancia en la composición de mezclas reconocidas como hospederos ya que ciertos compuestos

pueden ser sustituidos por otros (Bruce y Pickett, 2011). Estas son las propiedades que alientan a indagar sobre volátiles que pudiesen modificar comportamientos de insectos plaga.

Los aceites de *B. spartioides* y *S. polygama* resultaron ser atractivos de machos en ensayos de laboratorio. Entre sus constituyentes, se identificaron 20 compuestos en común, incluyendo 1 hidrocarburo alifático, 16 monoterpenos y 3 sesquiterpenos. Es conocido el hecho que compuestos de estos tipos provocan una respuesta en la mosca del Mediterráneo. En estudios que involucran análisis de electroantenografía se encontró que los monoterpenos; α -Terpineno, α -Pino y Mirceno, actúan como inductores de registros electroantegráficos en ambos sexos (Light, et al., 1992). Además, Limoneno y p-Cimeno han sido reportados con propiedades atractivas de adultos de *C. capitata* (Hernández-Sánchez, et al., 2001). Asimismo, el α -Felandreno, β -Pino, α -Terpineno y γ -Terpineno son monoterpenos que presentaron actividad en capturas en ensayos de campo sobre ambos sexos de *C. capitata* (Casaña-Giner, et al., 2001). Estos monoterpenos se encuentran presentes en los AEs aquí evaluados.

Casaña-Giner et al. (2001) evaluaron la atracción a un grupo de 50 compuestos, encontrando que el p-Cimeno, es uno de los monoterpenos que atrajo significativamente más hembras que machos. De 3 AEs aquí evaluados, este compuesto se encuentra presente sólo en el AE de *S. areira*, lo que podría explicar, al menos en parte, la respuesta positiva de las hembras hacia este aceite. Además, Jofre Barud, et al. (2014) encontraron que el AE de *B. spartioides* atrajo de manera significativa a hembras de *C. capitata*, encontrándose también al p-Cimeno como un componente del AE. Esto último difiere de los resultados hallados en esta tesis, lo cual podría atribuirse a una diferencia en las composiciones entre el AE evaluado por ellos y en este trabajo. Se destacan diferencias cuali- y cuantitativas fundamentalmente en la fracción que asumen los sesquiterpenos, la cual fue mayor en el AE evaluado en esta tesis. Tales diferencias podrían explicarse por el origen del material vegetal, el cual provino de poblaciones distintas.

Por otro lado, existen antecedentes que los machos de *C. capitata* son atraídos por el aceite de la raíz de jengibre (Nishida, et al. 2000; Niogret, et al. 2011) considerando a uno

de sus constituyentes, el α -copaeno, como el sesquiterpeno responsable de esta preferencia. Niogret, et al. (2017) al evaluar la atractividad de seis aceites esenciales naturales en comparación con TML, encontraron que el AE más efectivo en campo en la captura de machos fue el aceite de la raíz de jengibre. Sin embargo, estos resultados difirieron con los hallados por los mismos autores cuando las pruebas se realizaron en laboratorio, donde la respuesta a este aceite fue menor que a todos los demás aceites esenciales probados (Niogret, et al., 2017).

En la presente tesis, con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio, se evaluó la preferencia de los AEs de *S. areira* y *S. polygama* en condiciones de semi campo, donde se observó que los machos se vieron fuertemente atraídos hacia *S. polygama*, en concordancia con lo observado en laboratorio. Por el contrario, las hembras no mostraron preferencia hacia el AE de *S. areira* cuando se evaluaron bajo esas condiciones.

La discrepancia en estos resultados podría manifestarse porque la liberación de los diferentes componentes de los AEs es diferente bajo estos 2 sistemas. A modo de observación personal, cuando el AE de *S. polygama* fue probado bajo condiciones seminaturales, la respuesta de los machos de *C. capitata* ocurría inmediatamente en el momento que se colocaba la fuente con el aceite dentro de la jaula. Lo cual, podría estar marcando que los responsables de tal atracción sean los elementos más volátiles de la mezcla del AE.

2.7 Conclusiones

La composición de los AEs estuvo representada principalmente por mono- y sesquiterpenos, en proporciones variables tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Con relación a la respuesta comportamental de atracción, los adultos de *C. capitata* respondieron positivamente hacia los AEs. Una alta proporción de individuos (>70%) realizaron algún tipo de elección cuando fueron expuestos a los AEs de *B. spartioides* y *S. areira*, para el AE de *S. polygama* esta proporción fue menor (<50%).


Existe un efecto del sexo en la respuesta de atracción hacia los AEs.

El AE de *B. spartioides* es un atrayente de machos silvestres de *C. capitata* bajo condiciones de laboratorio.

El AE de *S. areira* es un atrayente de hembras silvestres de *C. capitata* bajo condiciones de laboratorio.

El AE de *S. polygama* es un atrayente de machos silvestres de *C. capitata* tanto en condiciones de laboratorio como condiciones seminaturales.

Los aceites esenciales de plantas nativas de la flora aromática de San Juan cuentan con el potencial de actuar como semioquímicos naturales de machos y hembras silvestres de *C. capitata*.



CAPÍTULO III:
RESPUESTA COMPORTAMENTAL DE
C. CAPITATA FRENTE A LOS ACEITES
ESENCIALES: APAREAMIENTO Y
OVIPOSICIÓN

3.1. Introducción

3.1.1. **Comportamiento sexual de la mosca de la fruta**

El éxito reproductivo de numerosas especies gira en torno a las habilidades de los adultos para decidir cuándo buscar recursos nutricionales, cuándo invertir tiempo en la reproducción (buscar pareja, copular, ovipositar) y cuándo desistir por completo (Bell 1990). Estas decisiones a menudo se desencadenan por umbrales fisiológicos que dictan o regulan la expresión de un comportamiento específico. En general, la secuencia reproductiva de los tefrítidos contiene los siguientes elementos: exhibición y cortejo por parte de los machos, cópula, inseminación, fertilización y oviposición (Sivinski y Burk 1989).

En la familia Tephritidae, es común el sistema de apareamiento con formación de leks por parte de los machos (Sivinski, 2000). En este tipo de sistema, los machos se agrupan y emiten señales para atraer a las hembras y aparearse. Los machos se aglomeran durante la madrugada y comienzos de la tarde en las copas de los árboles hospederos y defienden las hojas individuales como su territorio de apareamiento, desde donde producen un conjunto de señales olfativas (liberación de feromonas), auditivas y visuales que atraen a las hembras (y a otros machos) al área de lek (Yuval & Hendrichs, 2000). Así, el sitio elegido, al mismo tiempo que proporciona una plataforma efectiva desde la cual transmitir las señales de cortejo, debe proporcionar protección óptima contra depredadores, viento, luz solar directa y pérdida de agua (Kaspi y Yuval, 1999). Por ello, los factores importantes en la selección del sitio dentro del árbol podrían ser abióticos (temperatura, humedad relativa, intensidad de luz) (Prokopy y Hendrichs 1979) y bióticos (como el riesgo de predación) (Hendrichs, *et al.*, 1994; Hendrichs y Hendrichs 1990; 1998), así como la proximidad a los recursos nutricionales y sitios de oviposición.

Usualmente los leks consisten en 3 a 10 machos agrupados en un área de 30 cm aproximadamente, cada uno en una hoja separada. Las interacciones macho-macho ocurren estableciendo y defendiendo su territorio individual. Más tarde las hembras son

atraídas al lek. Estas permanecen en la periferia y hacen visitas a los territorios individuales.

Así, para obtener cópulas, los machos deben competir con los machos rivales por el acceso a las hembras (Yuval & Hendrichs, 2001). Si la hembra lo acepta, el macho se monta. El macho realiza varios movimientos copulatorios que le permite liberar los espermatozoides, los cuales son transportados por los conductos espermatecales y se almacenan en órganos especializados, las espermatecas, (Eberhard, et al. 2001), donde presumiblemente se nutren y se movilizan cuando es necesario para la fertilización.

Según una revisión hecha por Eberhard (2001), la cópula suele durar entre 90 y 195 min, pero algunas cópulas duran 15 min. o menos. Las cópulas cortas (<15 min) no resultan en la transferencia de esperma. La transferencia de espermatozoides al tracto reproductivo de la hembra y la llegada a sus espermatecas es aparentemente gradual durante los primeros 90 min. de cópula. También se ha informado una falta completa de transferencia de espermatozoides después de 100 minutos (Eberhard, 2001).

La interacción directa entre el macho y la hembra termina una vez que el macho retira sus genitales, pero los efectos de la cópula sobre el comportamiento y la fisiología de las hembras persisten después de que las moscas se separan. Así, antes de volverse grávidas, las hembras visitan con poca frecuencia la fruta; esencialmente lo hacen para alimentarse. Sin embargo, el apareamiento provoca una reducción en la atracción de la hembra al olor de la feromona del macho y un aumento en su atracción por el olor de la fruta (Levinson et al., 1990). Este cambio en el comportamiento es atribuido a los efectos de los productos de glándulas accesorias masculinas transferidos en el semen (Jang, 2002). Jang (1995), al inyectar extractos de glándulas accesorias en hembras vírgenes maduras de *C. capitata*, demostró un cambio dramático y casi inmediato de la feromona masculina al comportamiento olfativo orientado al huésped, a pesar de que estas hembras nunca se habían apareado o recibido espermatozoides.

El éxito reproductivo está fuertemente influenciado por la habilidad de la hembra para localizar y ovipositar en frutos de las especies hospedadoras que permitan el desarrollo y supervivencia de la larva (Ioannou, et al., 2012). La detección del huésped es una secuencia de respuestas combinadas olfativas (Schoonhoven 1983; Levinson et al., 1990)

y visuales (Sanders, 1968; Katsoyannos, 1989). A su llegada a las plantas hospedantes, las características visuales juegan un papel importante en la detección y selección de las frutas. Para ubicar una fruta individual, las hembras grávidas emplean una variedad de caracteres de las frutas, como la forma, el tamaño y el color.

Al aterrizar en una fruta, las hembras evalúan si es aceptable para poner huevos en función de las características físicas (estructura superficial, calidad y condición del fruto) perceptibles por estímulos táctiles, y características de la química superficial (tanto olores de fruta de corto alcance como presencia o ausencia de feromona de marcado) perceptible por estímulos olfatorios (Schoonhoven 1983, McDonald y McInnis 1985, Averill y Prokopy 1989, Prokopy y Roitberg 1989).

Los avances en nuestro conocimiento de estos procesos y su control serán la clave para el desarrollo de estrategias que se dirijan a métodos de control que busquen la modificación de comportamientos para ser implementados contra estas plagas.

3.1.2. Técnica del Insecto Estéril (TIE)

El principal método de control, y probablemente el más eficaz, que se ha implementado para el control de la mosca de la fruta del Mediterráneo es la técnica del insecto estéril (TIE) (Klassen y Curtis, 2005) o también llamado control autocida. Esta técnica se basa en la cría masiva, esterilización y liberación de machos que, al copular con hembras silvestres, interrumpen el ciclo biológico en la naturaleza (Knipling 1955).

En la actualidad, todos los programas de TIE contra *C. capitata* incluyen exclusivamente liberaciones de machos y esto se logró mediante el desarrollo de cepas de sexado genético (GSS, por sus siglas del inglés “*Genetic sexing strains*”). Las cepas de sexado genético ofrecen una separación fácil y segura de los machos durante los procesos de cría, utilizando el color de la pupa y la presencia de genes letales sensibles a la temperatura (*tsl*, por sus siglas en inglés “*temperature-sensitive lethal*”) como marcadores seleccionables (Hendrichs, et al. 1995). Entre los diferentes GSS que se han desarrollado para la mosca mediterránea de la fruta, la variedad Vienna 8 (*tsl*) se utiliza actualmente en la mayoría de las instalaciones de cría en masa y en los programas TIE de todo el mundo. (Kouloussis, et al. 2017).

A diferencia de otros métodos con base biológica, la TIE es específica a nivel de especie, no transfiere agentes exóticos hacia nuevos ambientes y ni siquiera introduce nuevo material genético dentro de las poblaciones existentes debido a que los organismos liberados no se pueden auto replicar. Los programas TIE contra la mosca mediterránea de la fruta se están implementando en diferentes partes del mundo como método de prevención, supresión o erradicación (Linguist, 2000; Hendrichs *et al.*, 2002; Hendrichs *et al.*, 2005).

En consecuencia, las moscas estériles deben ser capaces de establecer o unirse a las agregaciones de apareamiento (leks), producir señales de cortejo que atraigan a las hembras y copular con ellas. Por ello, el éxito de este método depende de varios factores, uno de los más importantes es que la mosca criada en laboratorio sea compatible con la silvestre y sea competitiva en el apareamiento. Así mismo, la eficacia de esta técnica es mucho mayor cuando las poblaciones silvestres de *C. capitata* son bajas, por lo que su utilización ha de ser complementada con otros métodos de control (Barry, *et al.* 2004).

Desafortunadamente, los machos de colonias de laboratorio de cría masiva son a menudo inferiores que los machos silvestres, aparentemente porque sus comportamientos son menos efectivos (Briceño, *et al.* 2007). Los efectos de la colonización en el laboratorio, los entornos artificiales de crianza, los procedimientos de esterilización (por ej. la irradiación), el envío y manipulación pueden hacer que los comportamientos de apareamiento de los machos estériles difieran de los comportamientos de los machos silvestres (Shelly, *et al.* 2004, Lux *et al.* 2002). Por ejemplo, en el campo, los machos silvestres de la mosca del Mediterráneo compiten para unirse a los leks en las partes del árbol donde ocurre la mayor parte del apareamiento con las hembras silvestres, pero los machos criados en masa a menudo no seleccionan un lugar específico (Cayol *et al.* 1999). Existen antecedentes que demuestran que los machos estériles obtienen menor número de copulas que los machos silvestres a la hora de competir por una hembra silvestre (Shelly *et al.*, 2004; Jang, *et al.* 2003).

Los programas que implementan la TIE, enfrentan este problema liberando a campo una proporción muy alta de machos estériles por cada macho silvestre, para asegurar una mayor probabilidad de que el macho estéril sea aceptado para el apareamiento por la hembra silvestre. Los machos liberados deben estar en proporción 100 por cada macho silvestre (Jang, et al. 2003).

En las últimas décadas, se inició la búsqueda de herramientas que permitan una mejora en la competitividad de los machos de cría de moscas de la fruta. Existen antecedentes sobre la exposición de machos de algunos tefrítidos a sustancias químicas vegetales, tanto de hospederos como no hospederos, y su influencia en el comportamiento sexual. De este modo, se ha observado que la competitividad sexual de los machos estériles se puede aumentar mediante la exposición de los mismos a ciertos compuestos químicos (Shelly et al., 2005), el agregado de proteína en la dieta del adulto (Yuval, et al. 2007) o el uso de cepas seleccionadas para ser más competitivas.

Por ejemplo, la exposición a algunos frutos hospederos ha causado una ventaja en el éxito de apareamiento en machos tratados. Tal es el caso de la exposición a guayaba, de machos de laboratorio y silvestres, de *Anastrepha fraterculus* que incrementa el éxito de apareamiento en comparación con machos no expuestos (Vera et al. 2010; Bachmann et al. 2015). Por su parte, la exposición de machos estériles de *C. capitata* a los aceites esenciales de distintas variedades de cítricos, así como al aceite esencial de la raíz de jengibre (GRO, del inglés Ginger Root Oil), resulta en una mejora en el éxito de apareamiento de los machos tratados frente a los no tratados (Kouloussis et al. 2010, Shelly et al. 2001; Shelly, 2007; Briceño, et al. 2007, Shelly y McInnis 2001). Por otro lado, Juan-Blasco et al. (2011) evaluaron la exposición a constituyentes comunes de los aceites esenciales de cítricos, encontrando que el linalool otorga una ventaja para el apareamiento frente a machos no expuestos, mientras que el limoneno no tuvo tales efectos. Sobre esta base, Jofré Barud et al. (2014), han demostrado en ensayos de laboratorio que los aceites esenciales de *Baccharis spartioides* y *Schinus polygama*, también promueven una ventaja para el apareamiento a los machos tsl Vienna 8 frente a machos sin tratar.

Actualmente algunas bioplasmas (así se conoce a las fábricas donde se crían en forma masiva a los insectos) exponen los machos al GRO antes de su liberación para mejorar su competitividad frente a los machos silvestres (Juan-Blasco *et al.* 2011).

Por lo tanto, todo avance en el conocimiento de los factores que modulan el éxito de los machos será ventajoso al momento de desarrollar y transferir herramientas que incrementen la eficacia de la TIE (Hendrichs *et al.* 2002; Robinson *et al.* 2002; Robinson y Hendrichs, 2005).

El objetivo de este capítulo fue determinar si los aceites elegidos influyen en el comportamiento sexual de adultos de *C. capitata*, mediante ensayos de cópula y de oviposición.

3.2. Hipótesis

- ✓ Los aceites esenciales de plantas nativas mejoran la competitividad sexual de machos de la mosca de los frutos.
- ✓ Los aceites esenciales alteran el comportamiento de oviposición de hembras de *C. capitata*.

3.3. Objetivos específicos:

1. Evaluar el potencial de los aceites como estimuladores de la persuasión sexual de machos sobre hembras.
2. Determinar la influencia de los aceites esenciales como estimulantes o disuasivos de la oviposición de las hembras.

I. **Evaluación de la influencia de los aceites esenciales de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama* sobre el éxito de apareamiento de *C. capitata*.**

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. **Evaluación de los aceites como estimuladores de la persuasión sexual de machos sobre hembras**

Este objetivo se llevó a cabo mediante la realización de ensayos de competitividad, bajo 3 diseños diferentes: Ensayos de competitividad en laboratorio, Ensayos de competitividad en jaulas de campo con machos fértiles (de cría pero no silvestres) y Ensayos de competitividad en jaulas de campo con machos silvestres (salvajes y fértiles).

3.4.1.1. **Ensayos de competitividad en laboratorio.**

Tomando como antecedente los resultados de Jofré Barud *et al.* (2014), se evaluó la influencia de los aceites esenciales *B. spartioides* y *S. polygama* sobre el éxito de apareamiento de machos estériles cuando competían con machos fértiles por una hembra fértil. Adicionalmente, se evaluó el aceite de raíz de *Zingiber officinale* (jengibre) como testigo positivo, ya que los antecedentes muestran un efecto positivo sobre el éxito de apareamiento de *C. capitata*. En el Anexo II se encuentra el modo de extracción y la composición del AE de jengibre utilizado para los ensayos de competitividad.

3.4.1.1.1. Material biológico

Los individuos fértiles fueron provistos por el INTA Castelar (Buenos Aires) de una colonia de laboratorio establecida bajo cría relajada. Los machos estériles pertenecieron a 2 cepas diferentes; 1. la cepa de sexado genético (*tsI*), 2. la cepa Bisexual-Mendoza, ambos provistos por el ISCAMen (Mendoza). Ambas cepas son provenientes de colonias de cría masiva. En la tabla 6 se muestran las características de cada cepa; su origen, nombre de la cepa, nombre (nomenclatura otorgada), tipo de cría (masiva o relajada, esto último es en condiciones de menor densidad) y esterilidad. Las moscas fueron evaluadas a partir de los 7-8 días de edad, contemplando que ya son maduras sexualmente.

Tabla 6. Características de las cepas con las cuales se trabajó.

Origen	Cepa	Nombre	Tipo de cría	Irradiación (esterilidad)
Mendoza	tsl-Viena 8	tsl	Masiva	SI
Mendoza	Bisexual-Mendoza	Mendoza	Masiva	SI
Buenos Aires	Bisexual-Castelar	Castelar	Relajada	NO

3.4.1.1.2. Tratamientos

Se realizaron diferentes combinaciones de machos para competir por una hembra fértil. Inicialmente, se evaluó, si los machos expuestos a los volátiles del aceite esencial son preferidos por las hembras para el apareamiento por sobre machos no expuestos de su misma cepa con la finalidad de conocer el potencial del aceite para modificar este comportamiento (efecto aceite). Posteriormente, en vista de los resultados obtenidos, se evaluó la competencia de machos estériles vs machos fértiles, para evaluar si el efecto positivo persiste cuando el macho con el que compete pertenece a otra cepa, esto nos permite conocer el potencial del aceite para la implementación bajo un sistema TIE (contexto TIE). En la tabla 7 se muestran las combinaciones realizadas de los machos en función de la pregunta (efecto aceite o contexto TIE), se trabajó con machos tratados (expuesto a aceite esencial) vs no tratados (sin exponer).

Tabla 7. Combinaciones de aceites, cepas evaluadas y la pregunta asociada

Aceite	Combinación de machos	Cepa hembras	Pregunta
<i>B. spartioides</i> , <i>Z. officinale</i> <i>S. polygama</i>	Castelar vs Castelar	Castelar	Efecto aceite
<i>B. spartioides</i> , <i>Z. officinale</i> <i>S. polygama</i>	Mendoza vs Mendoza	Castelar	Efecto aceite
<i>B. spartioides</i> , <i>Z. officinale</i> <i>S. polygama</i>	tsl vs tsl	Castelar	Efecto aceite
<i>B. spartioides</i> , <i>Z. officinale</i> <i>S. polygama</i>	tsl vs Castelar	Castelar	Contexto TIE
Sin exposición	tsl vs Castelar	Castelar	Control

3.4.1.1.3. Diferenciación de los machos

Con el fin de diferenciar los machos expuestos a los volátiles del aceite esencial, de los machos no expuestos, se colocó una gota de pintura al agua sobre el tórax, el día anterior a la exposición al aceite (Figura 12).



Figura 12. Machos de C. capitata marcados con pintura de color para reconocer el tratamiento aplicado en los ensayos de apareamiento.

3.4.1.1.4. Exposición a los aceites

El día anterior al ensayo de apareamiento se colocaron 80 machos en un frasco de vidrio de 3 L donde se introdujo un microtubo de vidrio que contenía 20 μ L del aceite esencial durante 1 h 30 min. Estos machos fueron los machos tratados (Figura 13). En otro frasco fueron apartados los machos no tratados bajo las mismas condiciones, pero sin exposición al aceite. A ambos frascos (tratados y control) se les retiró la comida y el agua durante el tiempo de exposición, y una vez finalizada la exposición, fue restituida. Los machos se mantuvieron en habitaciones separadas, una para cada uno de los respectivos AE y una para los no expuestos.

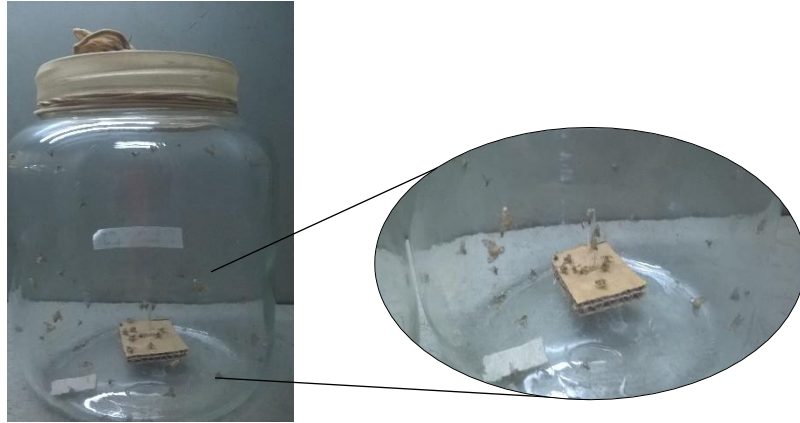


Figura 13. Sistema de exposición a los volátiles de los AEs.

3.4.1.1.5. Ensayo de apareamiento

El ensayo se realizó en recipientes de plástico de 1 L (Figura 14). Se colocó un macho de cada tipo (tratado y no-tratado) por recipiente, y pasados 15 minutos se liberó la hembra, momento en el cual se dio por iniciado el ensayo. Cada vez que una cópula ocurría se registró el tipo de macho exitoso (identificándolo por el color) y la hora de inicio. Se retiró el macho no exitoso y se revisó cada 5 minutos hasta observar que la cópula haya finalizado, tomando registro de la hora en que ello sucedió.



Figura 14. Recipientes utilizados para el ensayo de apareamiento, donde se pusieron a competir un macho estéril frente a un macho fértil por una hembra fértil.

3.4.1.1.6. Análisis de datos

Las variables registradas fueron el número de cópulas para cada tipo de macho, latencia (tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta el momento en que se formaron las parejas) y duración de la cópula. Los datos fueron analizados con χ^2 para número de parejas. Teniendo en cuenta la naturaleza de los datos de latencia y duración de cópula fueron analizados con el test no paramétrico Kruskal Wallis. En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia del 5%. ($\alpha=0,05$) y se utilizó el software Infostat/Versión profesional, 2017.

3.4.1.2. **Ensayos de competitividad en jaulas de campo: macho estéril vs macho fértil.**

Las jaulas de campo son el mejor compromiso entre condiciones de laboratorio y observaciones de campo para evaluar el comportamiento en el apareamiento de las moscas de la fruta bajo condiciones seminaturales. Es por ello que se propuso la utilización de estas jaulas para obtener estimaciones extrapolables a condiciones naturales.

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos de competitividad en laboratorio, se evaluó en condiciones seminaturales (jaulas de campo) la influencia del AE de *S. polygama* sobre el éxito copulatorio de machos de *C. capitata* estériles al competir con machos fértiles por una hembra fértil.

3.4.1.2.1. Material biológico

Se trabajó con individuos de laboratorio provistos por ISCAMEN. Los individuos estériles provinieron de la cepa de sexado genético *tsl*, mientras que los fértiles fueron de la cepa Bisexual-Mendoza. Los individuos estériles fueron usados entre los 4 y 7 días de edad, mientras que los fértiles fueron evaluados entre los 7 y 10 días.

3.4.1.2.2. Tratamientos

A continuación, se presentan las combinaciones realizadas detallando la nomenclatura otorgada y los individuos involucrados. En todos los casos las hembras pertenecieron a la cepa Bisexual-Mendoza (las hembras fueron entregadas en estado fértil).

- ❖ **tsl AE-tsl:** Machos estériles expuestos a volátiles del AE vs machos estériles sin exponer.
- ❖ **tsl AE-fértil:** Machos estériles expuestos a volátiles del AE vs machos fértiles.
- ❖ **tsl sin exponer-fértil:** Machos estériles sin exponer vs machos fértiles: control.

3.4.1.2.3. Ensayo de apareamiento

El estudio se realizó en el campo experimental de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán. La diferenciación de los individuos y la exposición al aceite de *S. polygama* se siguió bajo los mismos protocolos detallados anteriormente para los ensayos de laboratorio.

La prueba de competitividad siguió los lineamientos generales del Manual de Control de Calidad (FAO/IAEA/USDA). Se trabajó con jaulas de campo a la intemperie donde cada jaula estaba provista de varios plantines de limón de manera de proveer el follaje necesario para las cópulas (Figura 15). Se liberaron primero los machos estériles y los machos fértiles (a razón de 30 individuos) y quince minutos más tarde se liberaron las hembras (30 individuos). El ensayo consistió en la observación directa dentro de cada jaula, en el momento que una pareja era divisada, se la colocó dentro de un tubo Khan, con el cuidado necesario para no interrumpir la cópula. Se registró el origen del macho, la hora de inicio y la hora de fin de la cópula. Además, se registró el sitio donde se localizó la pareja, a saber: Altura: **Alto, Medio y Bajo**; en la jaula: **Techo, Pared y Suelo**; en el árbol: cara **Superior** de la hoja, cara **Inferior** de la hoja y **Tronco**. Las parejas fueron mantenidas a la sombra dentro de la jaula hasta que se separaron.



Figura 15. **A.** Jaulas de campo dispuestas a la intemperie. **B.** Individuos en cópula.

3.4.1.2.4. Análisis de datos

Para cada combinación se realizaron al menos cinco repeticiones. Para cada repetición se estimó el valor de χ^2 de Bondad de Ajuste a una proporción esperada dónde el número de cópulas para cada combinación de macho y hembra se produjo al azar. Se estimó el χ^2 total y la heterogeneidad entre repeticiones. Cuando las repeticiones dentro de una combinación fueron homogéneas se sumaron las cópulas de todas las repeticiones dentro de dicha combinación y se estimó el χ^2 total. Cuando las repeticiones fueron no homogéneas se interpretaron los resultados de cada repetición en forma separada. El análisis global entre tratamientos se hizo mediante ajuste a un modelo mixto donde el macho exitoso (expuesto vs no expuesto) fue el factor fijo, la combinación de día y jaula el factor aleatorio y la variable respuesta fue el número de cópulas para cada combinación. Además, se estimó el valor de Índice de Esterilidad Relativa (RSI, por sus siglas en inglés) siguiendo los lineamientos del Manual de Control de Calidad (FAO/IAEA/USDA 2014).

$$RSI = \frac{N(tsl)}{N(tsl) + N(fértil)}$$

N(tsl); número de cópulas obtenidas por machos tsl.

N (fértil); número de cópulas obtenidas por machos fértiles.

Los valores de RSI pueden variar de 0 a 1, donde 0 indica que todas las hembras silvestres que se aparearon en la jaula lo hicieron con machos silvestres; 1 indica que todas las

hembras se aparearon con machos estériles, y 0,5 que los machos estériles son igualmente competitivos con machos silvestres (FAO/IAEA/USDA 2014).

La latencia y duración de las cópulas fueron evaluadas mediante modelos mixtos para cada combinación de cepas y sexos donde el origen del macho fue el factor fijo y el día y la jaula los factores aleatorios.

3.4.1.3. Ensayos de competitividad en jaulas de campo: macho estéril vs macho silvestre.

Con base en los resultados positivos en cuanto a la mejora del éxito de apareamiento de *C. capitata* por exposición al AE en condiciones seminaturales, se evaluó la influencia de los aceites esenciales de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama* en jaulas de campo poniendo a competir machos estériles vs machos silvestres por hembras silvestres. Adicionalmente como control positivo se evaluó el efecto del aceite de la raíz de *Z. officinale* (GRO).

3.4.1.3.1. Material biológico

Los individuos estériles (cepa *tsl*) fueron provistos por el ProCEM- San Juan. El material silvestre fue obtenido de fruta larvada (higos y duraznos). Las moscas silvestres fueron utilizadas con 9-13 días de edad mientras que los machos *tsl* fueron evaluados con 6 días de edad.

Desde la emergencia los individuos silvestres fueron alimentados con dieta de cría (azúcar e hidrolizado de levadura en una relación 3:1). Para los machos *tsl* se realizaron dos tratamientos de dieta de liberación (azúcar e hidrolizado de levadura 12:1) y dieta de cría.

3.4.1.3.2. Tratamientos

A continuación, se presentan las combinaciones realizadas detallando la nomenclatura otorgada y los individuos involucrados. En todos los casos las hembras fueron silvestres.

- ❖ **Control:** equivalente a un área con liberación de *tsl* sin exponer (*tsl*-fértil): 30 machos *tsl*, 30 machos silvestres y 30 hembras silvestres.

- ❖ **Jengibre:** Área con liberación de *tsl* expuesto a AE de *Zingiber officinale*: 30 machos *tsl* expuestos, 30 machos silvestres y 30 hembras silvestres.
- ❖ **S. areira:** Área con liberación de *tsl* expuesto a AE de *Schinus areira*: 30 machos *tsl* expuestos, 30 machos silvestres, 30 hembras silvestres.
- ❖ **B. spartioides:** Área con liberación de *tsl* expuesto a AE de *Baccharis spartioides*: 30 machos *tsl* expuestos, 30 machos silvestres y 30 hembras silvestres.
- ❖ **S. polygama:** Área con liberación de *tsl* expuesto a AE de *S. polygama*: 30 machos *tsl* expuestos, 30 machos silvestres y 30 hembras silvestres.

Los aceites de jengibre y *S. areira* fueron evaluados bajo dos condiciones de dieta, dieta de liberación y dieta de cría.

3.4.1.3.3. Diferenciación de machos

En este caso, la diferenciación de los machos se realizó mediante el suministro de dietas coloreadas con colorantes para torta Circe®. Conforme a ensayos preliminares del grupo de investigación se comprobó que el agregado de colorante a la dieta es efectivo para la diferenciación de los machos y no se han observado efectos adversos sobre los individuos (Figura 16).

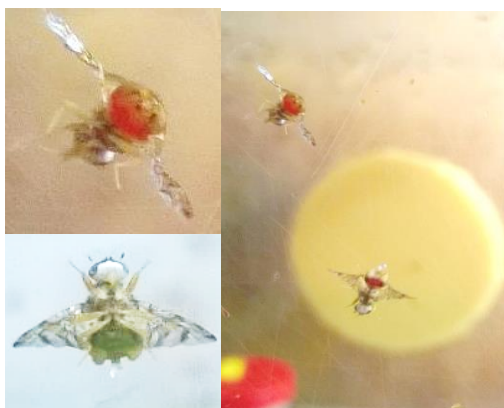


Figura 16. Machos de *C. capitata* diferenciados por suministro de dieta coloreada para reconocer el tratamiento aplicado en los ensayos de apareamiento.

3.4.1.3.4. Ensayo de apareamiento

Los ensayos de apareamiento tuvieron lugar en el predio correspondiente a Sanidad Vegetal de la Provincia de San Juan, donde se encuentran las instalaciones de la Bioplanta y el ProCEM-San Juan. Las pruebas se llevaron a cabo bajo los mismos

protocolos que los descriptos anteriormente (ítem 3.4.1.2.3). Se dispuso de 3 jaulas de malla plástica blanca y entramado grueso y 3 jaulas de entramado fino de color marrón, por lo tanto, la distribución de los tratamientos se hizo bloqueando el efecto posible dado por la diferencia entre tipos de jaulas. Para ello se asignó siempre una réplica a una jaula blanca y otra réplica del mismo tratamiento a una jaula marrón.

Además, teniendo en cuenta que un primer set de datos mostró que el desempeño de los machos *tsl* expuestos al AE de *S. areira* fue menor al desempeño de los machos sin exponer, se evaluó si la calidad nutricional de la dieta podía contribuir a mejorar el efecto de potenciación. De esta forma la dieta del macho *tsl* consistió en la misma con la que se alimentaron a los machos silvestres y a las hembras, que fue la dieta de cría donde el azúcar e hidrolizado de levadura se encuentran en una relación 3:1. El diseño experimental contempló la evaluación de una situación control en la que los machos *tsl* fueron alimentados con la misma dieta que el macho silvestre pero no fueron expuestos a ningún AE, y un tratamiento de referencia con AE de Jengibre (“testigo positivo”). En la Figura 17 se muestra el interior de una jaula de campo.

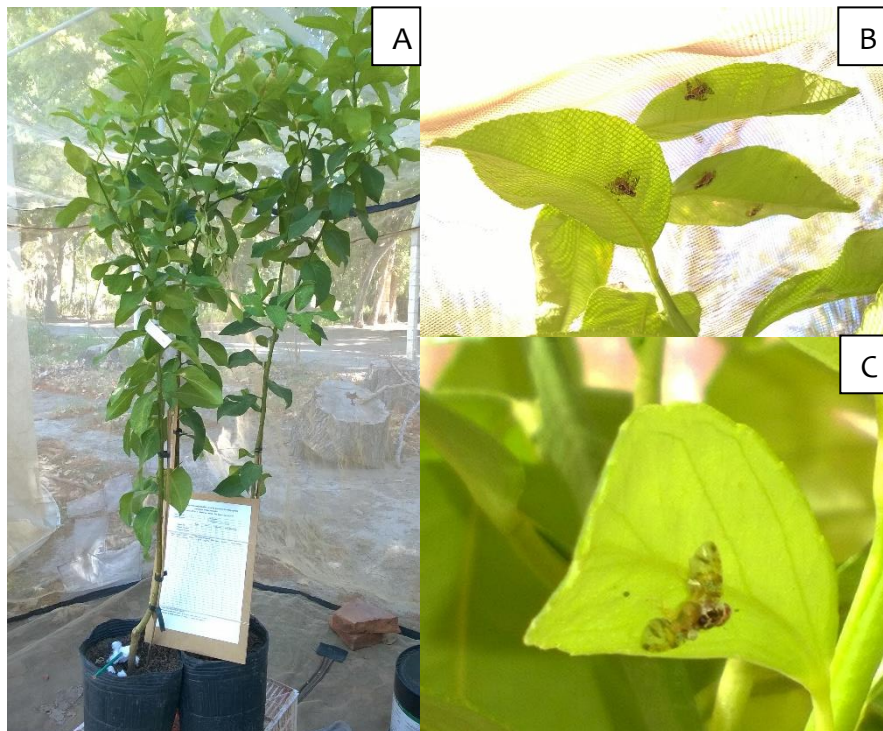


Figura 17. **A.** Planta de limón dentro una la jaula. **B.** Cópulas en la cara inferior de la hoja. **C.** Macho llamando (emitiendo feromona).

Análisis de datos

Para cada tratamiento se realizaron 2 réplicas por día y se realizó un total de 17 días de ensayos, quedando en total, 32 réplicas para el Control, 21 réplicas para Jengibre y *S. areira*, y 11 réplicas para *B. spartioides* y *S. polygama*. Aquellas réplicas en las que se obtuvo menos de un 20% de cópulas no fueron consideradas finalmente en los análisis. Para cada repetición, se estimó el RSI, siguiendo los lineamientos del Manual de Control de Calidad (FAO/IAEA/USDA 2014) y se compararon los valores obtenidos para cada tratamiento. El modelo para el análisis de los datos contempló como factor de efecto fijo al tratamiento, como bloque al tipo de jaula (trama abierta y trama cerrada), y al día como factor aleatorio. Asimismo, para cada repetición se estimó el valor de χ^2 de Bondad de Ajuste con corrección de Yates dónde el número de cópulas esperada es al azar. Se estimó el χ^2 total y la heterogeneidad entre repeticiones. Cuando las repeticiones dentro de un tratamiento fueron homogéneas se sumaron las cópulas de todas las repeticiones dentro de dicho tratamiento y se estimó el χ^2 total. Cuando las repeticiones fueron no homogéneas se interpretaron los resultados de cada repetición en forma separada. Para los datos de latencia y duración de la cópula, se comprobó mediante la prueba de Shapiro Wilks que los datos no presentan una distribución normal, con lo cual para conocer si existe una diferencia en estos parámetros entre los dos tipos de machos, los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis. Por otro lado, para analizar los datos obtenidos en los ensayos donde se evaluó la influencia de la calidad de la dieta (más o menos proteica), se realizó un análisis por medio de un modelo lineal generalizado mixto MLGM; para una estructura de datos con distribución binomial del error (datos en proporción de casos: [cópulas del ts]/[total de cópulas]=RSI), tomando como factor fijo el tratamiento y el tipo de dieta (función de enlace *logit*).

3.5 Resultados

3.5.1. Ensayos de competitividad en laboratorio: estéril vs fértil.

Se observó que para la cepa *tsl*, los machos expuestos a los AEs de Jengibre ($p < 0,001$) y *S. polygama* ($p = 0,05$) obtuvieron significativamente mayor número de cópulas que los no expuestos. Para la cepa Mendoza, no se observaron diferencias significativas para el número de cópulas ($p > 0,05$). En el caso de la cepa de Castelar, tampoco se observó un efecto de la exposición para ninguno de los aceites probados. Los resultados se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Frecuencia de cópulas logradas por machos de *C. capitata* de diferentes cepas expuestos (Exp) y no expuestos (NoExp) en los diferentes tratamientos con aceites esenciales.

Combinación	Tratamiento	macho Exp	macho NoExp	Total	corr. Yates	P (Chi)
<i>tsl vs tsl</i>	B. spartioides	16	14	30	0,033	0,85
	S. polygama	48	30	78	3,73	0,05
	Jengibre	42	11	53	18,02	<0,0001
Mendoza vs Mendoza	B. spartioides	34	27	61	0,59	0,44
	S. polygama	38	32	70	0,357	0,549
	Jengibre	30	31	61	0,000	1,000
Castelar vs Castelar	B. spartioides	31	47	78	2,903	0,088
	S. polygama	18	26	44	1,118	0,290
	Jengibre	20	20	40	2,025	0,155

Cuando se evaluó la combinación de un macho estéril vs un macho fértil compitiendo por una hembra fértil (combinación *tsl* vs Castelar); los tratamientos con AE de *B. spartioides* y Jengibre mostraron diferencias significativas para el número de cópulas, a favor de los machos no expuestos, en ambos casos se obtuvo un $p < 0,001$. Bajo el tratamiento con el AE de *S. polygama*, no se detectaron diferencias significativas, obteniéndose valores de cópulas similares para el macho *tsl* y el fértil, lo que podría indicar que el AE de *S. polygama* mejora la competitividad de los *tsl*, frente a los machos no expuestos Castelar. Adicionalmente, se evaluó una situación control donde ninguno de los machos estuvo expuesto y los machos *tsl* tuvieron muy mal desempeño,

confirmando que el aceite mejora la competitividad del macho. Los resultados se observan en la tabla 9.

Tabla 9. Frecuencia de cópulas logradas por machos de *C. capitata* de la cepa *tsl* expuestos (Exp) y no expuestos (NoExp) de distinta cepa, en los diferentes tratamientos con aceites esenciales.

Combinación	Tratamiento	macho estéril	macho fértil	Total	with Yates'	P (Chi)
<i>tsl vs Castelar</i>	<i>B. spartioides</i>	16	43	59	11,861	0,0006
	<i>S. polygama</i>	20	30	50	1,629	0,2019
	<i>Jengibre</i>	8	45	53	26,802	<0,0001
	<i>Control (sin exponer)</i>	2	28	30	24,379	<0,0001

En cuanto a la latencia para la cópula, en general no se observaron diferencias entre los machos dentro de cada tratamiento. Sólo los machos expuestos al AE de *S. polygama* mostraron tener una mayor latencia en las combinaciones Mendoza vs Mendoza (H= 8,4; p= 0,003) y *tsl vs Castelar* (H= 7,5; p= 0,006). Por otro lado, la duración de la cópula con machos expuestos al AE de *S. polygama* fue significativamente menor que con machos no expuestos para las combinaciones *tsl vs tsl* (H= 6,7; p= 0,009) y *tsl vs Castelar* (H= 10,7; p= 0,001); por el contrario, en la combinación Mendoza vs Mendoza fue significativamente mayor (H= 4,2; p= 0,03). Para los machos expuestos al AE de jengibre se observó que la duración de la cópula fue 2 veces mayor respecto del macho no expuesto en la combinación *tsl vs Castelar* (H= 10,711,5; p= 0,0007).

3.5.2. Ensayos de competitividad en jaulas de campo, estéril vs fértil

Se detectaron diferencias significativas en todas las combinaciones, menos en la combinación de cepas macho *tsl* expuesto al AE de *S. polygama* y macho fértil (tabla 10).

Tabla 10. Valores de RSI y ajuste a un modelo mixto para cada combinación de cepas.

Combinación de cepas	RSI	F	gl	p
<i>tsl</i> – fértil	0,30 ± 0,05	25,25	1, 6	0,0023
<i>tsl</i> aceite – <i>tsl</i>	-	11,31	1, 5	0,0201
<i>tsl</i> aceite – fértil	0,52 ± 0,05	0,09	1, 4	0,7780

RSI, Índice de Esterilidad Relativa; gl, grados de libertad.

En la combinación macho *tsl* y macho fértil, el número de cópulas logradas por el macho *tsl* fue significativamente menor que el número de cópulas logrado por el macho fértil ($p < 0,0001$), en la combinación macho *tsl* expuesto al AE de *S. polygama* y macho fértil, el número de cópulas logradas por el macho *tsl* expuesto a aceite fue igual ($p > 0,05$); y en la combinación macho *tsl* expuesto al AE de *S. polygama* y macho *tsl* no expuesto, el número de cópulas fue significativamente mayor en los machos expuestos ($p = 0,008$). En la Figura 18 se muestran los porcentajes de cópulas obtenidos por los distintos machos dentro de cada combinación, donde puede observarse el efecto positivo de la exposición al AE de *S. polygama*.

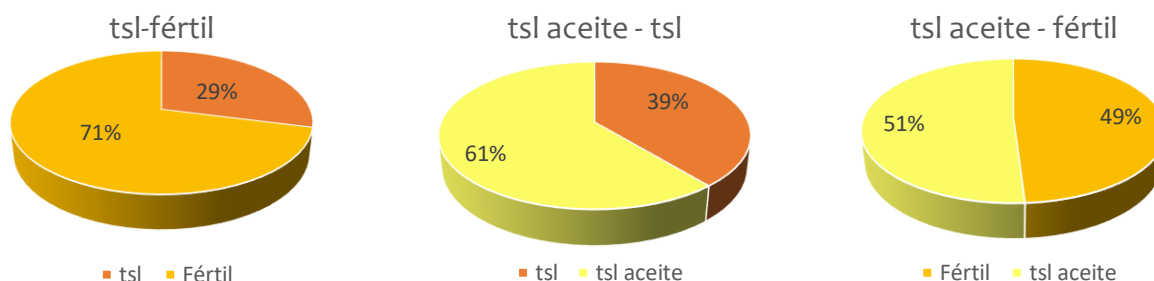


Figura 18. Porcentaje de cópulas para cada tipo de macho. En todos los casos el porcentaje de cópulas esperado por azar para cada tipo de macho es 50%.

En cuanto a la latencia, no se observaron diferencias significativas entre tipos de machos involucrados en las distintas combinaciones de cepas. Tampoco se observaron diferencias significativas para la duración de las cópulas en las combinaciones macho *tsl* vs macho fértil y macho *tsl* expuesto al AE de *S. polygama* vs macho *tsl* no expuesto al

AE de aceite (Tabla 11). Para la combinación macho *tsl* expuesto a aceite vs macho fértil no se registró esta variable.

Tabla 11. Ajuste a un modelo mixto para la latencia y duración de las cópulas para las tres combinaciones de cepas con un solo tipo de hembra.

Combinación de cepas	Latencia			Duración		
	F	gl	p	F	gl	p
tsl - Fértil	0,32	1,14	0,57	1,17	1,10	0,28
tsl - tsl aceite	0,36	1,13	0,54	3,35	1'91	0,07
tsl aceite - Fértil	0,02	1,66	0,88	-	-	-

gl; grados de libertad.

Respecto del análisis de los datos en cuanto a la ubicación donde se formó la pareja, para todas las combinaciones de cepas, la mayoría de las cópulas ocurrieron en la parte superior del árbol o la jaula y para cuando ocurrieron en el árbol lo hicieron en el lado inferior de la hoja. Además, la cantidad de parejas formadas sobre el árbol fue el doble respecto de las formadas sobre la tela de la jaula.

En la Figura 19 se muestra el porcentaje de cópulas formadas en el árbol para cada combinación. En general se observó que se formó un mayor porcentaje de parejas con los machos tratados con el aceite respecto de la combinación donde el macho *tsl* no estuvo expuesto.

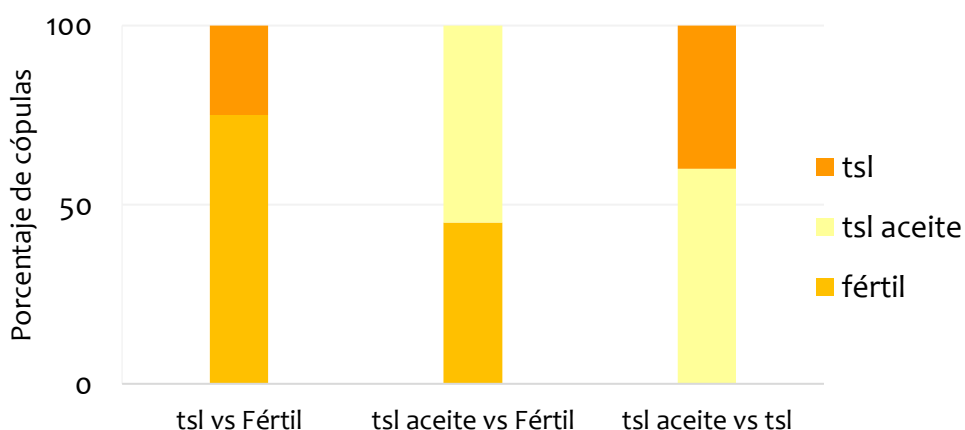


Figura 19. Porcentaje de cópulas obtenidas por los diferentes machos en el árbol en relación a las combinaciones ensayadas.

3.5.3. Ensayos de competitividad en jaulas de campo: estéril vs silvestre

Los resultados obtenidos mostraron que los machos *tsl* expuestos a *B. spartioides* (RSI: 0,38), Jengibre (RSI: 0,48) y a *S. polygama* (RSI: 0,60) mejoran su desempeño sexual en comparación con un tratamiento control (RSI: 0,24) en donde los machos *tsl* no son expuestos. En la Figura 20 se observa la proporción de cópulas (RSI) obtenidas por machos *tsl* para los diferentes tratamientos.

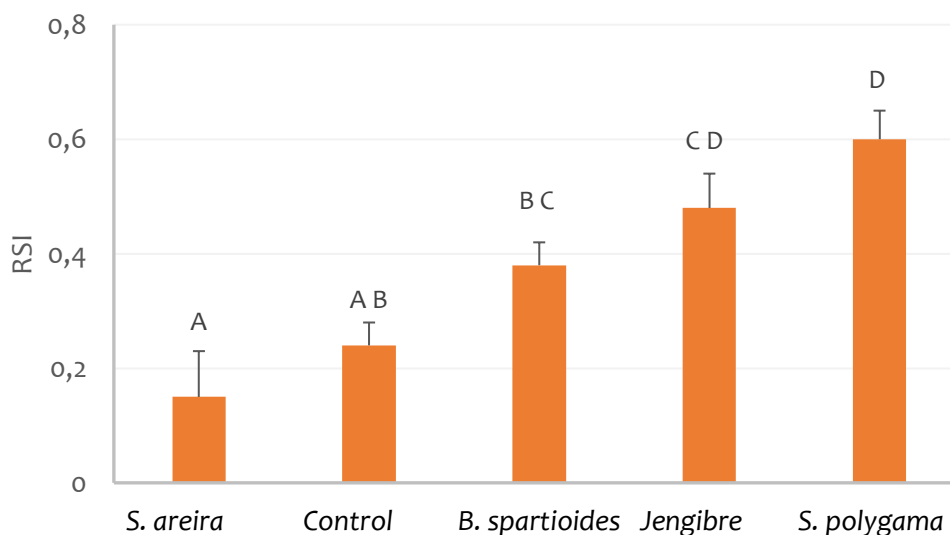


Figura 20. Proporción de cópulas logradas por el macho *tsl* en relación al total de cópulas (RSI) en los tratamientos con aceites esenciales de especies nativas y Jengibre (Media \pm error estándar). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Por otro lado, considerando lo que ocurre dentro de cada tratamiento, se encontraron diferencias significativas a favor de los machos silvestres para el Control ($\chi^2=47,2279$; $gl=1$; $p<0,0001$), *S. areira* ($\chi^2=37,8613$ $gl=1$; $p<0,0001$) y *B. spartioides* ($\chi^2=8,5069$; $gl=1$; $p=0,0035$), mientras que en el caso del Jengibre no hubo diferencias significativas (tabla 12). En el caso de *S. polygama*, donde los datos fueron heterogéneos, hubo diferencias significativas a favor de los machos *tsl* en 4 de 13 casos ($p<0,05$) mientras que en los 9 casos restantes no hubo diferencias significativas entre las cópulas logradas por machos *tsl* y los silvestres.

Tabla 12. Efectos de la exposición a los aceites esenciales sobre el éxito de cópula de machos *tsl*. Tratamientos con repeticiones homogéneas.

Tratamiento	<i>tsl</i>	silvestre	Total	RSI	Chi	corr. Yates	P (Chi)
B. spartioides	92	137	229	0,38	8,84	8,5069	0,0035
Control	66	171	237	0,24	46,52	47,2279	0,0000
S. areira	10	60	70	0,14	35,71	37,8613	0,0000
Jengibre	34	41	75	0,48	0,65	0,4805	0,4882

En general, sin tener en cuenta los tratamientos, la latencia y duración promedio de las cópulas para los machos silvestres, fue de 50,2 min y 168 min respectivamente, y no difirieron de los valores de los individuos *tsl* (47 min de latencia y 143 min de duración de la cópula). Dentro de cada tratamiento tampoco se observaron diferencias significativas en latencia; y en duración de la cópula. Sólo en el tratamiento Control los individuos silvestres presentaron una duración de cópula significativamente mayor que los machos *tsl* ($H=8,7$; $p=0,003$).

En cuanto al análisis de los datos respecto del lugar donde se formó la pareja, para todos los tratamientos, la mayoría de las cópulas ocurrieron en la parte superior de la jaula o el árbol y, para cuando ocurrieron en el árbol, lo hicieron en el lado inferior de la hoja. Asimismo, el número de parejas formadas sobre el árbol fue 1,3 veces las formadas sobre la tela de la jaula. Teniendo en cuenta el número de parejas formadas en el árbol con un macho *tsl*, se observaron diferencias entre los tratamientos. Así, comparando aquellos tratamientos donde los individuos habían sido expuestos a algún AE con los del tratamiento Control (donde los machos *tsl* no fueron expuestos); se observó que en el tratamiento con el AE de *S. polygama*, se formaron 3,2 veces el número de parejas en el árbol que en el tratamiento Control, seguido por Jengibre (1,8 veces) y *B. spartioides* (1,7 veces) y, por el contrario, en el tratamiento con *S. areira* el porcentaje de cópulas en el árbol fue menor que en el Control. En la Figura 21 se observan estos resultados.

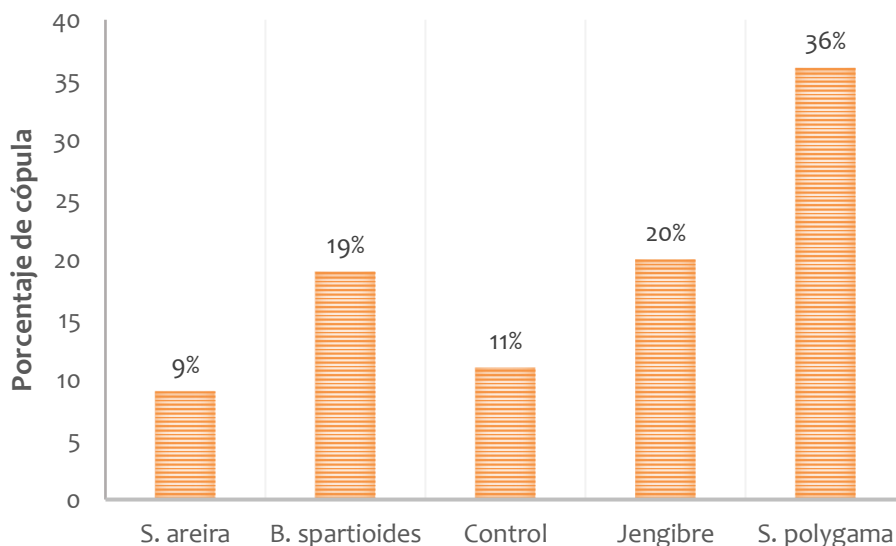


Figura 21. Porcentaje de cópulas obtenidas por los machos *tsl* sobre el árbol en los tratamientos probados.

Con respecto al efecto de la calidad de la dieta evaluada para machos expuestos al AE de *S. areira*, se encontró que no hubo efecto de la calidad de la dieta ($F=0,5$; $p=0,48$) y que no hubo interacción entre el tipo de dieta y los tratamientos ($F=1,85$; $p=0,17$). Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($F=12,86$; $p=0,0001$), actuando el Jengibre como agente potenciador de la competitividad sexual de los machos *tsl*. El AE de Jengibre tiende a mejorar el desempeño tanto en situación de dieta rica como de dieta pobre.

3.6. Discusión

Pretender mejorar y garantizar el éxito competitivo de los machos estériles previamente a su liberación, es un objetivo clave para cualquier programa que implemente la TIE como estrategia de lucha (Pereira *et al.* 2013). En las últimas décadas, se inició la búsqueda de herramientas que permitan una mejora en la competitividad de los machos de moscas de la fruta.

Existen antecedentes sobre la exposición de machos de algunos tefrítidos a sustancias químicas vegetales, tanto de hospederos como no hospederos, y su influencia en el comportamiento sexual (Vera *et al.* 2010; Bachmann *et al.* 2015; Shelly, *et al.* 200; Shelly, *et al.* 2006; Shelly, *et al.* 2009; Shelly, *et al.* 2015). En el presente trabajo se evaluó la influencia de 3 AEs esenciales de plantas nativas sobre el comportamiento de

apareamiento en machos de *C. capitata*. Inicialmente los ensayos fueron realizados bajo condiciones de laboratorio y posteriormente atendiendo a un aumento de escala, se realizaron en condiciones seminaturales (jaulas de campo). Además, avanzando sobre la idea de una posible transferencia de los resultados, se planteó un esquema de combinaciones de cepas que al principio involucró individuos de colonias de laboratorio, hasta poder llegar a la situación de implementación más real posible, machos *tsl* (producidos y liberados por la biofábrica de la provincia de San Juan) compitiendo con machos silvestres (obtenidos de fruta infestada de campo).

Se ha visto que la exposición a ciertos compuestos aumenta la competencia sexual de los machos (Papadopoulos, et al., 2006). Los datos apuntan a que el sesquiterpeno α -copaeno, un potente atrayente de los machos de *C. capitata* (Nishida, et al., 2000) presente tanto en la piel de naranja como en el aceite de la raíz de jengibre aumenta la competitividad sexual de los machos expuestos a dicha sustancia. En diferentes ensayos realizados con varias líneas estériles de *C. capitata* y bajo diferentes condiciones ambientales (Shelly et al., 2005) se demostró que la exposición de los machos al aroma del aceite de jengibre aumentaba considerablemente el éxito de apareamiento de éstos.

En el presente trabajo, en ensayos de laboratorio, se evaluaron 3 cepas distintas (Mendoza, *tsl* y Castelar), así, cuando machos estériles fueron expuestos a los AEs y compitieron con machos de su misma cepa por una hembra fértil, sólo los machos pertenecientes a la cepa de sexado genético *tsl* expuestos, obtuvieron 1,6 y 3,8 veces más parejas en los tratamientos con los AEs de *S. polygama* y Jengibre, respectivamente. Jofré Barud et al. 2014, han demostrado en ensayos de laboratorio que los aceites esenciales de *B. spartioides* y *S. polygama*, promueven una ventaja para el apareamiento a los machos *tsl* Vienna 8 frente a machos sin tratar al competir por una hembra de esa misma cepa. En el presente trabajo, el AE de *B. spartioides* no le confirió ventaja sobre el apareamiento al macho *tsl*, esto puede atribuirse a que el AE probado por Jofre Barud et al (2014) difiere en su composición con el ensayado en este trabajo y/o a que se evaluó sobre hembras *tsl* irradiadas.

Con base en esos resultados, se evaluó en ensayos de laboratorio la influencia de los AEs sobre el éxito de apareamiento en machos estériles al competir con machos fértiles por

una hembra fértil, centrando nuestra pregunta en un contexto TIE. Se observó que tanto para el tratamiento control como para los AEs de *B. spartioides* y Jengibre se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el número de cópulas a favor del macho fértil. Por el contrario, para el tratamiento con *S. polygama*, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que indicó que las hembras fértiles se aparearon indiscriminadamente con uno u otro tipo de macho, vislumbrando que el AEs de *S. polygama* mejora el éxito de apareamiento de machos *tsl*, cuando estos compiten con individuos de otra cepa.

Para confirmar la influencia positiva en el éxito de apareamiento del AE de *S. polygama* se realizaron ensayos en jaulas de campo, en el tratamiento control donde el macho *tsl* sin exponer compitió con un macho fértil, el *tsl* tuvo un bajo desempeño (RSI= 0,30). Cuando el macho *tsl* fue expuesto al AE de *S. polygama*, mejoró considerablemente su desempeño sexual y obtuvo un RSI= 0,52. Según Shelly y McInnis (2001) la exposición al α -copaeno incrementa el éxito de apareamiento de los machos de *C. capitata*. El α -copaeno es un sesquiterpeno bastante ubicuo en las plantas, por lo que parece razonable asumir que este compuesto y otros similares puedan influenciar el éxito de apareamiento de los machos de la mosca del Mediterráneo. El aceite de *S. polygama* presentó cantidades bajas de α -copaeno, y una importante variedad y abundancia de otros sesquiterpenos similares.

Kouloussis *et al.* (2013) encontraron que el aceite esencial de la piel de la naranja dulce también mejora la competitividad de machos, en este caso de tipo silvestres, frente a los no tratados; y la pre-exposición de machos de tipo silvestre y machos estériles de la línea *tsl*. Además, Juan-Blasco *et al.* (2011) encontraron que la exposición a linalool otorga una ventaja frente a machos no expuestos para el apareamiento, mientras que el limoneno no tiene tales efectos. Este constituyente es común en los aceites esenciales de cítricos. Por otra parte, una mezcla de geraniol, limoneno, linalol, α -pineno y β -mirceno, mejora en un 50% el éxito de apareamiento respecto a los machos no expuestos. Los monoterpenos α -pineno, β -mirceno y limoneno se presentaron en el aceite esencial de *S. polygama*, lo que podría contribuir a explicar que se provocara una mejora en la competitividad sexual de los machos estériles.

En ensayos bajo condiciones seminaturales, donde un macho *tsl* compitió con un macho silvestre por una hembra silvestre se observó para los tratamientos Control, *B. spartioides* y *S. areira* que las hembras prefirieron aparearse con machos silvestres. Mientras, en el tratamiento con Jengibre la mayor proporción de apareamientos fueron realizados con los machos expuestos a ese AE. Para el caso de *S. polygama* (las réplicas no fueron homogéneas), en 4 de 13 réplicas, las hembras mostraron preferencias para aparearse con machos expuestos al AE, mientras que, en el resto de las réplicas, se aparearon tanto con uno u otro tipo de macho. Estos resultados confirman la ventaja en el éxito sobre el apareamiento que otorga el AE de *S. polygama* a los machos *tsl*.

Se conoce sobre la importancia, para este tipo de insectos, del hallazgo por parte de los machos de zonas favorables para el establecimiento de agregaciones de apareamiento (leks). En este sentido cabe destacar que los machos estériles liberados deben ser capaces de establecer o unirse a los leks, para desde allí emitir señales y atraer a las hembras para aparearse (Hendrichs, *et al.* 2002). En los ensayos de jaulas de campo, se observó que los machos que habían sido expuestos al AE de *S. polygama* obtuvieron mayor número de cópulas localizadas en el árbol al compararlos con los machos *tsl* sin exponer. Entendiendo la importancia de este comportamiento y la ventaja que se le otorga a un individuo estéril a la hora de buscar y encontrar pareja en condiciones naturales; estudios que tengan en cuenta este tipo de información deberán ser realizados.

Por lo tanto, todo avance en el conocimiento de los factores que modulan el éxito de los machos será ventajoso al momento de desarrollar y transferir herramientas que incrementen la eficacia de la TIE (Hendrichs *et al.* 2002; Robinson *et al.* 2002; Robinson y Hendrichs, 2005). Todos los resultados son alentadores para poder proponer el AE de *S. polygama* como un aceite plausible de implementación en programas TIE. Sin embargo, queda aún por explorar la factibilidad de su uso a escala masiva.

Por otra parte, como ya se mencionó, el AE de *S. areira* posee propiedades anti-insecto comprobadas sobre mosca doméstica, cucaracha y vinchuca (Ferrero, *et al.* 2006; Ferrero, *et al.* 2007). La exposición al AE de *S. areira* provocó un efecto negativo sobre el desempeño sexual del macho *tsl*. Si bien el mecanismo por el cual esto ocurrió se

desconoce, sería importante evaluar si el mismo efecto se produce sobre el apareamiento entre individuos silvestres, lo que podría tener implicancias prácticas sobre el control de la plaga.

II. Evaluación de la influencia de los aceites esenciales como estimulantes o disuasivos de la oviposición de las hembras.

Para determinar si los AEs pueden influir sobre el comportamiento de oviposición de *C. capitata*, se examinó la respuesta de hembras grávidas mediante ensayos que involucraron una evaluación del estímulo químico en ensayos en Y-olfatómetro (a distancia), y ensayos de oviposición en diferentes sustratos (corta distancia con intervención de factores físicos del sustrato).

3.7 Materiales y métodos

3.7.1 Evaluación a distancia del estímulo químico: ensayo en Y- olfatómetro.

Se evaluó la respuesta de atracción en Y-olfatómetro de hembras grávidas a los volátiles de los aceites esenciales de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama*.

3.7.1.1. Material biológico

Se trabajó con hembras silvestres grávidas. Cuarenta y ocho horas antes del ensayo, se colocaron machos y hembras maduros sexualmente en una jaula con agua y comida para que se apareen. Las parejas que fueron ocurriendo fueron retiradas y una vez finalizada la cópula, se separaron las hembras y se acondicionaron en jaulas provistas con agua y comida *ad libitum* hasta el día del ensayo.

3.7.1.2. Ensayo biológico

La prueba se llevó a cabo en el Y- olfatómetro bajo el mismo protocolo descrito en 2.4.4.

3.7.1.3. Análisis estadísticos de los datos

Para determinar si existía una diferencia en la respuesta de las hembras a los distintos aceites, se analizó la proporción de respuesta mediante un modelo lineal generalizado mixto. Por otro lado, los datos del tiempo de permanencia fueron analizados con el test de Friedman con el fin de comparar el grupo control con el grupo tratado. Los datos de

las elecciones iniciales y finales se analizaron mediante un test χ^2 . En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia del 5 %. Se utilizó el programa estadístico Infostat (versión profesional 2017).

3.7.2 Ensayo de oviposición en sustrato artificial: domos de agar

En vista de los resultados obtenidos en los ensayos de atracción de las hembras hacia los AEs (ítem 3.7.1.2), se evaluó la influencia de los AEs de *S. areira* y *S. polygama* en ensayos de oviposición sobre un sustrato artificial bajo condiciones de laboratorio.

3.7.2.1 Metodología

Se trabajó con individuos silvestres obtenidos de fruta infestada, como se detalló en el punto 2.4.3. Se fabricaron domos de agar (30gr de agar cada 500 ml de agua) que fueron cubiertos con papel *film* adherente para evitar la deshidratación. Se evaluaron 5 concentraciones (0, 10, 100, 500, y 1000 ppm), las soluciones fueron preparadas disolviendo los AEs en acetona. Palillos de madera 4,5 cm de largo fueron impregnados con las diferentes concentraciones de cada tratamiento.

3.7.2.2 Ensayo de oviposición

Se colocaron 3 parejas en recipientes de 1 L con agua y comida *ad libitum*, 3 días antes del ensayo, permitiendo que los individuos copulen. En cada recipiente, dependiendo del tratamiento, se dispuso un domo como sustrato de oviposición en el cual se insertó en el centro un palillo impregnado con el aceite, de esta manera los volátiles difunden de manera gradual (Figura 22). Después de 48hs los domos de agar fueron retirados y se contó la cantidad de huevos depositados bajo una lupa esteroscópica. Se realizaron 6 réplicas para cada concentración y se repitió al día siguiente (N=12).

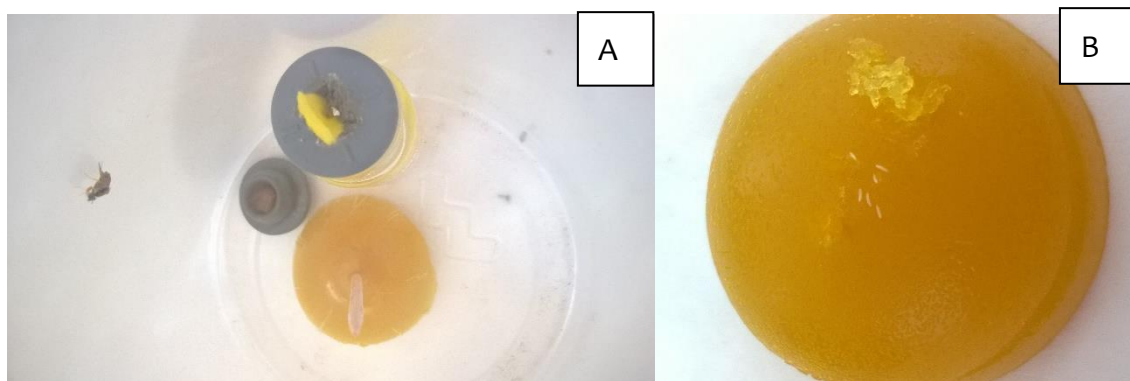


Figura 22. **A.** vista superior del recipiente donde se dispuso el domo de agar (color amarillo) como sustrato de oviposición. **B.** Domo de agar con huevos depositados.

3.7.2.3 Análisis de datos

Para determinar si existía una preferencia en la oviposición por las hembras en los diferentes tratamientos evaluados, se analizó el número de huevos depositados mediante un modelo lineal generalizado mixto, donde la variable analizada fue número de huevos, y contempló como efecto fijo los tratamientos y las diferentes concentraciones evaluadas; y como efecto aleatorio la repetición. Se utilizó el programa estadístico Infostat (versión profesional 2017). Por otro lado, se determinó el porcentaje de infestación como la proporción de sustratos en los que se detectaron huevos respecto del total.

3.7.3 **Ensayo de oviposición en fruta: uvas tratadas superficialmente**

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de oviposición en sustrato artificial (domos de agar), se realizaron ensayos de oviposición en laboratorio usando como sustrato fruta natural. La evaluación se realizó mediante dos diseños diferentes: 1. Ensayo sin elección y 2. Ensayo “*dual choice*”.

3.7.3.1 Metodología:

Se utilizaron uvas como sustrato de oviposición. Las uvas fueron tratadas con soluciones de distintas concentraciones del AE de *S. areira*. Las soluciones fueron preparadas disolviendo el AE en 1 mL de acetona y se completó con agua destilada hasta lograr la concentración deseada. Las concentraciones utilizadas fueron: 0, 400 y 4000 ppm (control, baja y alta respectivamente). Grupos de 20 uvas se sumergieron durante 1

minuto en las soluciones, se las retiró y se dejaron sobre una bandeja para que se evapore el excedente de la solución de la superficie.

3.7.3.2 Ensayo de oviposición sin elección:

Tres días antes del ensayo, se colocaron 3 parejas en recipientes de 1 L con agua y comida *ad libitum*, permitiendo que los individuos copulen. Se realizaron 3 tratamientos (control, baja y alta) colocando en sendos recipientes una uva tratada como único sustrato de oviposición. Luego de 48 hs las uvas fueron retiradas, se observó bajo lupa las uvas de manera individual y se registró el número de huevos depositados en cada una. Se realizaron 10 réplicas y se repitió el ensayo al día siguiente.

3.7.3.2.1 Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado que contempló el número de huevos como variable respuesta, como efecto fijo los tratamientos y las concentraciones evaluadas; la repetición como efecto aleatorio. Por otro lado, se determinó el porcentaje de infestación como fue detallado en el ítem anterior.

3.7.3.3 Ensayo de oviposición “dual-choice”

Se realizó bajo el mismo protocolo detallado anteriormente. Para este ensayo en cada recipiente se colocaron 2 uvas, dependiendo del tratamiento, una tratada con aceite (dosis alta o baja) y una uva control. Se realizaron 20 réplicas y se repitió al día siguiente. Luego de 48 h las uvas fueron retiradas y se registró el número de huevos en cada una (Figura 23).

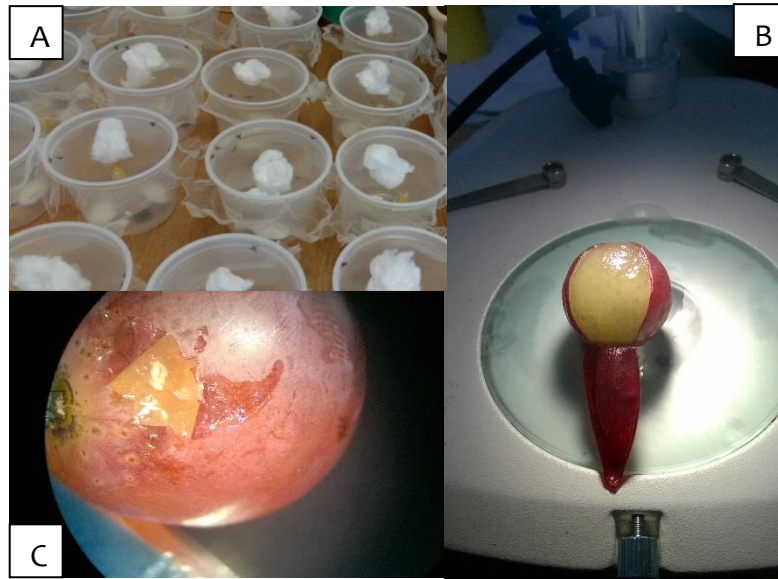


Figura 23. A. Recipientes de oviposición. B. Uva montada bajo lupa estereoscópica. C. huevos depositados en una postura.

3.7.3.3.1 Análisis de datos

Un análisis general de la situación donde se evaluó el número de huevos depositados en los distintos tratamientos (concentración alta, baja) fue realizado mediante la utilización de un modelo lineal generalizado. Para analizar si existía una preferencia por parte de las hembras en depositar huevos en una uva tratada frente a una uva sin tratar y atendiendo a la naturaleza apareada de los datos, se analizó mediante un test de Friedman, se trabajó con un nivel de significancia del 5 %. En todos los casos se utilizó el programa estadístico Infostat (versión 2017).

3.8 Resultados

3.8.1 Evaluación a distancia del estímulo químico: ensayo en Y- olfatómetro.

Más del 60% de las hembras realizó algún tipo de respuesta en todos los tratamientos (Figura 24). El porcentaje de respuesta de las hembra frente a los AE no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F=0,15$; $p=0,86$).

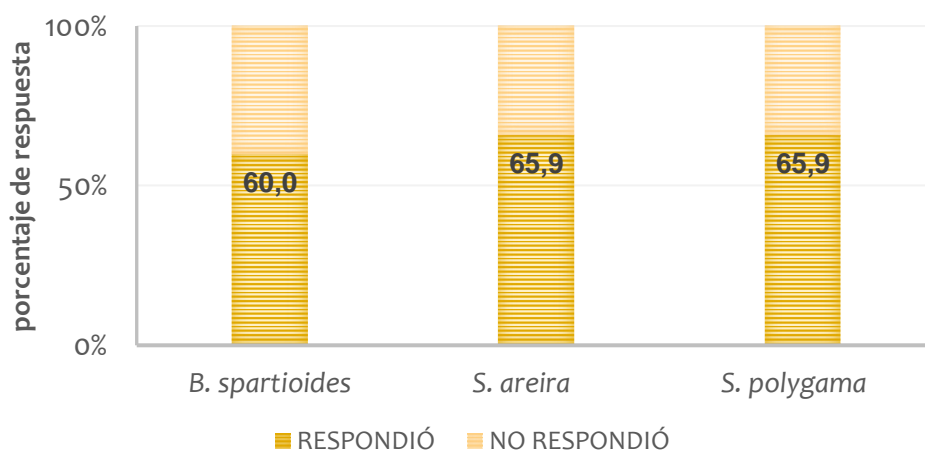


Figura 24. Porcentaje de respuesta obtenido para las hembras grávidas frente a los diferentes tratamientos.

En la tabla 13 se muestran los datos del tiempo de permanencia de las hembras en cada una de las ramas del Y- olfatómetro. Para los AEs de *B. spartioides* y *S. areira* no se observaron diferencias significativas con respecto al control, por el contrario, cuando las hembras grávidas fueron expuestas al AE de *S. polygama* mostraron tener una preferencia en comparación con el control. El tiempo permanecido en la rama del AE fue de 1,6 veces al permanecido en la rama control ($T^2=4,77$, $p=0,03$).

Con respecto a la frecuencia de distribución de individuos en el Y-olfatómetro, al final del ensayo con el AE de *S. polygama*, las hembras mostraron preferir la rama con aceite ($p < 0,05$), mientras que para los otros dos AEs no se observaron diferencias significativas.

Tabla 13. Respuesta de hembras grávidas de *Ceratitis capitata* en tiempo de permanencia y frecuencia de distribución en la elección inicial (EI) y en la elección final (EF) de las hembras grávidas en el Y-olfatómetro frente a los volátiles de los aceites de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama*.

Aceite	Rama Y-olf.	tiempo (s)	EI	χ^2 (EI)	p (EI)	EF	χ^2 (EF)	p (EF)
<i>B. spartioides</i>	AE	27,3 ± 4,54 a	30	1,59	0,20	27	0,32	0,57
	control	22,1 ± 4,04 a	21			23		
<i>S. areira</i>	AE	24,2 ± 4,33 a	28	0,07	0,79	25	0,3	0,58
	control	31,6 ± 5,06 a	30			29		
<i>S. polygama</i>	AE	40,7 ± 5,7 a	34	2,57	0,10	35	4,74	0,03
	control	25,1 ± 4,99 b	22			19		

Par un mismo tratamiento, letras diferentes en el tiempo de permanencia en cada rama denotan diferencias significativas.

X² valor de Chi cuadrado de elección inicial (EI) y elección final (EF)

3.8.2 Ensayo de oviposición en sustrato artificial: domos de agar

En los ensayos de oviposición donde se les ofreció un sustrato artificial para oviponer bajo la influencia del volátil de los AEs a corta distancia, no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones probadas (F= 1,44; p=0,22). Se determinó el porcentaje de infestación para cada tratamiento, encontrándose en ambos tratamientos, un bajo porcentaje (<30%). Estos resultados se representan en la Figura 25 y 26.

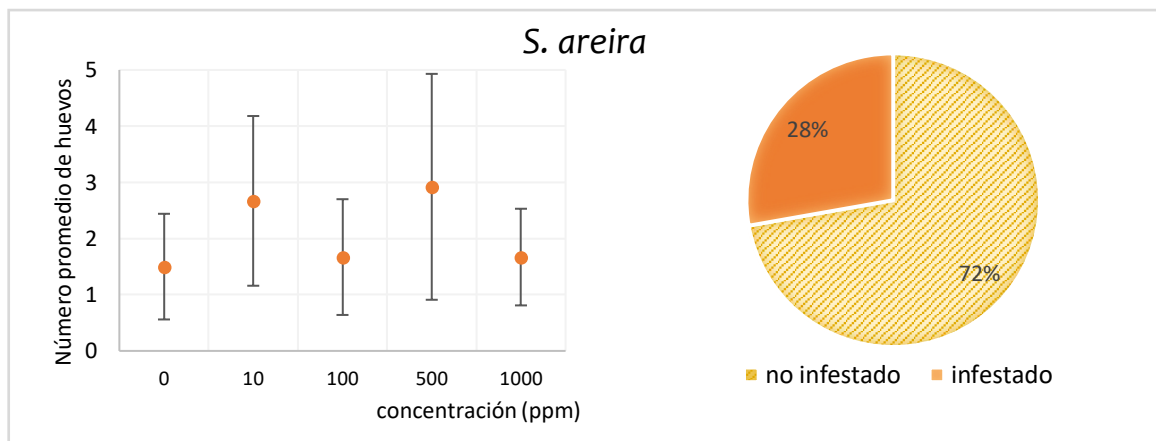


Figura 25. A. Número de huevos (media ± EE) depositados por hembras de *C. capitata* para cada concentración evaluada (gráfico izquierdo) y porcentaje de infestación (gráfico derecho) para el tratamiento de *S. areira*.

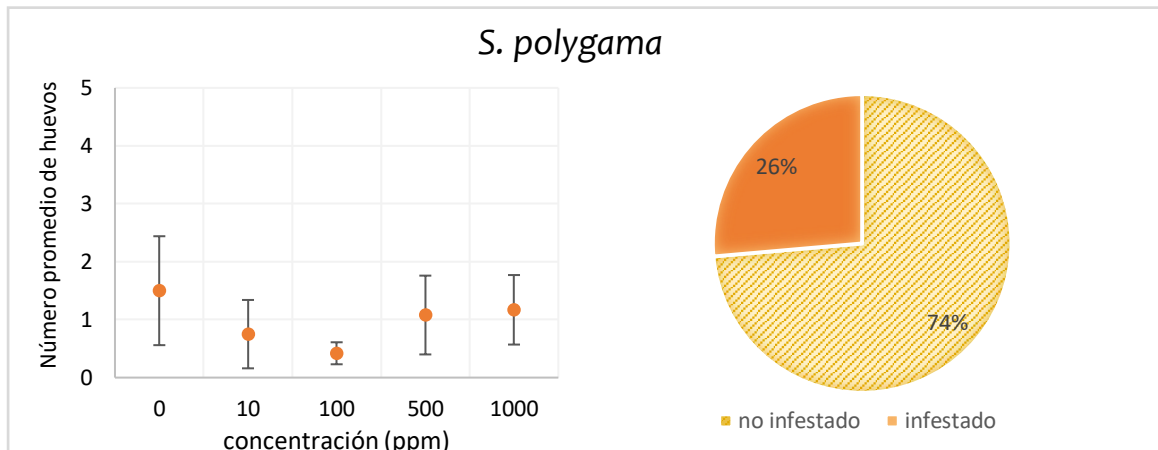


Figura 26. Número de huevos (media ± EE) depositados por hembras de *C. capitata* para cada concentración evaluada (gráfico izquierdo) y porcentaje de infestación (gráfico derecho) para el tratamiento de *S. polygama*.

Considerando que no existe efecto en las concentraciones evaluadas, se comparó el número total promedio de huevos depositados para cada tratamiento, donde se observó que las hembras pusieron más huevos sobre el sustrato tratado con el AE de *S. areira* como sitio de oviposición ($F= 21,9; p<0,0001$) (Figura 27).

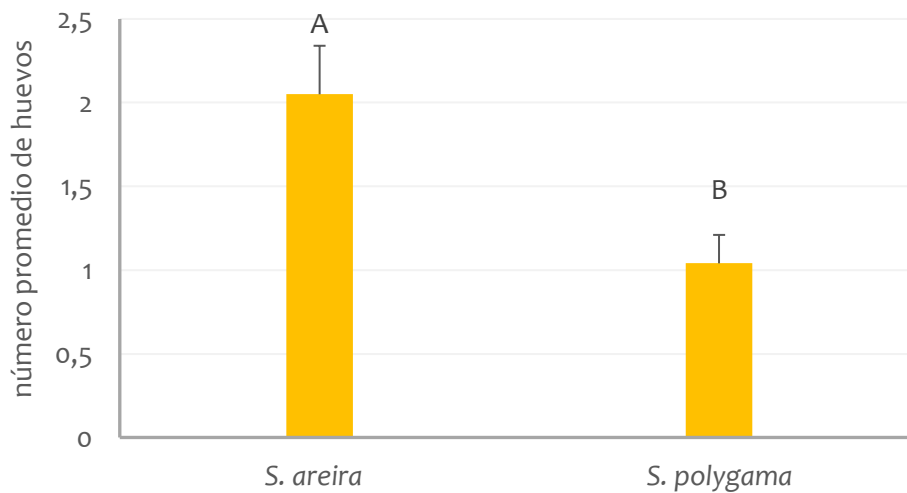


Figura 27. Número de huevos (media ± EE) depositados por hembras de *C. capitata* en sustratos artificiales tratados con los AE de *S. areira* y *S. polygama*

3.8.3 Ensayo de oviposición en sustrato natural: uvas

3.8.3.1 Ensayo de oviposición sin elección

Para los ensayos donde se les ofreció a las hembras uvas como sustrato de oviposición, y se evaluaron 3 niveles de concentración del AE de *S. areira* (control, baja y alta) el porcentaje de infestación fue superior al 50% en todas las concentraciones probadas (Figura 28).

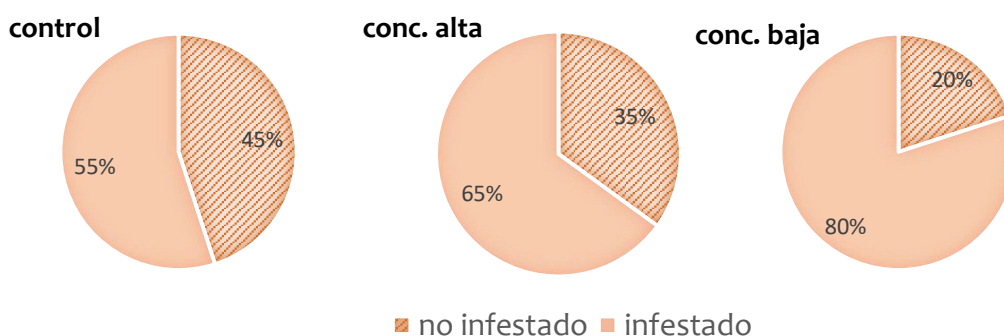


Figura 28. Porcentaje de infestación en uvas tratadas con 0 ppm (control), 4000 ppm (alta) y 400 ppm (baja) de *S. areira*.

Se observaron diferencias significativas en la cantidad de huevos depositados por las hembras entre los tratamientos ($F=45,5$; $p=0,0001$). Las hembras depositaron mayor cantidad de huevos en las uvas tratadas con una concentración baja del AE de *S. areira* (Figura 29).

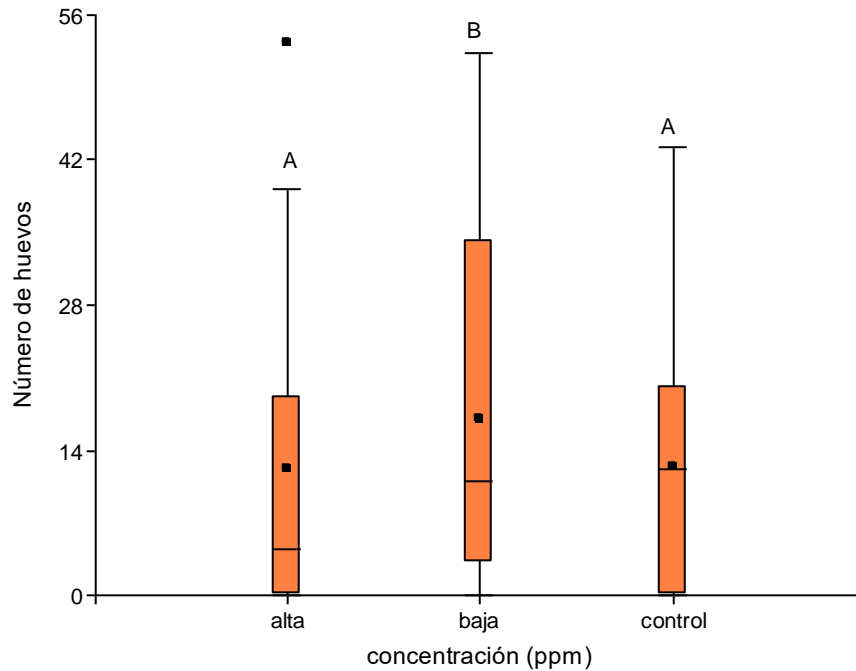


Figura 29. Ensayo de elección simple. Gráfico de cajas y bigotes para el número de huevos depositados por las hembras de *C. capitata* en las uvas, en los distintos tratamientos de concentración del AE de *S. areira*. Letras distintas indican diferencias significativas.

3.8.3.2 Ensayo de oviposición “dual-choice”

En los ensayos “dual choice” se realizaron 2 tratamientos, donde las hembras tuvieron para elegir 2 uvas como sustrato de oviposición, por un lado, entre “control vs concentración alta” (tratamiento concentración Alta) o “control vs concentración baja” (tratamiento concentración Baja). Evaluando lo que ocurrió en la elección doble, no se observaron diferencias significativas entre las uvas tratadas y las uvas control para el tratamiento concentración Alta ($T^2=0,11$; $p=0,74$) ni para el tratamiento concentración Baja ($T^2=0,03$; $p=0,85$).

Por otro lado, cuando se compararon los diferentes tratamientos se observaron diferencias significativas ($F=167,7$; $p=0,0001$). En promedio las hembras depositaron más huevos sobre las uvas en el tratamiento concentración Alta (12,3 huevos) que en el tratamiento concentración Baja (6,1 huevos) (Figura 30).

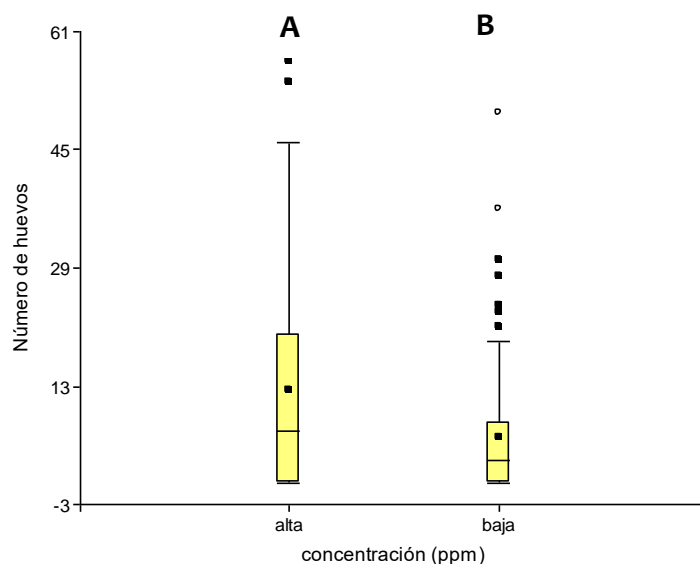


Figura 30. Ensayos “dual-choice”. Gráfico de cajas y bigotes para número de huevos depositados por hembras de *C. capitata* en uvas en los tratamientos de concentración del AE de *S. areira*. Letras diferentes indican diferencias significativas.

3.9 Discusión

Los factores que afectan el comportamiento de oviposición de algunas moscas de la fruta incluyen el olor de la planta hospedera, y diversas características físicas y químicas de la fruta tales como tamaño, forma, color y presencia de elementos químicos (Díaz-Flecher, *et al.* 1999)

El comportamiento de la oviposición de *C. capitata*, y en un grado mucho menor de otras especies frugívoras de *Ceratitis* con un amplio rango de hospedantes, ha sido objeto de numerosos estudios y varias revisiones. El estudio de la selección del huésped y la puesta de huevos es de interés en estas especies debido a su importancia fitosanitaria y con fines de captura para la detección de la plaga. La oviposición es fácilmente observable en la naturaleza y puede cuantificarse y manipularse en el laboratorio (Yuval & Hendrichs, 2001).

En este trabajo se evaluó la influencia de 3 AEs sobre el comportamiento de oviposición de *C. capitata*, atendiendo a 2 de las características más importantes que guían el comportamiento de oviposición, señales químicas olfatorias y táctiles. Se realizaron

ensayos donde se probó la atracción de hembras grávidas frente a estímulos químicos a distancia (ensayo en Y-olfatómetro) y a corta distancia, en ensayos de oviposición sobre un sustrato artificial cuyo estímulo químico volátil provino de un palillo impregnado con diferentes concentraciones de AEs. Finalmente, debido a que durante la fase de contacto, la decisión crucial de un insecto de aceptar o rechazar un sitio de oviposición se rige por los aportes sensoriales de los rasgos físicos y químicos de la planta, se realizaron ensayos de oviposición donde se les ofreció un sustrato natural (uvas) tratado superficialmente con diferentes concentraciones del AE.

De los ensayos del estímulo a distancia, se obtuvo que el AE de *S. polygama* atrae a las hembras grávidas ($p < 0,05$). Por otro lado, las hembras no mostraron una preferencia por los AEs de *B. spartioides* y *S. areira* bajo estas condiciones. Para *S. areira*, aunque no se encontraron diferencias significativas, el tiempo permanecido en la rama control fue mayor que en la rama del AE.

Cabe destacar que en el capítulo 2 de esta tesis, se encuentran resultados que muestran que hembras vírgenes no son atraídas por el AE de *S. polygama*; por el contrario, si muestran una preferencia hacia el AE de *S. areira*. Esto nos permitió poner a consideración a estos 2 AEs para ensayos en los que se les ofreció a las hembras un sustrato artificial (domos de agar) como sitio de oviposición donde el estímulo químico fuera de corta distancia. Se probaron 5 concentraciones diferentes para cada uno de los tratamientos, pero no se encontraron diferencias entre las concentraciones evaluadas. Contrariamente a los resultados obtenidos en la evaluación del estímulo a distancia, las hembras depositaron casi 2 veces el número de huevos en el tratamiento con el AE de *S. areira* comparado con el AE de *S. polygama*. Se conoce que el comportamiento de oviposición de insectos herbívoros, parasitoides y frugívoros es dinámico a nivel del individuo, respondiendo a la variación en la calidad y disponibilidad de hospederos. Los patrones de variación en la carga de huevos en respuesta a la presencia y calidad del hospedero sugieren que el desarrollo del ovario también responde a la variación en el entorno del hospedero. Así, la dinámica de maduración del ovario está mediada por un mecanismo de retroalimentación con la oviposición, la alimentación sobre el huésped y las claves sensoriales del hospedero (Papaj, 2000). Por ejemplo, hembras expuestas a las frutas maduran más huevos y más rápido que las hembras privadas de éstas. La

mejora de la ovogénesis no es una simple consecuencia de la alimentación en la propia fruta, porque el efecto puede ser reproducido con modelos de frutas artificiales que carecen de valor nutricional (Papaj, 2005). Se sugiere que el mayor número de huevos encontrados en los domos tratados con el AE de *S. areira* podrían ser el resultado tanto de un efecto de modulación de este AE sobre la dinámica de la ovogenésis como sobre la estimulación de la oviposición. Para poder conocer cual de estos procesos es el que ha sido afectado debería evaluarse la carga ovárica en hembras expuestas y no expuestas al AE.

En base a estos resultados, se evaluó la oviposición sobre uvas tratadas con distintas concentraciones del AE de *S. areira*, bajo 2 diseños diferentes de ensayos, sin elección y con elección (“dual-choice”). Los resultados mostraron que cuando no tenían elección, y sólo para el tratamiento con “concentración Baja”, las hembras depositaron en uvas 1,8 veces el número de huevos registrado en el control. Sin embargo, en los ensayos de “dual-choice” se encontró un mayor número de huevos para el tratamiento “concentración Alta”. Por otro lado, observando lo que ocurrió dentro de cada tratamiento, no se encontraron diferencias entre el número de huevos depositados en una uva tratada vs una uva sin tratar, para ninguna de las concentraciones evaluadas.

Silva *et al.* (2012) evaluaron el efecto de extractos de la hoja de Neem (*Azadirachta indica*) sobre la oviposición en uvas a distintas concentraciones (0, 10.000, 18.000, 32.000 and 56.000 ppm) y encontraron que, a concentraciones superiores a 18.000 ppm los extractos son inhibidores de la oviposición de *C. capitata*. Por otro lado, extractos de la piel de limón inhibieron la oviposición en esferas tratadas en comparación con no tratadas (Faraone, et al., 2012).


Respecto de la respuesta de las hembras a los diferentes sustratos que le fueron ofrecidos para la oviposición, se observó un aumento en el porcentaje de infestación para el sustrato de tipo natural, respecto del artificial. Esto indica que claves químicas y físicas de la fruta son percibidas por las hembras e inducen la oviposición.


En ensayos de oviposición “dual-choice” bajo condiciones de laboratorio donde se evaluó la influencia del AE de naranja dulce, se encontró que las hembras oviponen más huevos en los domos tratados con aceite que en aquellos que no fueron tratados


(Ioannou, et al., 2012). Además, entre los componentes presentes en el AE, el mirceno y β -pineno no presentan un efecto sobre la oviposición de *C. capitata*, mientras que el linalool presenta propiedades inhibitorias de la oviposición (Ioannou, et al., 2012).


Objetos inanimados pueden mimetizarse con los frutos cuando se suspenden sobre plantas hospederas, atrayendo así a las moscas de la fruta, resultando adecuados para propósitos de trapeo (Katsoyannos, 1989). El uso de trampas constituye una de las formas más utilizadas por los programas de control para evaluar el resultado de sus acciones. El desarrollo de una trampa efectiva de huevos, a base de un sustrato oviposición, puede ser una poderosa herramienta de monitoreo para hembras grávidas. Esto permitiría medir el grado de esterilidad inducida en la población bajo presión de TIE, ayudando así a evaluar el éxito de su aplicación (Suárez, et al., 2007).


3.10 Conclusiones


 Los resultados encontrados sobre la influencia de los AEs en el comportamiento de apareamiento de los machos estériles de *C. capitata*, revelaron que los machos estériles de la línea de sexado genético (*tsl*) mejoran su competitividad sexual cuando son expuestos a volátiles del AE de *S. polygama*.


 La latencia y duración de la cópula no resultaron diferentes cuando los machos fueron tratados con alguno de los AEs evaluados.


 No se encontró evidencia que indique que la calidad de la dieta ayude a mejorar el efecto de la exposición del AE.


 Los machos pre-expuestos al aceite esencial de *S. polygama*, obtienen mayor número de cópulas sobre el árbol, comparados con machos *tsl* sin exponer.

 La composición rica en sesquiterpenos del aceite esencial de *S. polygama* y/o la presencia del α -copaeno, podrían explicar que los machos pre-expuestos a este aceite presenten mayor éxito de apareamiento.

 La exposición de machos irradiados al AE de *S. polygama* estudiado en esta tesis, previa a su liberación a campo podría constituir un apoyo al control sustentable de esta plaga por medio del uso de semioquímicos naturales.

 Las hembras grávidas mostraron ser atraídas por el AE de *S. polygama* cuando el estímulo fue percibido a distancia.

 En sustratos artificiales con una fuente de emisión de los volátiles, las hembras depositan una mayor cantidad de huevos cuando son expuestas a una concentración baja del aceite de *S. areira*.

 No se encontró evidencia consistente que permita confirmar que los AE evaluados provoquen comportamientos de disuasión o estimulación del comportamiento de oviposición de hembras de *C. capitata*.



CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES FINALES Y PROYECCIONES

Estudios comportamentales y de EAG se han llevado a cabo en vista de hallazgos de compuestos que modifiquen el comportamiento de insectos plaga con la finalidad de encontrar una alternativa de control amigable con el medioambiente. Desde hace varias décadas los aceites esenciales derivados de plantas son estudiados por sus numerosas propiedades bioactivas entre las que se cuentan la actividad sobre insectos.

Con base en los resultados encontrados sobre el efecto atrayente de machos del AE de *S. polygama* sería interesante compararlo con los atrayentes usados regularmente para el monitoreo y control de poblaciones de *C. capitata*, tales como el Trimedlure, Ceratrap y proteína hidrolizada, con miras al desarrollo de atracticidas o sustancias útiles para el monitoreo.

Existe bastante consenso sobre la disminución de la competitividad de los machos estériles al competir en campo con un macho silvestre por una hembra silvestre, siendo ésta, la principal dificultad con la que se encuentran los programas que utilizan la TIE como método de control de la mosca del Mediterráneo. Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis son valiosos por su potencial implementación en esos programas, ya que la exposición de machos irradiados a los aceites estudiados, previa a su liberación a campo podría constituir un apoyo al control sustentable de esta plaga por medio del uso de semioquímicos naturales.

Si bien las pruebas realizadas involucraron ensayos bajo condiciones seminaturales, son muchos los aspectos que faltan poner a prueba en continuidad con estos estudios. La consistencia en los resultados obtenidos sobre la influencia del AE de *S. polygama*, nos permite proponerlo como un candidato para su implementación en programas que utilicen la TIE. Sin embargo, queda aún por explorar la factibilidad de su uso a escala masiva. Sobre todo, las determinaciones necesarias tienen que ver con un aumento de escala respecto de la trabajada en esta tesis. Evaluaciones sobre la dosis mínima a las cuales exponer un gran número de individuos previo a su liberación, tiempo de exposición, supervivencia de individuos que sean sometidos a la exposición, son algunos de los temas que deben abordarse.

Todo avance en el conocimiento de los factores que modifiquen el comportamiento de *C. capitata* es ventajoso al momento de desarrollar y transferir herramientas que

incrementen la eficacia de los métodos de control utilizados contra esta especie. Los comportamientos de atracción y reproducción son claves para el ciclo biológico de *C. capitata*, lo que ha valido el desarrollo de cebos para trampas alimenticias y sexuales, la implementación de la técnica del insecto estéril y la búsqueda de atrayentes para hembras grávidas. Esta tesis representa un aporte a dicha búsqueda desde la perspectiva del potencial de los aceites esenciales de especies de la flora nativa, sin perder de vista la plausibilidad de su implementación tecnológica.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adams, R. P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Allured, Carol Stream. IL, USA.
- Agelopoulos, N., Birkett, M., Hick, A. J., Hooper, A., Pickett, J. A., Pow, E., Woodcock, C. M. (1999). Exploiting semiochemicals in insect control. *Pesticide Science Pestic Sci*, 225 - 235.
- Aluja, M. 1993. Manejo Integrado de la Mosca de la Fruta. Editorial Trillas, México. 251p
- Ansari, S., Hasan, F., & Ahmad, N. (2012). Threats to Fruit and Vegetable Crops: Fruit Flies (Tephritidae) - Ecology, Behaviour, and Management. *J. Crop Sci. Biotech.*, 3(15), 169-188.
- Bachmann G.E., Segura D.F., Devescovi F., Juárez M.L., Ruiz M.J., Vera M.T. 2015. Male Sexual Behavior and Pheromone Emission Is Enhanced by Exposure to Guava Fruit Volatiles in *Anastrepha fraterculus*. *Plos One*, 1-17.
- Barry, J. D., Shelly, T. E., Mcinnis, D. O., y Morse, J. G. (2003). Potential For Reducing Overflooding Ratios Of Sterile Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) With The Use Of Ginger Root Oil . *Florida Entomologist*, 29 - 33.
- Beck, J. J., Light, D. M., & Gee, W. S. (2012). Electroantennographic Bioassay as a Screening Tool for Host Plant Volatiles. *Jpurnal Visualized Esperiments*, 63, 3931.
- Bell, W. J., y Cardé, R. T. (2013). *Chemical ecology of insects*. Springer.
- Benelli, G., Daane, K. M., Canale, A., Niu, C.-Y., Messing, R. H., & Vargas, R. I. (2014). Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: current knowledge and potential applications for Integrated Pest Management. *J Pest Sci* .
- Benzi, V. S., Murray, A. P., & Ferrero, A. (2009). Insecticidal and insect-repellent activities of essential oils from Verbenaceae and Anacardiaceae against *Rhizopertha dominica*. *Natural Product Communications*, 1287-1290.
- Blanco-Metzler, H. (1996). *Los semioquímicos y su papel en el manejo integrado de plagas*. IPROC-EEFBM. Universidad de Costa Rica: X Congreso Nacional Agronomico.

- Briceño, D., Eberhard, W., & Shelly, T. (2007). Male courtship behavior in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) that have received aromatherapy with ginger root oil. *Florida Entomologist*, 175 - 179.
- Bruce, T. A., & Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects – Finding the right mix. *Phytochemistry*, 72(13), 1605-1611.
- Bruce, T., Wadhams, L., & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *TRENDS in Plant Science*, Vol.10 (6).
- Casaña-Giner, V., Gandía-Balaguer, A., Hernández-Alamós, M., Mengod-Puerta, C., Garrido-Vivas, A., Primo-Millo, J., & Primo-Yúfera, E. (2001). Attractiveness of 79 Compounds and Mixtures to Wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Field Trials. *Journal of Economic Entomology*, 94(4), 898-904.
- Cheng, S.-S., Huang, C., Chen, Y., Yu, J.-J., Chen, W.-J., y Chang, S. T. (2009). Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresource Technology*, 100, 452–456.
- Cocroft, R. B., y Rodríguez, R. L. (2005). The behavioral ecology of insect vibrational communication. *Bioscience*, 55(4), 323-334.
- Copping, L. G., & Duke, S. O. (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63, 524-555.
- Cristofaro, M., Fenio, A., Tronci, C., Porto, M. E., Cristofaro, A., Baldacchino, F., & Tabilio, M. R. (2007). Improved Attractants for Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) And Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin): Two Years Data Evaluating The Responses of wild Fly Populations In 3 Southern Italy Locations. En IAEA, *Development of Improved attractants and their integration into fruit fly SIT management programmes* (págs. 51-59).
- Díaz-Fleischer, F., D. R. Papaj, R. J. Prokopy & A. L. Norrbom, 1999. Evolution of fruit fly oviposition behavior. In: M. Aluja & A. L. Norrbom (eds), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton, pp. 811–841.
- Eberhard, W. G. (2001). Sexual Behavior and Sexual Selection in the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Dacinae: Ceratitidini). En M. Aluja, & A. L. Norrbom (Edits.),

- Fruit flies (Tephritidae) : phylogeny and evolution of behavior* (págs. 459 - 489). CRC Press LLC.
- Erler, F., Ulug, I., & Yalcinkaya, B. (2006). Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. . *Fitoterapia* , 77 , 491–494.
- Erazo S.; Delporte C.; Negrete R.; García R.; Zaldívar M.; Iturra G.; Caballero E.; López J.L. y Backhouse N. (2006). Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107 (3), 395–340.
- FAO/IAEA/USDA. (2014). Product Quality Control for Sterile Mass-Reared and Released Tephritid Fruit Flies, Version 6.0. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 164 pp.
- Faraone, N., Caleca, V., Bruno, M., Vitagliano, S., & Cristo, D. (2012). Biological activity of metabolites extracted from *Citrus* spp. on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) . *IOBC/wprs Bulletin*, 167-173 .
- Ferrero, A. A.; Chopa, C.S.;González, J.O.; Alzogaray, R.A. (2007). Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. *Fitoterapia*.78(4):311-4.
- Ferrero, A.A.; Werdin González, J.O. y Sánchez Chopa C. (2006). Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. Short report. *Fitoterapia* 77 381–383
- Foster and, S. P. y Harris, M. O. (1997). Behavioral manipulation methods for insect pest-management. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 123-146
- Gahukar, R.T. 2014. Chapter 8. Potential and Utilization of Plant Products in Pest Control. En *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*. Pp. 125-140.
- Gazit, Y y Akiva, R. (2017). Toxicity of malathion and spinosad to *Bactrocera zonata* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 100 (2) 384-389.
- Ghabbari, M., Guarino, S., Caleca, V., Saiano, F., Sinacori, M., Baser, N., . . . Lo Verde, G. (2018). Behavior-modifying and insecticidal effects of plant extracts on adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). . *Journal of Pest Science*, 1 - 11.

- Ghosh, A.; Chowdhury, N. y Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res.* 135(5): 581–598
- Gillij Y.G.; Gleiser R.M.; Zygadlo J.A. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99 (7), 2507-2515.
- Giuliano, D. (2001). Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 131-154.
- Guillén, D. y Sánchez, R. (2007). Expansion of the national fruit fly control programme in Argentina Spring. En *Area-Wide Control of Insect Pests. IAEA.*, 653–660.
- Gupta, M. P. (1995). *Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED y Convenio Andres Bello* (270 ed.). Santafé de Bogotá, Colombia.
- Hendrichs, J., Franz, G., & Rendon, P. (1995). Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *Journal of Applied Entomology*, 119(1-5), 371-377.
- Hendrichs, J., Robinson, A. S., Cayol, J. P., & Enkerlin, W. (2002). Medfly Areawide Sterile Insect Technique Programmes For Prevention, Suppression Or Eradication: The Importance Of Mating Behavior Studies . *Florida Entomologist*, 1-13.
- Hendrichs, J., Vreysen, M. J. B., Enkerlin, W. R., & Cayol, J. P. (2005). Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. In *Sterile Insect Technique* (pp. 563-600). Springer Netherlands.
- Hernández-Sánchez, G., Sanz-Berzosa, I., Casaña-Giner, V., & Primo-Yúfera, E. (2001). Attractiveness for *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Dipt., Tephritidae) of mango (*Mangifera indica*, cv. Tommy Atkins) airborne terpenes. *J. Appl. Ent.*, 125, 189-192.
- Idigoras, G. (2014). *Producción y procesamiento de productos frutihortícolas Documento de referencia.* Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación.

- Ioannou, C. S., Papadopoulos, N. T., Kouloussis, N. A., Tananaki, C. I., & Katsoyannos, B. I. (2012). Essential oils of citrus fruit stimulate oviposition in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Physiological Entomology*, 1 - 10.
- Isman, M. B., Koul, O., Lucznski, A., & Kaminski, J. (1990). Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 38, 1406-1411.
- Isman, M. B. (2002). Insect antifeedants. *Pestic. Outlook*, 13, 152–157.
- Jang, E. B. (2002). PHYSIOLOGY OF MATING BEHAVIOR IN MEDITERRANEAN FRUIT FLY (DIPTERA: TEPHRITIDAE): CHEMORECEPTION AND MALE ACCESSORY GLAND FLUIDS IN FEMALE POST-MATING BEHAVIOR. *Florida Entomologist*, 85(1), 89 - -93.
- Jofré Barud, F., López, S., Alejandro Tapia, A., Feresin, G. E., María Liza López, M. L. (2014). Attractant, sexual competitiveness enhancing and toxic activities of the essential oils from *Baccharis spartioides* and *Schinus polygama* on *Ceratitis capitata* Wiedemann. *Industrial Crops and Products*, 62, 299–304.
- Juan-Blasco M.; San Andrés V.; Martínez-Utrillas M. A.; Argilés R.; Pla I.; Urbaneja A.; Sabater-Muñoz B. (2011). Alternatives to ginger root oil aromatherapy for improved mating performance of sterile *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) males. *Journal of Applied Entomology*. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01688.x.
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils . *Current Medicinal Chemistry*, 813-829 .
- Kiesling. R. **2003**. Flora de San Juan. República Argentina. Volumen II. Estudio Sigma.
- Klassen, W. y Curtis, C. F. (2005). History of the sterile insect technique. In *Sterile insect technique* (pp. 3-36). Springer Netherlands.
- Kouloussis, N. A., Gerofotis, C. D., Ioannou, C. S., Iliadis, I. V., Papadopoulos, N. T., & Koveos, D. S. (2017). Towards improving sterile insect technique: Exposure to orange oil compounds increases sexual signalling and longevity in *Ceratitis capitata* males of the Vienna 8 GSS. *PLOS ONE*, 1 - 18.

- Levinson, H., Levinson, A., & Osterried, E. (2003). Orange-derived stimuli regulating oviposition in the Mediterranean fruit fly. *J. Appl. Ent.*, 269–275.
- Light, D. M., Jang, E. B., & Flath, R. A. (1992). Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to the volatile constituents of nectarines. *Entomol. exp. appl.*, 63, 13-26.
- Lima, B., Lopez, S., Luna, L., Agüero, M. B., Aragon, L., Tapia, A., . . . Feresin, G. E. (2011). Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent Activities. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 924 - 936.
- Liquido, N., L. A. Shinoda, and R. T. Cunningham. 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, Number 77. 52 pp.
- Lobos Aguirre, C. (1997). *Distribución y registros de las principales especies de moscas de las frutas(díptera)*. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Centro Regional Andino.
- López, S. B., Zygadlo, J. A., Aragón, L. M., Feresin, G. E., Tapia, A., López, M. L. (2011) Repellent Activity of Essential oils from species of San Juan, Argentina Against nymphs of *T. infestans*. *BIOCELL*, 35(1),144
- Lopez, S., Lima, B., Aragon, L., Ariza Espinar, L., Tapia, A., Zacchino, S., Lopez, M. L. (2012). Essential Oil of *Azorella cryptantha* Collected in Two Different Locations from San Juan Province, Argentina: Chemical Variability and Anti-Insect and Antimicrobial Activities. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 1452 - 1464.
- Lux, S. A.; Vilardi, J. C. Liedo P., Gaggi K, Calcagno G. E. Munyiri F. N, Vera M. T., Manso F. (2002). Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (diptera, tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist*, 85(1):102-112.
- Metcalf, R. L. (1990). Chemical ecology of Dacinae fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 83(6), 1017-1030.

- Metcalf, R. L., & Metcalf, E. R. (1992). *Plant kairomones in insect ecology and control*. Chapman and Hall Ltd.
- Murray, A., M. Frontera, M. Tomas, and M. Mulet. 2005. Gas chromatography-mass spectrometry study of the essential oils of *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg., *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst., and *Schinus areira* L. Z. *Naturforsch.* 60(1-2):25-29.
- Niogret, J., A., G. M., Espinoza, H. R., Kendra, P. E., & Epsky, N. D. (2017). Attraction and electroantennogram responses of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to six plant essential oils. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5 (3), 958-964.
- Niogret, J., Montgomery, W. S., Kendra, P. E., Heath, R. R., & Epsky, N. D. (2011). Attraction and Electroantennogram Responses of Male Mediterranean Fruit Fly to Volatile Chemicals from Persea, Litchi and Ficus Wood. *J Chem Ecol*, 37, 483–491.
- Nishida, R., Shelly, T. E., Whittier, T. S., & Kaneshiro, K. Y. (2000). a-COPAENE, A POTENTIAL RENDEZVOUS CUE FOR THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY, *Ceratitis capitata*? *Journal of Chemical Ecology*, 26(1), 87-100.
- Oliva, M.M.; Zunino, M.P.; López, M.L.; Soria, Y.A.; Ybarra, F. N.; Sabini, L.; Demo, M.S.; Biurrun, F y Zygadlo, J.A. (2007). Variation in the essential oil composition and antimicrobial activity of *Baccharis spartioides* (H. et A) J. Rimy from three regions of Argentina. *Journal of Essential Oil Research* 19, 509–513.
- Oviedo, A., Van Nieuwenhove, G., Van Nieuwenhove, C., & Rull, J. (2017). Biopesticide effects on pupae and adult mortality of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Austral Entomology*. 1-8.
- Ovruski, S. M., & Schliserman, P. (2012). Biological Control of Tephritid Fruit Flies in Argentina: Historical Review, Current Status, and Future Trends for Developing a Parasitoid Mass-Release Program. *Insects* , 870-888.
- Ovruski, S. M., Cancino, J. L., Fidalgo, P. (1999). Nuevas perspectivas para la aplicación del control biológico contra moscas de la fruta (Díptera: tephritidae) en Argentina. *. Revista Manejo Integrado de Plagas* , 54, 1–12.

- Ovruski, S. M., Colin, C., Soria, A., & Oroño, L. E. (2003). Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62, 49-59.
- Palá Paúl, J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "Eryngium", en la Península Ibérica.* . Tesis doctoral.
- Papadopoulos, N. T., Kouloussis, N. A., & Katsoyannos, B. I. (2006). Effect of plant chemicals on the behavior of the Mediterranean fruit fly. *7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, (págs. 97 - 106). Salvador, Brazil.
- Pereira, R., Yuval, B., Liedo, P., Teal, P. E. A., Shelly, T. E., McInnis, D. O., & Hendrichs, J. (2013). Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of Applied Entomology*, 137(s1), 178-190.
- Pérez, M. E.; Ruiz, D. M.; Schneider, M.; Autino, J. C.; Romanelli, G. (2013). La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 4 (2). 83-91. ISSN 0121-7488.
- Pickett, J. A., Aradottir, G. I., Birkett, M. A., Bruce, T. J., Chamberlain, K., Khan, A. R., . . . Woodcock, C. M. (2012). Aspects of insect chemical ecology: exploitation of reception and detection as tools for deception of pests and beneficial insects. *Physiological Entomology*, 37, 2-9.
- Pineda, S., Schneider, M. I., & Martinez, A. M. (2007). El Spinosad una alternativa para el control de insectos plaga. *Ciencia Nicolaita.*, 46.
- Primo-Yúfera, E. (1991). *Ecología química. Nuevos métodos de lucha contra insectos.* MundiPrensa Libros, Madrid. 191 pp.
- Rani, P. U. (2015). Plant Volatile Chemicals and Insect Responses. *Plant Biology and Biotechnology*, Vol.1, 671-695.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annu. Rev. Entomol.* , 57, 405-424.

- Robinson, A. S., & Hendrichs, J. 2005. Prospects for the future development and application of the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique* (pp. 727-760). Springer Netherlands.
- Robinson, A. S., Cayol, J. P., & Hendrichs, J. (2002). Recent findings on medfly sexual behavior: implications for SIT. *Florida Entomologist*, 85(1), 171-181.
- Rodriguez, E; Healey, P L; Mehla, I. (1984). *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. Plenum Press.
- Ruiz, M. J. (2013). *MECANISMOS DE RESISTENCIA QUÍMICA DEL LIMÓN AL ATAQUE DE Anastrepha fraterculus (DIPTERA: TEPHRITIDAE)*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN: Tesis Doctoral.
- Schiestl, F. P. (2010). The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters*, 13(5), 643-656.
- Southwood TRE. (1978). *Ecological methods*. En: *Perturbación, estructura del hábitat y diversidad de insectos en ecosistemas de bosque Chaqueño y de pastizales serranos*. Tesis doctoral Molina, S. I. 1999. Universidad Nacional de Córdoba.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Plant chemistry: endless variety*. *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press. pp. 48-98.
- Scrivanti, L. R., Zunino, M. P., Zygodlo, J. A. (2003). *Tagetes minuta* L. and *Schinus areira* L. essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 563-572.
- SENASA. (1994). Resolución IASCAV 134 94.
- Recuperado de: <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-134-1994-instituto-argentino-de-sanidad-y-calidad-vegetal>
- SENASA. (2002). *Manual Operativo de Procedimientos e Instrucciones de Trabajo de Barreras Fitosanitarias del Programa Nacional de Control y Erradicación de Mosca de los Frutos*. SAGPYA-SENASA, Bs. As.

- Shelly, T. E. (2001). Exposure to a -Copaene and a -Copaene-Containing Oils Enhances Mating Success of Male Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) . *ANNALS OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA*, 497 – 502.
- Shelly, T. E. (2006). Aromatherapy and Medfly SIT. *Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance* , (págs. 59-69). Salvador, Brazil.
- Shelly, T. E. (2009). Exposure to Grapefruits and Grapefruit Oil Increases Male Mating Success in the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *SucceSS of Male Medflies 31 Proc. Hawaiian Entomol. Soc.*), 31–36.
- Shelly, T. E., y Epsky, N. D. (2015). Exposure to Tea Tree Oil Enhances the Mating Success of Male Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) . *Florida Entomologist*, 1127-1133 .
- Shelly, T. E., y Mcinnis, D. O. (2001). Exposure to Ginger Root Oil Enhances Mating Success of Irradiated, Mass-Reared Males of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) . *J. Econ. Entomol.*, 1413 - 1418.
- Shelly, T. E., y Villalobos, E. M. (2004). Host plant influence on the mating success of male Mediterranean fruit flies: variable effects within and between individual plants. *ANIMAL BEHAVIOUR*, 417 - 426.
- Shelly, T. E., McInnis, D. O., Pahio, E., y Edu, J. (2004). Aromatherapy in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): sterile males exposed to ginger root oil in prerelease storage boxes display increased mating competitiveness in field-cage trials. *Journal of economic entomology*, 97(3), 846-853.
- Shelly, T. E., Edu, J., Pahio, E., & Nishimoto, J. (2007). Scented Males and Choosy Females: Does Male Odor Influence Female Mate Choice in the Mediterranean Fruit Fly? 2007 . *J Chem Ecol* , 2308 – 2324.
- Sivinski, J., M. Aluja, G. Dodson, A. Freidberg, D. Headrick, K. Kaneshiro, and P. Landolt.(2000). Topics in the evolution of sexual behavior in the Tephritidae. pp. 751-792. *In* M. Aluja, and A. L. Norrbom [eds.], *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

- Socolsky, C., Fascio, M. L., D'Accorso, N. B., Salvatore, A., Willink, E., Asakawa, Y., & Bardon, A. (2008). Effects of p-Vinylphenyl Glycosides and Other Related Compounds on the Oviposition Behavior of *Ceratitis capitata*. *J Chem Ecol*, 539–548.
- Suárez, L., Molina, A., Murúa, F., Acosta, J., Moyano, B., & Escobar, J. (2007). Evaluación de colores para la oviposición de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) en Argentina. *Rev. peru. biol.*, 14(2), 291-293.
- Suarez, L.; Murua, F.; Lara, N.; Escobar, J.; Taret, G.; Rubio, J.; Van Nieuwenhove G. A.; Bezdjian, L. P.; Schliserman, P.; Ovruski S.M. (2014). Biological Control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina: Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Fruit-Producing Semi-Arid Areas of San Juan. *NATURAL SCIENCE*. 6, 664 – 675.
- Strong DR, JH, Lawton, JH, TRE Southwood. (1986). Insect on plants. En: *Perturbación, estructura del hábitat y diversidad de insectos en ecosistemas de bosque Chaqueño y de pastizales serranos*. Tesis doctoral Molina, S. I. 1999. Universidad Nacional de Córdoba.
- Thomas, M. C., HEPPNER, J. B., WOODRUFF, R. E., WEEMS, H. V., J., S. G., & FASULO, T. R. (2010). *Mediterranean Fruit Fly, Ceratitis capitata (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae)*. University of Florida. IFAS Extension EENY-214.
- Tolozá, A. C., ZYGADLO, J. A., CUETO, G. M., BIURRUN, F., ZERBA, E., & PICOLLO, M. I. (2006). Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 43, 889–895.
- Tolozá, A. C. (2010). *Bioactividad y toxicidad de componentes de aceites esenciales vegetales, en Pediculus humanus capitis (Phthiraptera: Pediculidae)* Tesis doctoral. Buenos Aires Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

- Tunç, I., BERGER, B. M., ERLER, F., & DAG-LI. (2000). Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 36, 161–168.
- Vacas Gonzalez, S. (2011). *Uso de semioquímicos en el control de plagas, estudios básicos y de aplicación. Tesis Doctoral*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia Departamento de Química.
- Vera, M. T., Ruiz, M. J., Oviedo, A., Abraham, S., Mendoza, M., Segura, D. F., Willink, E. (2010). Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.*, 1 - 9.
- Vives de Quadras, J.M. (1988). Control de plagas de insectos. problemas y alternativas. p. 3- 13. In X. Bellés (ed.) *Insecticidas biorracionales*. CSIC. Colección Nuevas Tendencias, Madrid.
- Yuval, B., y Hendrichs, J. (2001). Behavior of Flies in the Genus *Ceratitis* (Dacinae: Ceratitidini). En M. Aluja, & A. L. Norrbom, *Fruit Flies (Tephritida) Phylogeny and Evolution of Behavior* (págs. 429 - 449). CRC Press.



ANEXO

I. Composición de los aceites esenciales.

Tabla A 1. Composición química de los aceites esenciales de *B. spartioides*, *S. areira* y *S. polygama* y sus proporciones relativas (% área).

RI	Compuesto	Área relativa (%)		
		<i>B. spartioides</i>	<i>S. areira</i>	<i>S. polygama</i>
839	2,4-Dimethyl-1-hepteno	-	0,07	-
901	Nonano	0,23	-	1,15
927	Triciclono	-	1,16	0,06
929	α -Pino	1,48	5,56	2,44
929	α -Tujeno	0,42	-	21,03
954	Camfeno	1,54	9,17	0,45
977	Sabineno	16,57	0,88	2,77
983	β -Pino	12,07	3,71	3,46
991	β -Mirceno	2,52	4,42	3,37
999	1,2,3-Trimetilbenceno	0,32	-	-
1001	Decano	0,26	-	-
1011	α -Felandreno	0,24	18,76	5,51
1013	δ -2-Careno	3,39	-	12,69
1021	α -Terpineno	0,30	-	0,93
1029	O-Cymeno	0,99	-	2,67
1031	p-Cimeno	-	4,80	-
1035	α -Limoneno	-	9,55	2,92
1037	β -Felandreno	27,26	7,34	3,26
1039	cis- β -Ocimeno	-	-	2,21
1049	trans- β -Ocimeno	-	-	0,30
1062	γ -Terpineno	0,61	0,08	0,64
1076	(Cis) Hidrato De Sabineno	0,60	-	-
1089	α -Terpinoleno	0,51	0,10	0,33
1100	Undecano	0,08	-	-
1103	Linalol	0,09	-	-
1107	(Trans) Hidrato De Sabineno	0,32	-	-
1108	Nonanal	-	0,16	-
1114	(Cis) Oxido De Rosa	0,06	-	-
1131	Menth-2-En-1-Ol (Cis-Para)	0,40	-	-
1132	43 (99,9); 93 (48,8); 71 (43,3); 69 (42,0); 94 (38,1); 95 (36,0); 111 (35,8); 79 (35,2); 139 (34,7); 55 (34,4).	-	0,07	-
1150	Menth-2-En-1-Ol (Trans-Para)	0,38	-	-
1151	43 (99,9); 55 (75,0); 41 (72,4); 92 (68,8); 91 (63,7); 69 (61,1);	-	0,10	-

	93 (51,4); 81 (48,6); 83 (46,4); 79 (42,1)			
1155	Citronelal	0,88	-	-
1171	Pinocarvona	0,21	-	-
1182	Borneol	1,40	-	-
1183	95 (99,9); 110 (36,2); 41 (24,2); 109 (23,7); 81 (21,2); 67 (18,5); 39 (12,6); 55 (11,5); 108 (11,2); 53 (93)	-	0,09	-
1188	Terpinen-4-ol	2,97	0,30	1,43
1197	Cripton	2,42	0,09	-
1202	α -Terpineol	0,48	0,04	0,28
1213	cis-Sabinol	-	0,05	-
1218	(Trans) Piperitol	0,07	-	-
1231	Citronelol	1,17	-	-
1253	Cumin Aldehyde	0,51	-	-
1254	43 (99,9); 97 (59,7); 107 (44,8); 41 (31,1); 55 (23,7); 39 (16,2); 109 (15,8); 53 (15,5); 79 (15,1); 83 (14,5)	-	-	0,34
1254	43 (99,9); 97 (58,3); 107 (42,8); 41 (31,8); 55 (23,0); 39 (16,7); 79 (15,5); 69 (14,3); 109 (14,2); 53 (13,9)	-	0,42	-
1259	Metil Citronelato	0,44	-	-
1265	Piperitona	0,37	-	-
1289	109 (99,9); 95 (61,5); 81 (55,8); 55 (51,2); 79 (50,0); 41 (48,7); 67 (44,6); 83 (43,5); 70 (33,1); 39 (29,0)	0,13	-	-
1290	Acetato de bornilo	0,12	1,90	0,26
1298	α -Terpinen-7-Al	0,10	-	-
1338	δ -Elemeno	-	0,14	-
1340	Bicicloelemeno	-	-	0,31
1340	121 (99,9); 93 (94,9); 107 (50,8); 79 (43,0); 91 (37,6); 81 (32,6); 39 (21,2); 136 (20,7); 119 (13,9); 92 (11,0)	0,08	-	-
1351	Acetato de geranilo	-	-	0,10
1353	α -Cubebeno	-	0,05	0,11
1383	α -Copaeno	-	0,15	0,69
1396	β -Elemeno	-	0,87	0,82

1401	Tetradecano	0,15	-	-
1417	α -Gurjuneno	-	0,64	0,56
1432	β -Cariofileno	0,25	1,91	3,40
1450	Aromadendreno	-	0,07	0,09
1456	69 (99,9); 41 (78,6); 93 (74,8); 79 (30,0); 133 (28,5); 81 (25,5); 55 (24,7); 67 (24,4); 39 (23,5); 91 (22,8)	0,07	-	-
1459	(cis)-Muurolo-3,5-diene	-	0,10	-
1468	α -Humuleno	-	0,59	0,55
1471	α -Humuleno	-	-	-
1473	(cis)-Muurolo-4(14),5-diene	-	0,30	-
1475	Aloaromadendreno	-	-	0,48
1481	trans - Cadina-1(6), 4-diene	-	0,11	-
1484	γ -Muuroloeno	-	0,38	0,20
1486	32 (99,9); 119 (9,8); 121 (7,1); 105 (6,0); 93 (5,5); 204 (4,7), 91 (4,6); 77 (3,8); 41 (3,7); 134 (2,6)	0,12	-	-
1489	α -Curcumeno	0,17	-	-
1493	trans-Muurolo-4(14),5-diene	-	1,35	-
1496	Germacreno D	-	-	3,01
1502	α -Zingibereno	0,10	-	-
1502	Viridifloreno	-	0,17	0,31
1507	Biciclogermacreno	1,21	3,69	8,08
1524	γ -Cadineno	-	0,84	0,59
1528	δ -Amorfeno	-	4,39	-
1530	δ -Cadineno	-	-	3,77
1532	trans- Calameneno	-	0,70	0,43
1534	69 (99,9); 91 (50,7); 161 (37,6); 77 (34,4); 55 (27,0); 133 (25,6); 57 (25,4); 93 (25,0); 41 (17,3); 119 (14,1)	0,13	-	-
1543	trans - Cadina-1(2),4-diene	-	0,16	0,10
1547	α -Cadineno	-	0,17	0,10
1552	α -Calacoreno	-	0,10	-
1559	Elemol	-	2,19	-
1586	Ledol	-	0,26	0,12
1590	Germacreno D-4-ol	-	1,15	-
1592	Espatuleno	0,89	0,92	0,98
1604	Oxido de Cariofileno	0,34	-	-
1606	43 (99,9); 41 (60,6); 81 (59,3); 161 (54,8); 109 (53,2); 122 (49,2); 69 (48,3); 55 (45,4); 95 (41,9); 105 (41,4)	-	-	0,12

1615	43 (99,9); 109 (92,0); 107 (89,7); 41 (72,9); 69 (68,3); 93 (68,0); 161 (63,3); 81 (62,8); 105 (60,3); 67 (58,2)	-	-	0,32
1617	Viridiflorol	-	0,52	-
1622	97 (99,9); 41 (97,3); 81 (79,6); 55 (77,7); 79 (75,1); 69 (73,6); 107 (63,1); 67 (54,4); 93 (53,5); 177 (46,7).	-	2,51	-
1626	97 (99,9); 41 (96,7); 81 (85,2); 55 (83,4); 79 (77,9); 69 (75,3); 107 (65,9); 93 (61,5); 67 (55,9); 177 (45,4)	-	-	1,02
1627	Hidrato de Sesquisabineno	0,43	-	-
1642	Epi α - Muurolol	-	-	0,86
1647	10-epi- γ - Eudesmol	-	0,53	-
1652	119 (99,9); 43 (96,6); 91 (91,8); 105 (85,7); 93 (78,3); 41 (67,3); 159 (59,3); 162 (54,0); 107 (52,1); 147 (44,1)	-	-	0,61
1652	94 (99,9); 79 (79,1); 83 (52,0); 105 (33,0); 218 (31,3); 125 (28,4); 55 (26,8); 91 (25,2); 119 (23,5); 77 (22,8)	1,85	-	-
1659	Epi α - Cadinol	-	0,50	1,68
1664	Epi α - Muurolol	-	1,32	-
1671	α -Cadinol	-	1,22	-
1674	α -Eudesmol	-	0,82	-
1701	119 (99,9); 41 (74,9); 93 (69,9); 69 (67,2); 137 (62,5); 55 (51,1); 84 (48,7); 91 (34,0); 109 (32,4); 121 (29,2)	1,12	-	-
1715	84 (99,9); 41 (66); 81 (65,7); 55 (50,8); 83 (44); 109 (43,2); 67 (41,1); 69 (39,9); 121 (29,9); 93 (29,2).	-	0,65	-
1761	Bisabolona <6R,7R>	4,16	-	-
1803	Octadecano	0,10	-	-
1926	83 (99,9); 137 (69,0); 110 (63,4); 55 (42,5); 95 (24,0); 109 (23,7); 82 (21,7); 39 (18,5); 41 (18,1); 135 (16,5)	2,40	-	-
	Total	95,52	98,29	97,92

II. Aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*).

a. Obtención y análisis del aceite.

El aceite esencial se obtuvo por destilación en un equipo de destilación por arrastre de vapor con una trampa tipo Clevenger a partir de raíces de jengibre adquiridas en el mercado. Dos kilogramos de raíces frescas se sometieron a 4 Hs de extracción. El aceite esencial obtenido fue colocado en microtubo y guardado en freezer (-18° C) hasta su utilización. La identificación de los componentes se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS), bajo el mismo protocolo utilizado para la identificación de los otros AEs.

b. Composición química

Tabla A 2. Composición química del aceite esencial de jengibre y sus proporciones relativas (% área).

RI AMDIS	Compuestos	% Area
897	2-Heptanol	0,4
922	Triciclono	0,1
933	α -Pino	1,9
950	Camfeno	6,4
978	β -Pino	0,3
982	Hepteno-2-ona	0,7
987	Mirceno	1,2
1.006	α -Felandreno	0,2
1.025	p-Cimeno	0,1
1.030	α -Limoneno	1,2
1.032	β -Felandreno	4,5
1.034	1,8 Cineol	10,1
1.086	Terpinoleno	0,1
1.098	Linalol	1,8
1.152	Citronelal	0,7
1.161	Cis- oxido de limoneno	0,5
1.177	Borneol	1,2
1.180	Verbenol	0,8
1.185	Terpinen-4-ol	0,3
1.199	α -Terpineol	1,5
1.228	Citronelol	1,0
1.242	z-citral	21,5
1.252	z-geraniol	1,0
1.265	2-decenal	0,1
1.272	E-citral	30,4
1.293	undecano-2-ona	0,3

1.290	acetato de bornilo	0,1
1.379	Acetato de geranilo	0,5
1.396	β -elemeno	0,1
1.489	α -curcumeno	1,3
1.496	Germacreno D	0,3
1.502	α -Zingibereno	2,4
1.508	α -farneseno	1,2
1.516	β -bisaboleno	1,7
1.528	β -Cadineno	0,1
1.533	β -Sesquifelandreno	1,5
1.538	7-epi- α -selineno	0,1
1.561	Elemol	0,3
1.570	Nerolidol	0,2
1.626	no identificado	0,0
1.653	β -Curcumeno	0,3
1.677	no identificado	0,3
1.700	no identificado	0,1
	β -Eudesmol	0,3
	no identificado	0,1
	Total	99,2
	Monoterpenos hidrocarbonados	16,1
	Monoterpenos oxigenados	72,7
	Sesquiterpenos hidrocarbonados	9,1
	Sesquiterpenos oxigenados	0,8
	No identificado	0,5