

Evaluación del potencial de compuestos volátiles del membrillo como agentes que modulan el comportamiento de individuos de la carpocapsa

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,

Área Ciencias Agropecuarias

María Pía Gomez

Ingeniera Agrónoma - Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan, 2017

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA San Juan. C.R.
Mendoza - San Juan



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

María Liza López

Bióloga - Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina
Doctora en Ciencias Biológicas - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
(FCEFYN), Universidad Nacional de Córdoba (UNC)
Investigador CONICET. Categoría: Investigador Adjunto
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA San Juan. C.R. Mendoza - San
Juan

Codirectora

Liliana Cichón

Ingeniera Agrónoma - Departamento de Agronomía, Universidad Nacional Del Sur
Doctora en Ciencias Biológicas - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad
De Buenos Aires
Instituto Nacional De Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Patagonia Norte

Consejero de Estudios

Jorge Alberto Zavala

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires (UBA)
Magister *Scientiæ* (UBA)
Doctor *Rerum Naturalis* - Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany
Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires

JURADO DE TESIS

María Paula Zunino

Lic. en Biología
Doctora en Ciencias Biológicas

Erika Banchio

Licenciada en Biología
Especialista en Ingeniería Ambiental
Magister en Ingeniería Ambiental
Doctor en Ciencias Biológicas

María Cecilia Rousseaux

Ingeniera Agrónoma
Doctora en Ciencias Agrarias

Fecha de defensa de la tesis: 15 de abril de 2024

DEDICATORIA

A mi mamá Marita y papá Rubén

A mis hermanos Celina, Rodrigo, José Ignacio y Joaquín Omar

A mis sobrinos, Santiago y Emma

A mi amor, Martín...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Directora, la Dra. María Liza López, por haberme dado la oportunidad y por su apoyo y dedicación incondicional.

A mi Codirectora, la Dra. Liliana Cichón, por sus aportes y tiempo dedicado.

A mi Consejero de Estudios, el Dr. Jorge Zavala, por su seguimiento y apoyo.

A mi compañera de beca, la Dra. Flavia Jofré Barud, por sus consejos oportunos sobre los ensayos.

A Liliana y Silvina de la Estación Experimental INTA-Alto Valle, por mandarme “huevos” cuando necesitaba...

A Alejandra Molina, Técnica del área de cría en la Dirección de Sanidad Vegetal, Animal y Alimentos, Gobierno de San Juan. Me enseñó como llevar adelante la cría en laboratorio de carpocapsa, necesario para los ensayos de mi tesis.

A Martín Tivani, mi compañero, por ayudarme, por sus inventos salvadores...

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A la Estación Experimental INTA-San Juan y a la Unidad Integrada-FI-UNSJ, lugar de trabajo, en donde realicé todos los ensayos a campo y en laboratorio. A sus directivos, por todos los permisos otorgados.

A la Cátedra de Química Orgánica, FCEFyN de la Universidad Nacional de Córdoba–IMBIV-CONICET, donde realicé los análisis químicos.

A la Escuela para Graduados, Ing. Agr. Alberto Soriano-FAUBA, a la comisión de doctorado, comisión académica y a todos sus miembros, por guiarme en cada trámite, a la distancia, vía mail o teléfono, siempre presentes.

A mi Mejor Amiga Yanina Guzmán...

A mi familia...

DECLARACIÓN

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique que explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

María Pía Gomez

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Gomez, M. P., Barud, F. J., Díaz, A., y López, M. L. 2023. Oviposition and olfactometry response of codling moth (*Cydia pomonella*) to quince (*Cydonia oblonga*) cultivars. *Journal of Applied Entomology* 147: 307–312.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1.....	1
Introducción general	1
1.1. Introducción general	2
1.2. Hipótesis	14
1.3. Objetivo general.....	15
1.3.1. Objetivos específicos	15
CAPÍTULO 2.....	15
Variación del perfil de compuestos volátiles de cultivares de membrillo en diferentes etapas fenológicas	15
2.1. Introducción	16
2.2. Materiales y Métodos.....	19
2.2.1. Material vegetal.....	19
2.2.2. Volátiles según la fenología del cultivo	21
2.2.3. Metodología general de extracción de compuestos volátiles	22
2.2.4. Análisis químico de volátiles	24
2.2.5. Identificación general de volátiles	25
2.3. Resultados	27
2.3.1. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en Etapa de Floración	27
2.3.2. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de poscuaje a fruto inmaduro	36
2.3.3. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de fruto en crecimiento.....	44
2.3.4. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de fruto en maduración.....	55
2.4. Discusión.....	64
2.5. Conclusión	64
CAPÍTULO 3.....	76
Oviposición de hembras y elección de larvas neonatas de carpocapsa durante la fenología del cultivo	76
3.1. Introducción	77
3.2. Materiales y Métodos.....	79
3.2.1. Obtención de individuos de carpocapsa	79
3.2.2. Ensayo de oviposición de hembras fecundadas	81
3.2.3. Ensayos de doble elección de larvas neonatas	82
3.3. Resultados	85
3.3.1. Oviposición de hembras de carpocapsa	85

3.3.2. Elección de larvas neonatas	95
3.4. Discusión.....	108
3.5. Conclusión	115
CAPÍTULO 4.....	117
Volátiles de membrillo infestados por carpocapsa. Oviposición de hembras y elección de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados.	117
4.1. Introducción	118
4.2. Materiales y Métodos.....	119
4.2.1. Determinación de volátiles de membrillo expuestos al daño por carpocapsa	119
4.2.2. Preferencia de oviposición de hembras fecundadas entre frutos sanos e infestados.....	120
4.2.3. <i>Dual-Choice</i> de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados.....	122
4.3. Resultados	123
4.3.1. Caracterización del perfil de compuestos volátiles de membrillo sano e infestado	123
4.3.2. Oviposición frente a frutos sanos e infestados	146
4.3.3. Elección de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados	146
4.4. Discusión.....	148
4.5. Conclusión	152
CAPÍTULO 5.....	153
Discusión y Conclusiones Generales	153
5.1. Discusión General	154
5.2. Investigaciones futuras.....	158
5.3. Conclusiones	159
Apéndice General.....	160
Bibliografía	169

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1: Compuestos con actividad kairomona y electroantenográfica para hembras de carpocapsa, según los antecedentes en la literatura.	26
Cuadro 2.2: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en flor y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de floración. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.....	28
Cuadro 2.3: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en flor y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de floración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.	34
Cuadro 2.4: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de poscujaje-fruto inmaduro. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.	36
Cuadro 2.5: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de poscujaje-fruto inmaduro. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.	42
Cuadro 2.6: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.	44
Cuadro 2.7: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar . La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.	51
Cuadro 2.8: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.	55
Cuadro 2.9: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en frutos y hojas de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> , en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.	61
Cuadro 3.1: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de poscujaje.	96
Cuadro 3.2: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de poscujaje.	97
Cuadro 3.3: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de poscujaje.	98
Cuadro 3.4: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de fruto inmaduro.	99

Cuadro 3.5: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de fruto inmaduro.	101
Cuadro 3.6: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de fruto inmaduro.	101
Cuadro 3.7: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de crecimiento.	102
Cuadro 3.8: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de crecimiento.	104
Cuadro 3.9: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de crecimiento.	104
Cuadro 3.10: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de maduración.	105
Cuadro 3.11: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de maduración.	107
Cuadro 3.12: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de maduración.	107
Cuadro 4.1: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos vs. infestados de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.....	124
Cuadro 4.2: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.	124
Cuadro 4.3: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos e infestados por carpocapsa, de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.	129
Cuadro 4.4: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.	132
Cuadro 4.5: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos vs. infestados de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.....	136
Cuadro 4.6: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.	137
Cuadro 4.7: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos e infestados por carpocapsa, de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar.	

La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.142

Cuadro 4.9: Comportamiento de merodeo de las larvas neonatas entre los frutos sanos e infestados.147

Cuadro 4.10: Tiempo de elección de las larvas neonatas entre frutos sanos e infestados.....147

Cuadro 4.11: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estados biológicos de carpocapsa (<i>Cydia pomonella</i> L.)	7
Figura 1.2. Fruto de membrillo con daño de carpocapsa.	8
Figura 2.1. Mapa y distribución de la colección de cultivares de membrillo. Campo experimental INTA-San Juan. Cada recuadro indica una planta por cultivar.	20
Figura 2.2. Rama de membrillo cubierta con bolsa de tela para evitar la infestación por carpocapsa. Colección de cultivares de membrillo. Campo experimental INTA-San Juan.	21
Figura 2.3: Representación de las etapas fenológicas del membrillo bajo las cuales se caracterizaron los volátiles y se hicieron los ensayos de comportamiento según las curvas de vuelo de carpocapsa. Elaboración propia.....	22
Figura 2.4. Izquierda: extracción de volátiles mediante SPME. Cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS). GC Perkin Elmer Serie Clarus 580, MS Perkin Elmer Clarus SQ8S.	25
Figura 2.5. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en flores y hojas de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en floración. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	28
Figura 2.6. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas y frutos de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en poscujaje a fruto inmaduro. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	37
Figura 2.7. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas y frutos de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en crecimiento. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	45
Figura 2.8. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas y frutos de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en maduración. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	56
Figura 3.1: Esquema que representa el ciclo de cría de carpocapsa.	81
Figura 3.2: Esquema del ensayo de oviposición. Contenedor conteniendo los cultivares de a pares.	82
Figura 3.3: Esquema del ensayo de elección de larvas neonatas. Contenedor conteniendo los cultivares de a pares.	83
Figura 3.4: Esquema que representa las áreas delimitadas según los comportamientos a registrar en el ensayo de elección de larvas neonatas.	84
Figura 3.5: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos en poscujaje. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$), *($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....	86
Figura 3.6. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de poscujaje. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada	

- por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial, registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....86
- Figura 3.7: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos inmaduros. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$), *($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....87
- Figura 3.8. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de fruto inmaduros. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial, registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....88
- Figura 3.9: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos en crecimiento. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$), *($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....89
- Figura 3.10. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de crecimiento. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial y ramas registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....90
- Figura 3.11: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos en maduración. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$), *($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....91
- Figura 3.12. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de maduración. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial, registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).....92
- Figura 3.13: A) Inicio de floración. B) Floración. C) Poscuaje. D) Fruto inmaduro. E) Fruto en crecimiento. F) Fruto en maduración. Fotos de la colección de cultivares de membrillo EEA San Juan. Elaboración propia.....93
- Figura 3.14: A) Adulto de carpocapsa sobre fruto de membrillo. B) Foto del detalle de pubescencia del fruto de membrillo. C) Huevos de carpocapsa sobre cara adaxial de una hoja de membrillo. D) Foto del detalle de la pubescencia en la cara abaxial de una hoja de membrillo. Fotos con lupa estereoscópica 40x. Elaboración propia.94

- Figura 3.15: Número medio de huevos puestos por carpocapsa por etapa fenológica. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable de respuesta conteo de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja, ramita y fruto, registrados por etapa fenológica, comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).94
- Figura 3.16: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos en poscujaje. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente ($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).96
- Figura 3.17. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de poscujaje. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.97
- Figura 3.18: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos inmaduros. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente ($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).99
- Figura 3.19. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de frutos inmaduros. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.100
- Figura 3.20: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos en crecimiento. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente ($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).102
- Figura 3.21. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de crecimiento. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.103
- Figura 3.22: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos en maduración. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente ($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).105
- Figura 3.23. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de maduración. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el

centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.	106
Figura 3.24: Frecuencia de elección de larvas neonatas por etapa fenológica. La frecuencia de larvas que eligieron algún cultivar difiere significativamente entre etapas fenológicas ($T^2 = 45$, $P = <0,0001$; con la prueba no paramétrica de Friedman). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).	108
Figura 4.1. Representación del ensayo de oviposiciones sobre frutos sanos e infestados por carpocapsa en el cultivar Champion.	121
Figura 4.2. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en frutos sanos e infestados de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en crecimiento. En verde se representa lo sano, en rojo lo infestado y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	125
Figura 4.3. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en crecimiento. En verde se representa lo no expuesto, en rojo lo expuesto y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	126
Figura 4.4. Abundancia relativa porcentual del (E,E)- α -Farneseno en frutos sanos e infestados. Abundancia relativa porcentual del Limoneno, Nonanal y Octanal en Hojas No Expuestas y Expuestas. Se usó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar, en etapa de crecimiento. Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; análisis de varianza de Friedman).	128
Figura 4.5. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en frutos sanos e infestados de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en maduración. En verde se representa lo sano, en rojo lo infestado y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	138
Figura 4.6. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas de cuatro cultivares de <i>C. oblonga</i> en maduración. En verde se representa lo no expuesto, en rojo lo expuesto y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).	139
Figura 4.7. Abundancia relativa porcentual de (E)- β -Ocimeno en frutos sanos e infestados y de Limoneno, (Z)-3-Hexenol, Hexanal y (E,Z)-2,6-Nonadienal en hojas no expuestas y expuestas. Se usó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar, en etapa de maduración. Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; análisis de varianza de Friedman).	141
Figura 4.8. Número medio huevos sobre frutos sanos e infestados por carpocapsa en el cultivar Champion. $N = 12$ repeticiones. El número de huevos por estado del fruto difiere significativamente ($T^2 = 55$, $P < 0,0001$, con la prueba no paramétrica de Friedman). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).	146
Apéndice Figura 1. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de Floración. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos....	161
Apéndice Figura 2. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de flores del cultivar Champion. Etapa de floración. Eje “Y” representa la abundancia relativa (%) y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos....	162

Apéndice Figura 3. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de poscuaje a fruto inmaduro. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.....	163
Apéndice Figura 4. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de frutos del cultivar INTA 37. Etapa de poscuaje a fruto inmaduro. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.....	164
Apéndice Figura 5. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de frutos del cultivar INTA 147. Etapa de crecimiento. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos....	165
Apéndice Figura 6. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de crecimiento. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos....	166
Apéndice Figura 7. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 37. Etapa de maduración. Eje “Y” representa la abundancia relativa (%) y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.	167
Apéndice Figura 8. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de maduración. Eje “Y” representa la abundancia relativa (%) y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.	168

RESUMEN

Evaluación del potencial de compuestos volátiles del membrillo como agentes que modulan el comportamiento de individuos de la carpocapsa

Carpocapsa (*Cydia pomonella* L.) ataca frutales de pepita a nivel mundial. La hembra realiza la localización del hospedero y el reconocimiento del sitio adecuado para la oviposición mediante semioquímicos. Uno de los hospederos menos estudiados y afectado por carpocapsa es el membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.). Surge entonces la posibilidad de identificar en el membrillo, posibles volátiles con actividad electroantenográfica o kairomonas, que tengan aplicación sobre otros hospederos. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de compuestos volátiles presentes en la fenología en curso, de diferentes cultivares de membrillo, a efectos de evaluar el comportamiento de individuos de carpocapsa frente a ellos. Se realizó en cuatro etapas fenológicas del membrillo: poscuaje, fruto inmaduro, fruto en crecimiento y fruto maduro. Se caracterizó el perfil mediante extracción en fase sólida y análisis mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Los cultivares comparados fueron: Champion, INTA 37, INTA 117 e INTA 147. Se realizaron ensayos de oviposición de hembras y elección de larvas neonatas de carpocapsa. Se identificaron grupos químicos como ésteres, sesquiterpenos, monoterpenos, alcoholes, aldehídos y norisoprenoides. La composición y proporción de volátiles fue cambiando con la fenología, siendo la etapa de crecimiento la más variada y con mayor presencia de compuestos electroantenográficos y kairomonas. En esta etapa coincidió la mayor respuesta de oviposición de hembras y la mayor elección de larvas neonatas por algún cultivar. En casi todas las etapas las hembras prefirieron ovipositar sobre la superficie adaxial de las hojas. En etapa de maduración se registraron huevos en áreas del fruto sin pubescencia. El cultivar INTA 147 fue el más elegido en la mayoría de las comparaciones y etapas fenológicas. Este trabajo representa el primer aporte científico sobre la evaluación de compuestos volátiles en membrillo, la oviposición de hembras y elección de larvas de carpocapsa, en distintas etapas fenológicas.

Palabras claves: *Cydia pomonella*, *Cydonia oblonga*, Fenología, Semioquímicos, Kairomonas, Oviposición, Larvas neonatas.

ABSTRACT

Evaluation of the potential of volatile compounds from quince as agents that modulate the behavior of codling moth individuals

Codling moth (*Cydia pomonella* L.) attacks pome fruit trees worldwide. The female locates the host and recognizes the appropriate site for oviposition using semiochemicals. One of the least studied hosts affected by codling moth is the quince (*Cydonia oblonga* Mill.). From this an interesting alternative arises, by identifying in the quince possible volatiles with electroantennographic or kairomones activity, which have application on other hosts. The objective of this work was to determine the profile of volatile compounds present in the ongoing phenology of different quince cultivars, in order to evaluate the behavior of codling moth individuals against them. It was carried out in four phenological stages of the quince: post-setting, immature fruit, growing fruit and mature fruit. The profile was characterized by solid phase extraction and gas chromatography analysis coupled to mass spectrometry. The cultivars compared were: Champion, INTA 37, INTA 117 and INTA 147. Tests of female oviposition and neonate larvae of codling moth were carried out. Chemical groups such as esters, sesquiterpenes, monoterpenes, alcohols, aldehydes and norisoprenoids were identified. The composition and proportion of volatiles changed with phenology, with the growth stage being the most varied and with the greatest presence of electroantennographic compounds and kairomones. At this stage the greatest oviposition response of females and the greatest choice of neonate larvae for any cultivar coincided. In almost all stages, the females preferred to oviposit on the adaxial surface of the leaves. During the ripening stage, eggs were recorded in areas of the fruit without pubescence. The most chosen cultivar in most comparisons and phenological stages was INTA 147. This work represents the first scientific contribution about the evaluation of volatile compounds in quince, the oviposition of females and the choice of codling moth larvae, in different phenological stages.

Keywords: *Cydia pomonella*, *Cydonia oblonga*, Phenology, Semiochemicals, Kairomones, Oviposition, Neonate larvae.

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1. Introducción general

El membrillo (*Cydonia oblonga* Miller), es la única especie del género *Cydonia*, y pertenece a la familia botánica Rosaceae, subfamilia Pomoidae, tribu Maleae y subtribu Malinae. Sus sinonimias son *Cydonia vulgaris* Pers. y *Pyrus cydonia* L. Comparte subfamilia con el manzano (*Malus domestica* Borkh) y el peral (*Pyrus communis* L.). Se encuentra relacionado al género *Chaenomeles* (membrillos de floración asiática), que incluye al membrillo japonés (*C. japonica*), que es una planta ornamental arbustiva con flores rojas y pequeños frutos (Hummer & Janick 2009, Postman 2012). Se considera como centro de origen la región del Cáucaso incluyendo Armenia, Azerbaiyán, Irán, suroeste de Rusia, y Turkmenistán (Postman 2012, USDA 2023).

Morfológicamente es un arbusto o un árbol caducifolio de copa redondeada que puede alcanzar de 4 a 6 metros de altura. El sistema radicular es superficial y fasciculado, con un tronco tortuoso. Posee hojas ovales a oblongas tomentosas y pubescentes en ambas caras cuando son jóvenes, manteniendo esas características en la cara abaxial cuando son adultas. Los pecíolos, yemas y ramas del año son pubescentes. Las flores son solitarias, de color blanco, florecen de septiembre a octubre (hemisferio sur) (Wertheim 2002, Postman 2009). Todas las variedades son autofecundantes (Postman 2009), pero el cuaje y número de semillas por fruto aumenta por polinización cruzada (Duron et al. 1989, Benedek et al. 2001). Pueden existir más de 50 semillas por fruto, estas son marrones, aplanadas y adheridas a un mucílago (Silva et al. 2004, Pio et al. 2007).

El fruto de membrillo es pubescente, globoso-alargado, de 6 a 8 cm de diámetro y con un peso medio de 130-400 gramos (Rodríguez-Guisado et al. 2009, Leonel et al. 2016, Cólica 2017). Durante la fase inicial de desarrollo, la epidermis cambia su color de un tono marrón a un verde claro, y a medida que alcanza la madurez, adquiere un tono

amarillo dorado (Wertheim 2002, Cólica 2017). Los frutos del membrillo presentan un patrón de maduración climatérico (Gunes 2008, de Almeida Lopes et al. 2018). Si bien es un fruto de atractivo aroma y color, no es consumido como fruta fresca debido a su dureza, amargura, y astringencia. Sin embargo, procesado como dulce tipo mermelada, jalea o “tipo pan” es muy apreciado y consumido como parte de preparaciones regionales (Silva et al. 2006, Alvarenga et al. 2008, Tateo & Bononi 2010, Choi et al. 2018).

No solamente está implicado en productos comestibles, también se le atribuyen propiedades farmacéuticas y medicinales. Estas incluyen a infusiones de hojas del membrillo con propiedades sedantes, antipiréticas, anti-diarreicas, y antitusivas y también para el tratamiento de diversas enfermedades de la piel (Oliveira et al. 2007). La fruta de membrillo también ha sido reconocida como una fuente natural de compuestos que promueven la salud con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiproliferativas (Hamaizu et al. 2005, Fattouch et al. 2007, Sabir et al. 2015). Se destacan por su buen contenido de pectinas, al ser un ingrediente de interés en la industria alimenticia, para la elaboración de dulces y mermeladas, debido a su capacidad de gelificar (Lanvín & Matsuya 2004, Acikgoz 2011, Brown et al. 2014, Cinkmanis et al. 2020). El membrillero también se utiliza en la agricultura como patrón de perales ya que mejora la productividad y calidad de la fruta y puede ser propagado fácilmente usando técnicas tradicionales o modernas, como la micropropagación (Schuch et al. 2010).

Los frutos del membrillo son llamados de distintas maneras de acuerdo con la lengua: en árabe: Sefarjal; en chino: Wen po; en inglés: Quince; en francés: Cognassier o Coing; en alemán: Quitte o Quittenbaum; en portugués: Marmelo; en ruso: Ajva; en español: membrillero; y en sueco: kvitten, entre otros (Postman 2012, Mir et al. 2015, USDA 2023). Es un fruto que hasta hoy en día se encuentra ligado a tradiciones familiares y productos artesanales. Aunque es una especie ampliamente difundida, solo en unos pocos

países se produce. A comienzos del siglo XX la producción de membrillo disminuyó a medida que el valor de las manzanas y peras aumentó (Postman 2009). Las zonas más consumidoras y productoras de membrillo a nivel mundial son Oriente Medio (Turquía, China, Uzbekistán, Irán, Marruecos, Azerbaiyán). En el área mediterránea tiene menos importancia. Argentina se encuentra en el 10° lugar como productor (FAO 2021).

En Argentina, los frutales de pepita (manzano, peral y membrillo), poseen 41 mil hectáreas (INDEC 2021), con una producción de aproximadamente 1,2 millones de toneladas (FAO 2021). El cultivo de membrillo ocupa una superficie total de 2341 ha, distribuidas principalmente en Mendoza (1456,7 ha), San Juan (439,8 ha) y Catamarca (348,3 ha), entre otras provincias (INDEC 2021). Actualmente el destino de la producción es principalmente para industria donde el dulce de membrillo es el principal producto elaborado y en menor proporción para consumo en fresco (Cólica 2017). Los cultivares implantados a nivel nacional, inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares, son: Champion, Early Golden, Manning Seedling, Portugal, Smyrna, Sydo, y C/ EM C (usado comúnmente como portainjertos de cultivares de pera). Los cultivares INTA 37, INTA 117, INTA 147 son el producto de un plan de mejora genética que llevó a cabo el Ing. Fernando Roby en la década del '60, en la Estación Experimental Agrícola Mendoza, Argentina. Todas provienen de una selección masal de semillas del cultivar Smyrna. El cultivar INTA 147, se destacó por ser el más productivo (Cólica 2017). El cultivar más difundido entre provincias es Champion, muchas veces llamado “Criollo” (Ing. Juan José Cólica, comunicación personal).

El membrillo es uno de los principales cultivos frutícolas de la provincia de San Juan. Las características edafoclimáticas en los oasis de riego ofrecen óptimas condiciones para la producción de membrillos de alta calidad y según el relevamiento del Departamento de Hidráulica (2007) del Gobierno de la provincia de San Juan. Anualmente en esta

provincia se producen 5 000 toneladas de membrillos frescos sin procesar con destinos a industrias elaboradoras de dulces y mermeladas en Córdoba, Tucumán y Mendoza entre otras provincias. La capital o zona núcleo de este frutal está en Villa Mercedes, departamento Jáchal con el mayor porcentaje de superficie implantada (Departamento de Hidráulica 2007).

A partir del mesocarpio y semillas del membrillo se elaboran tradicionalmente dulces tipo pan, mermeladas y jaleas, que forman parte de la economía regional de la provincia. El dulce de membrillo rubio a fines del 2016 se convirtió en el 8° producto con Denominación de Origen reconocido en el país; y el 2° para la provincia de San Juan. Esto permite dar un valor agregado a la producción (PROCAL 2016, SAGyP 2018). Por ello es importante la sanidad del fruto ya que se genera un gran descarte de producción debido al ataque de plagas, principalmente la “carpocapsa”.

Cydia pomonella (L.), conocida comúnmente como “carpocapsa”, “Polilla de la Manzana” y “Gusano de la Pera y la Manzana”, pertenece al orden Lepidóptera y familia Tortricidae (Cichón et al. 2015). Es considerada una plaga olífaga (Wearing et al. 2001, Casado 2007), sus principales hospederos son los frutales de pepita (peras, manzanas y membrillos) y nogales, y se encuentra en la mayoría de las regiones donde están presentes estos cultivos (Fernández 2012, Cichón et al. 2015). Se alimenta de la pulpa y las semillas de la fruta, y en ocasiones temporalmente de follaje (Urretabizkaya et al. 2010). También se cita a la plaga atacando a frutales como ciruelos, durazneros, nectarinas, damascos y granados (Martí Martí 2000, Fernández 2012).

Esta plaga puede presentar varias generaciones (especie multivoltina) en una temporada (Casado 2007, Urretabizkaya et al. 2010, Quintana & Cólica 2011). En nuestro país presenta 3 generaciones anuales, y hasta 4 en el Alto Valle de Río Negro

(Urretabizkaya et al. 2010). Son insectos que no pueden regular la temperatura corporal, por lo que su desarrollo es determinado por condiciones climáticas, entre las cuales la temperatura tiene mayor importancia. El ciclo biológico de carpocapsa depende de un tiempo fisiológico calculado en función de la acumulación de grados-días o carpogrados, dentro de un umbral mínimo de 10°C a uno máximo de 31°C. Debajo del mínimo, carpocapsa entra en diapausa, por encima del máximo, pasa a latencia (Casado 2007, Quintana & Cólica 2011, Fernández 2012). La termo-acumulación para una generación de huevo a adulto es de 562°D (45 a 55 días) (Quintana & Cólica 2011, Cichón et al. 2015).

Su ciclo biológico está sincronizado con la fenología del manzano, ya que es su hospedero principal y evolucionaron juntos (Figura 1.1). En su ciclo biológico atraviesa los estados de huevo, larva (con 5 estadios), pupa y adulto. Pasa el invierno como larva madura diapausante (larva de quinto estadio), en un capullo en el tronco o ramas principales del árbol huésped y en lugares protegidos, como en la hojarasca o heridas de poda (Martí Martí 2000, Fernández 2012). En primavera, a partir de las larvas diapausantes se forman pupas, luego emergen los adultos. El primer vuelo de adultos puede coincidir con la floración y caída de pétalos en frutales de pepita (Cichón 2004, Cichón et al. 2015). El vuelo del adulto se describe en zig-zag con leves ascensos y descensos, con desplazamientos de 11 a 50 metros (Cichón 2004). El vuelo puede ser afectado por una serie de factores ambientales incluyendo la intensidad de la luz, temperatura, humedad y movimientos de aire (Martí Martí 2000). La hembra atrae al macho realizando un llamado mediado por la emisión de una feromona. El macho localiza a la hembra e inician el proceso de cópula (Geier 1963, Martí Martí 2000), la cual predomina durante el atardecer, ya que los adultos son de hábitos crepusculares (Urretabizkaya et al. 2010). Luego del apareamiento, la hembra una vez fecundada,

realiza un reconocimiento del sitio adecuado para la oviposición. Esto es sumamente vital, ya que debe garantizar que la larva neonata pueda alimentarse y desarrollarse, y por consiguiente la continuidad del ciclo (Jackson 1979, Martí Martí 2000). Esta localización puede implicar el seguimiento de determinados estímulos, visuales, táctiles y olfativos (Martí Martí 2000, Finch & Collier 2008, Carrasco et al. 2015).



Figura 1.1. Estados biológicos de carpocapsa (*Cydia pomonella* L.)

La mayoría de los huevos son puestos en las hojas cerca de los frutos, aunque algunos se pueden encontrar en lugares distantes de árboles, como en el follaje, o madera del árbol huésped (Jackson 1979, Martí Martí 2000, Fernández 2012, Cichón et al. 2015). La hembra prefiere oviponer sobre superficies lisas, evitando las pubescentes o rugosas (Martí Martí 2000, Casado 2007). La disposición de huevos puede ser en solitario o en grupos (Geier 1963, Wearing 2016). Los huevos miden aproximadamente 1,5 mm de diámetro y atraviesan 3 etapas de desarrollo embrionario. Por ser de apariencia traslúcida puede observarse lo que ocurre dentro, identificándose un estadio inicial denominado “cremoso”, seguido por “anillo rojizo” y por último “huevo cabeza negra” (Quintana & Cólica 2011). Las larvas recién nacidas o neonatas miden 1,5 mm de largo, son de color blanco y poseen una cabeza predominante de color negro. Estas larvas neonatas no pueden elegir entre potenciales hospederos porque se desplazan solamente en distancias muy cortas y sobreviven en un breve periodo de tiempo sin alimentación, además quedan expuestas a factores ambientales y depredación, por lo que deben localizar y penetrar las

frutas rápidamente (Jackson 1979, Martí Martí 2000). Por ello, la selección del huésped se limita a la etapa del adulto.

El daño se produce durante la fase larvaria, al ser una especie carpófaga, se alimenta de la pulpa, las semillas de la fruta, y en ocasiones temporalmente de follaje (Figura 1.2). El ataque de las primeras generaciones produce la caída del fruto, arruinando la cosecha (Urretabizkaya et al. 2010, Quintana & Cólica 2011). El punto de ingreso puede darse entre dos frutos que están en contacto, una herida o por la zona peduncular o calicinal (Cichón 2004). Esta última es preferida en perales debido a la dureza de algunos constituyentes de la epidermis de los frutos (Cichón et al. 2015), donde se sugiere que podría estar relacionado a concreciones de calcio (esclereidos). Una vez que la larva neonata localiza el fruto, realiza una galería en donde muda al segundo estadio. La larva de segundo estadio se dirige directamente a la zona donde se encuentran las semillas (Quintana & Cólica 2011, Cichón et al. 2015). Generalmente no se encuentran más de una larva por fruto, en algunos casos presentan canibalismo (Urretabizkaya et al. 2010). Las larvas mudan del cuarto al quinto estadio alimentándose de la pulpa (Cichón et al. 2015). Las galerías internas se van tapando de pulpa deteriorada y excrementos de las larvas, dañando los frutos estéticamente y disminuyendo su calidad, lo cual impide la venta en fresco, provocando pérdidas económicas en etapa de producción, empaque y en la comercialización (Fernández 2012).



Figura 1.2. Fruto de membrillo con daño de carpocapsa.

Las larvas maduras de quinto estadio miden entre 12 y 18 mm de largo (Cichón et al. 2015). Permanecen dentro del fruto de 25 a 30 días, luego lo abandonan para empupar, por una nueva galería o por la que ingresaron (Quintana & Cólica 2011, Cichón et al. 2015). En la búsqueda de un sitio adecuado para mudar o entrar en diapausa, estas larvas maduras se desplazan por ramas y troncos a veces valiéndose de un hilo de seda que ellas producen. Estas larvas empupan y emergen como la próxima generación de adultos o bien, pueden entrar en diapausa cuando las condiciones no son favorables (Cichón et al. 2015).

Las plantas emiten a la atmósfera constantemente compuestos volátiles biogénicos. Estos son metabolitos secundarios y se generan en distintas partes, como hojas, brotes, flores y raíces. Incluyen especies químicas como isopreno, terpenos, volátiles de hojas verdes, carbonilos, ácidos orgánicos, haluros, compuestos de azufre y benzenoides. En las interacciones planta-insecto, los compuestos volátiles son reconocidos como claves de señalización, especialmente por herbívoros y polinizadores (Dudareva et al. 2006, Jamieson et al. 2017). Estas emisiones son complejas, una sola especie vegetal puede emitir varias docenas de compuestos volátiles. Las emisiones de compuestos volátiles son afectadas por diversos factores: predominando la diversidad genética, se pueden dar variaciones entre la interacción planta-ambiente. Se incluye además la temperatura, luz, ataque por herbivoría, daños mecánicos, el ciclo fenológico propio de cada especie vegetal, sequía, precipitaciones y la humedad relativa (Dudareva et al. 2006, Casado 2007, Muhlemann et al. 2014).

Existen compuestos volátiles con el rol específico de mediar el encuentro entre un insecto plaga con individuos de su misma especie o con sus potenciales hospederos. Estos compuestos se denominan semioquímicos y modulan interacciones intra e inter-específicas entre diferentes organismos. Estos compuestos se dividen en dos grandes

grupos: feromonas, las cuales se clasifican en función del comportamiento que generan, como el apareamiento, agregación y alarma; y los aleloquímicos que intervienen en las relaciones entre individuos de diferentes especies. Del grupo de aleloquímicos se conocen cuatro tipos: alomonas, kairomonas, sinomonas y antimonas (Schoonhoven et al. 2005, Casado 2007). Las kairomonas son sustancias volátiles que cuando se perciben, generan una respuesta fisiológica o de comportamiento que beneficia al receptor y perjudica al emisor (Casado 2007, Witzgall et al. 2008).

Se han realizado varios estudios sobre estos compuestos volátiles y la relación que establecen entre la carpocapsa y sus principales hospederos, el manzano y el peral. Más de trecientos compuestos se han identificado en manzano (Espino-Diaz et al. 2016) (Espino-Diaz et al. 2016), incluso en diferentes estados fenológicos (Bengtsson et al. 2001). Determinados volátiles del manzano provocan una respuesta antenal en hembras fecundadas para la oviposición cerca de los frutos, y las larvas parecen poseer el aparato sensorial necesario para detectarlos (Witzgall et al. 2008).

El (E,E)- α -Farneseno, uno de los compuestos más abundantes en manzanas, provoca una respuesta en hembras fecundadas para la oviposición cerca de los frutos (Sutherland & Hutchins 1972, Wearing & Hutchins 1973, Hern & Dorn 1999) y es atrayente en larvas neonatas (Sutherland & Hutchins 1972, Hern & Dorn 1999, Landolt et al. 2000, Coracini et al. 2004). El (E,E)- α -Farneseno también provoca atracción en machos adultos de carpocapsa en túnel de viento y ensayos a campo, con mezclas sinérgicas con (E)- β -Farneseno o (E,Z)-2,4-decadienoato de etilo (éster de pera) (Ansebo et al. 2004, Coracini et al. 2004). El éster de pera es una kairomona que atrae ambos sexos de la carpocapsa (Knight & Light 2001, Light et al. 2001). Se ha reportado como atrayente de hembras al hexanoato de butilo en manzanas maduras en ensayos en túnel de vuelo y a campo (Hern & Dorn 2004).

El perfil de volátiles de los frutos cambia en respuesta al daño por la plaga. En frutos de manzano infestados con carpocapsa, las cantidades de (E,E)- α -Farneseno aumentaron respecto a los frutos sanos (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002, 2004). También se ha reportado que las larvas neonatas mediante herbivoría inducen la producción de E)- β -Ocimeno (Hern & Dorn 2002). Frutos que fueron dañados por larvas de carpocapsa fueron más atractivos para larvas neonatas (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002) y para las hembras fecundadas (Hern & Dorn 2002). Landolt et al. (2000) expresaron que sería perjudicial para la larva neonata dirigirse hacia un fruto ocupado, pero quizás esto se deba a que el (E,E)- α -Farneseno provoca atracción a cortas distancias (Martí Martí 2000, Bengtsson et al. 2001), siendo más percibidos los frutos dañados, los cuales emiten mayores cantidades del volátil, comparativamente con los sanos.

En frutos del membrillo, el componente mayoritario en aceites esenciales de frutos es el (E,E)- α -Farneseno (Shimizu & Yoshihara 1977, Tsuneya et al. 1983, Tateo & Bononi 2010). En menor proporción se encuentra el acetato de (E,Z)-2,4-decadienilo (Shimizu & Yoshihara 1977). Sin embargo, no hay publicaciones científicas sobre las posibles respuestas e interacciones que pueden generar estos volátiles entre la carpocapsa y el membrillo y si estos varían en proporción en los distintos cultivares y con la fenología del cultivo. A nivel local, en la provincia de San Juan, se realizó un estudio preliminar sobre esta interacción en la que se evaluó la preferencia de oviposición por parte de hembras fecundadas y la elección de larvas neonatas frente a cuatro cultivares de membrillo (Gómez et al. 2023).

El uso intensivo de insecticidas de amplio espectro data de hace muchos años para el control de distintas plagas y de carpocapsa. Este tipo de control condujo a problemas ambientales y de salud, la aparición de poblaciones resistentes, y los brotes de plagas secundarias (Casado 2007). En los últimos años se observó una tendencia al control de

carpocapsa mediante la técnica de confusión sexual, sin embargo, posee limitaciones, no es eficaz a altas densidades de población y presenta problemas de inmigración de hembras apareadas, situación que debe ser controlada mediante el tratamiento de campos adyacentes (Witzgall et al. 2008). En la última década se ha registrado un cambio en el uso de agroquímicos para el control de la carpocapsa, propiciado por las limitaciones en el uso de insecticidas de amplio espectro, especialmente los organofosforados (Fernández 2012). Anualmente a nivel mundial las plagas provocan importantes pérdidas para la agricultura, y por ello es importante lograr nuevos métodos de control, más eficaces, y sobre todo más respetuosos con el medio ambiente, que permitan el desarrollo de una agricultura sostenible (Vacas Gonzáles 2011).

La búsqueda de estrategias de control amigables con el medio ambiente durante mucho tiempo ha sido abordada principalmente a partir de productos de origen natural, incluidas las feromonas de insectos y aleloquímicos de plantas. El uso de técnicas que emplean feromonas ya está bien documentado, pero las hembras de carpocapsa básicamente no se ven afectadas en las técnicas de confusión sexual o captura masiva con mezclas de feromonas sintéticas. Los volátiles que producen las plantas son cruciales para la búsqueda de hospedantes y la reproducción de los insectos fitófagos.

En un contexto global de cambio climático, la dinámica de los insectos plagas se ve alterada, afectando la producción de cultivos (Witzgall et al. 2008, Jamieson et al. 2017, Deutsch et al. 2018, Taylor et al. 2018). Debido a esto, el control de plagas es un desafío urgente, en donde alternativas de control de la carpocapsa en base a los distintos comportamientos que generan los semioquímicos, pueden dar lugar al desarrollo sostenible en producciones agrícolas. Para ello es necesario estudiar y evaluar el potencial de los compuestos volátiles de los hospederos, las proporciones que producen y el perfil que pueden ofrecer los distintos cultivares cultivados. Para el cultivo del membrillo, esta

información está ausente en la comunidad científica y a la vez generaría una revalorización en el sector frutícola de la provincia y de la región, al producir mayor cantidad de frutos sanos de calidad sumando el empleo de técnicas de control amigables con el medio ambiente.

Con el presente trabajo de tesis se pretende identificar y caracterizar los compuestos volátiles presentes en flores, hojas y frutos de distintos cultivares de membrillo, durante el ciclo fenológico desde floración hasta maduración. También se evalúa la preferencia de carpocapsa frente a los distintos cultivares siguiendo el ciclo biológico de la plaga. La investigación realizada busca contribuir a la generación de conocimientos científico a nivel nacional con proyección al ámbito internacional sobre la interacción membrillo-carpocapsa.

1.2. Hipótesis

- a) El perfil de compuestos volátiles varía con las distintas etapas fenológicas del membrillo.
- b) La elección del sitio para la oviposición difiere según la preferencia de las hembras fecundadas de carpocapsa. Esta elección también es diferente entre los distintos cultivares y las etapas fenológicas del membrillo.
- c) La respuesta de oviposición de las hembras de carpocapsa es diferente entre cultivares y las etapas fenológicas del membrillo.
- d) La respuesta de elección de las larvas neonatas de carpocapsa es distinta entre cultivares y las etapas fenológicas del membrillo.
- e) El perfil de volátiles en los frutos infestados por carpocapsa es distinto en comparación con los frutos sanos.
- f) Los frutos infestados por carpocapsa son más atractivos para la oviposición.
- g) Los frutos infestados por carpocapsa son más atractivos para la elección de larvas neonatas.
- h) La predisposición del membrillo a ser atacado por carpocapsa es diferente entre cultivares.

1.3.Objetivo general

Determinar el perfil de compuestos volátiles presentes en la fenología en curso, de diferentes cultivares de membrillo, a efectos de evaluar el comportamiento de individuos de carpocapsa frente a ellos.

1.3.1. Objetivos específicos

- a) Determinar el perfil de compuestos volátiles en: hojas, flores y frutos de cuatro cultivares de membrillo, en las etapas fenológicas del cultivo y sin la exposición a la plaga. Capítulo 2.
- b) Determinar la preferencia de oviposición de hembras fecundadas de carpocapsa, entre hojas y frutos en las diferentes etapas fenológicas del cultivo. Capítulo 3.
- c) Evaluar la respuesta de oviposición y elección frente a cuatro cultivares, por parte de hembras fecundadas. Capítulo 3.
- d) Evaluar la respuesta de preferencia de larvas neonatas de carpocapsa, frente a cuatro cultivares, en diferentes etapas fenológicas. Capítulo 3.
- e) Determinar el perfil de volátiles de frutos infestados y hojas expuestas a la plaga, en etapa de frutos en crecimiento y en maduración. Capítulo 4.
- f) Determinar la preferencia de oviposición de hembras de carpocapsa entre frutos sanos e infestados, en etapa de maduración. Capítulo 4.
- g) Evaluar la respuesta de preferencia de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados, en etapa de maduración. Capítulo 4.

CAPÍTULO 2

Variación del perfil de compuestos volátiles de cultivares de membrillo en diferentes etapas fenológicas

2.1. Introducción

En el ámbito de las interacciones entre plantas e insectos, se ha identificado que los compuestos volátiles desempeñan un papel crucial en la señalización (Heard 1999, Finch & Collier 2008, Carrasco et al. 2015). Es posible que una única planta genere emisiones de compuestos volátiles de gran complejidad (Carrasco et al. 2015). Diversos factores pueden influir en estas emisiones, incluyendo la diversidad genética y las variaciones en la interacción entre la planta y su entorno. Entre estos factores se encuentran la temperatura, la luz, los ataques de herbívoros, los daños mecánicos, el ciclo fenológico de cada especie vegetal, la sequía, las precipitaciones y la humedad relativa (Casado 2007, Muhlemann et al. 2014, Espino-Díaz et al. 2016).

El encuentro entre un insecto plaga con individuos de su misma especie o con sus potenciales hospederos, está señalizado y facilitado por compuestos volátiles. Estos compuestos se conocen como “semioquímicos” (Casado 2007, Bakthavatsalam 2016). Las kairomonas son semioquímicos volátiles que cuando se perciben, generan una respuesta fisiológica o de comportamiento que beneficia al receptor (insectos herbívoros) y perjudica al emisor (plantas) (Schoonhoven et al. 2005, Casado 2007, Witzgall et al. 2008, Suckling 2015).

Una de las plagas de frutales de pepita a nivel mundial más importante, es la carpocapsa. La hembra fecundada de carpocapsa realiza la localización del hospedero y el reconocimiento del sitio adecuado para la oviposición. Esta localización puede implicar el seguimiento de determinados estímulos, visuales, táctiles y semioquímicos (Martí Martí 2000). Esto es sumamente vital para la alimentación y desarrollo de la larva neonata, y por consiguiente la continuidad del ciclo (Jackson 1979, Martí Martí 2000). El daño se produce durante la fase larvaria, ya que se alimenta de la pulpa, de las semillas

de la fruta, y en ocasiones temporalmente de follaje. El ataque de las primeras generaciones produce la caída del fruto, afectando la cosecha (Urretabizkaya et al. 2010).

Para conocer el riesgo potencial de esta plaga, el monitoreo fue necesario para la detección temprana antes de que ocurra el daño. Esto lleva tiempo, esfuerzo y requiere un grado de sincronización entre las tareas a realizar y el ciclo real de la plaga en el campo (Cichón 2004, Fernández 2012). El descubrimiento, síntesis y uso de las feromonas sexuales para el monitoreo logró una aproximación al control de carpocapsa (Fernández 2012, Knight et al. 2018, Preti et al. 2021). En la búsqueda de compuestos químicos que logren superar estas dificultades, muchos trabajos se orientaron en los compuestos volátiles de su principal hospedero, el manzano. En este contexto el (E,E)- α -Farneseno fue el principal candidato, pero dada su naturaleza química, lo hace un compuesto inestable para su aplicación en campo (Cavill & Coggiola 1971, Light et al. 2001). El (E,E)- α -Farneseno por mucho tiempo fue reconocido como la kairomona principal de carpocapsa, atrayendo adultos y larvas. En investigaciones posteriores se descubre el (2E,4Z)-Decadienoato de Etilo, conocido comercialmente como PE o éster de pera (Light & Knight 2005). Este hallazgo sirvió para detectar con mayor precisión el vuelo de los adultos de carpocapsa, ya que es una potente kairomona que atrae ambos sexos (Knight & Light 2001, Light et al. 2001). Varios volátiles del manzano provocan una respuesta electroantenográfica en machos y hembras de carpocapsa (Bengtsson et al. 2001, Bäckman et al. 2001, Ansebo et al. 2004, Casado et al. 2006). Entre los compuestos activos para hembras de carpocapsa se encuentran: (E,E)- α -Farneseno, (Z,E)- α -Farneseno, (E)- β -Farneseno, β -Cariofileno, D-Germacreno, β -Mirceno, β -Pineno, (E)- β -Ocimeno, (Z)-3-Hexenol, Acetato de (Z)-3-Hexenol, Salicilato de metilo, Octanal, Decanal y Nonanal (Bengtsson et al. 2001, Bäckman et al. 2001, Ansebo et al. 2004, Witzgall et al. 2005, Casado et al. 2006, El-Sayed et al. 2013). Además, pruebas de

captura en campo han demostrado que el β -Cariofileno y el Limoneno atraen a hembras de carpocapsa (Landolt & Guédot 2008).

Más de trescientos compuestos volátiles se han identificado en el manzano (El Hadi et al. 2013, Espino-Diaz et al. 2016), incluso en diferentes etapas fenológicas (Bengtsson et al. 2001, Rapparini et al. 2001, Vallat & Dorn 2005, Casado et al. 2006). También se han realizado estudios en otros hospederos como el peral (Miller et al. 1989, Baraldi et al. 1999, Najjar-Rodriguez et al. 2013) y el nogal (Buttery et al. 2000, Casado et al. 2008, Lee et al. 2011). Sobre el membrillo como hospedero, hasta el momento hay un primer trabajo local que caracterizó la composición de volátiles (López et al. 2022). También se evaluó la preferencia de oviposición de hembras y elección de larvas neonatas de carpocapsa (Gómez et al. 2023).

El membrillo es uno de los principales cultivos frutícolas de la provincia de San Juan (INDEC 2021). A fines del 2016, el dulce de membrillo rubio se convirtió en el 8° producto con Denominación de Origen reconocido en el país; y el 2° para la provincia de San Juan. Por ello es importante la sanidad del fruto ya que se genera un gran descarte de producción debido al ataque de plagas, principalmente la “carpocapsa”. Los cultivares de membrillo INTA 37, INTA 117, INTA 147, son el producto de un plan de mejora genética que llevó a cabo el Ing. Fernando Roby en la década del '60, en la Estación Experimental Agrícola INTA-Mendoza, Argentina. El cultivar INTA 147, se destacó por ser el más productivo y uno de los comercializados en viveros certificados (Cólica 2017). El cultivar más difundido entre provincias es Champion, muchas veces llamado “Criollo” (Ing. Juan José Cólica, comunicación personal).

Es evidente que los volátiles atrayentes no son siempre los mismos en todos los hospederos ni tampoco están presentes todo el tiempo (Bengtsson et al. 2001, Casado et

al. 2006, Lu et al. 2014). Al ser una plaga olífaga, la identificación de los volátiles del membrillo y la respuesta comportamental de carpocapsa, podrían indicar posibles kairomonas de uso en otros hospederos. En este capítulo, el objetivo principal es determinar el perfil de compuestos volátiles en el membrillo según el desarrollo fenológico del cultivo. Para ello se analizaron hojas, flores y frutos de cuatro cultivares de membrillo, sin exposición a la plaga. Este trabajo representa el primer aporte científico sobre la evaluación de compuestos volátiles en membrillo en distintas etapas fenológicas.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Material vegetal

Se dispuso de un pequeño monte con membrillo (*Cydonia oblonga* Mill.) de 30 años y 720 m² de superficie, implantados en el campo anexo de la Estación Experimental Agropecuaria de INTA, provincia de San Juan, departamento Pocito. El monte está estructurado con tres hileras implantadas con orientación Norte-Sur, bajo la denominación de una colección de cultivares de membrillos. El marco de plantación es de 5 metros entre hileras y 3 metros entre plantas. El riego implementado en el monte es de doble surco a 50 cm del pie de cada planta, el sistema de conducción es en vaso con 4 o 5 brazos y la altura es de 2,5 m hasta los 4 m, según el vigor de cada cultivar. Los cultivares elegidos para esta tesis son los siguientes: Champion, INTA 37, INTA 117 e INTA 147, con 8 plantas cada uno (Figura 2.1).

NORTE	
Champion	INTA 37
INTA 117	INTA 147
SUR	

Figura 2.1. Mapa y distribución de la colección de cultivares de membrillo. Campo experimental INTA-San Juan. Cada recuadro indica una planta por cultivar.

Para la caracterización del perfil de volátiles de los cultivares en las diferentes etapas fenológicas, se necesitó que el material vegetal se encuentre en estado sano (sin infestación por carpocapsa). Para mantener el material vegetal sano, se colocaron bolsas confeccionadas a partir de tela color blanco tipo *voile* (Figura 2.2). El tramado de esta tela no permite el ingreso ni salida de larvas neonatas y de individuos adultos de carpocapsa, ni de otra especie, pero si el paso de luz y aire. Se midió la transmitancia de las bolsas. Para ello se tomaron cinco medidas en el lado este y cinco en el lado oeste de cada hilera. Se realizaron en el sector medio-alto de cada planta, mediante el uso de una barra integradora de flujo de luz fotosintética (Apogee Instruments Inc. Model QMSS). Las medidas se realizaron sobre la canopia a las 12:30 h en el mes de enero. La transmitancia PAR de las bolsas fue de $0,78 \pm 0,03$.

Se colocaron bolsas cilíndricas de una longitud de 0,80 m y un diámetro de 0,35 m. Estas se colocaron posterior a la antesis del 50% de las flores, para asegurar la

polinización, fecundación y cuaje. Se embolsaron ramas que presentaron expresión vegetativa similar, expuestas al sol y orientadas en el lateral este y oeste de cada hilera. Se seleccionaron las ramas del sector medio-alto de cada planta, debido a la preferencia de vuelo de carpocapsa. Se embolsaron cuatro ramas por planta, colocando dos bolsas a cada lado de la hilera. Se mantuvieron durante todo el ciclo productivo un total de treinta y dos ramas embolsadas por cultivar. La longitud de las ramas fue de 0,70 m. Al momento del embolsado la cantidad de frutos fue elevada, pero en época de fruto inmaduro, se observó que ocurre una caída natural. Luego de esta caída, la cantidad de frutos fue entre cinco y seis por rama. Se presentó una relación de cuatro a cinco hojas por fruto.



Figura 2.2. Rama de membrillo cubierta con bolsa de tela para evitar la infestación por carpocapsa. Colección de cultivares de membrillo. Campo experimental INTA-San Juan.

2.2.2. Volátiles según la fenología del cultivo

Para realizar la caracterización del perfil de compuestos volátiles, las etapas fenológicas se definieron según Martínez-Valero et al. (2001). Estas se detallan a continuación:

- a) Floración: cuando el 80-90% de flores estuvieron abiertas. Esto ocurrió el 24 de septiembre del 2018.

- b) Frutos en poscuaje-frutos inmaduros: entre 10 y 60 días después de la floración. Esto ocurrió el 12 de noviembre del 2018.
- c) Fruto en crecimiento: aproximadamente a los 150 días después de la floración. Esto ocurrió el 10 de febrero del 2019.
- d) Maduración: cuando los frutos pasaron del color verde amarillento a amarillo dorado. En el membrillo esto ocurre aproximadamente entre los 200 y 220 días después de la floración. Esto ocurrió el 7 de abril del 2019.

En función de las etapas fenológicas se plantearon los ensayos según el ciclo biológico de carpocapsa (Figura 2.3).

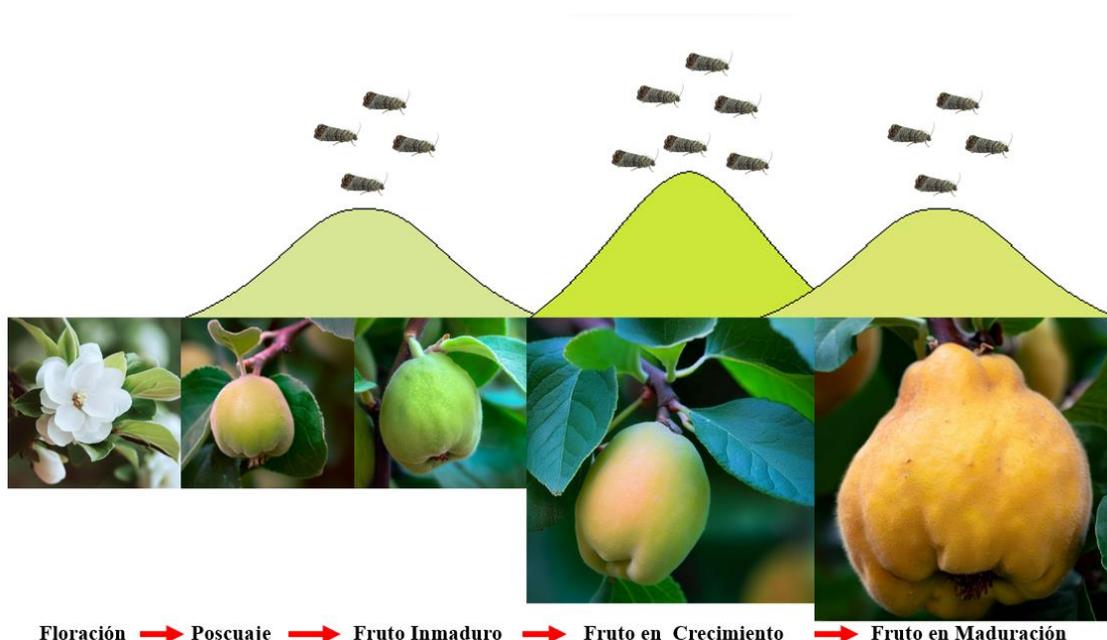


Figura 2.3: Representación de las etapas fenológicas del membrillo bajo las cuales se caracterizaron los volátiles y se hicieron los ensayos de comportamiento según las curvas de vuelo de carpocapsa. Elaboración propia.

2.2.3. Metodología general de extracción de compuestos volátiles

Todas las muestras en las distintas etapas fenológicas fueron extraídas entre las 17:00 y 18:00 horas. Se procede con la metodología al día siguiente de la toma de muestras. Como soporte del muestreo se utilizó un vial de 40 ml, de color caramelo y de 2,90 cm

de diámetro por 8,20 cm de alto (Supelco ®). A continuación, se describe el procedimiento del muestreo del material vegetal, realizado para la extracción de los compuestos volátiles de los cultivares elegidos, en las etapas fenológicas y órganos propuestos:

- a) Muestra de Flores: Se realizó una muestra compuesta por cada cultivar de 20 flores, en floración. Luego se tomó una submuestra de 4 flores por cada cultivar, se pesaron, y se las colocó sin aplastar, dentro de un vial, el cual se llenó hasta la tercera parte de su capacidad.
- b) Muestra de Frutos: Se tomó una muestra compuesta de 8 frutos por cultivar, según el momento fenológico. De cada una se tomó una submuestra al azar de 4 frutos, estos sin lavar fueron dispuestos para la toma de volátiles. Se extrajo de cada fruto un trozo de 1 cm³, con piel; se pesaron los 4 trozos y se colocaron dentro de un vial, sin aplastar, el cual se llenó hasta la tercera parte de su capacidad.
- c) Muestra de hojas: De una muestra de 20 hojas por cultivar, según el momento fenológico, se seleccionaron 6 hojas enteras sin lavar, aplastar y cortar, se pesaron y se colocaron hasta llenar la tercera parte de su capacidad.

El pesado del material se realizó para que la elección y cantidad de material vegetal dentro de los viales fuese homogénea.

Una vez colocado el material dentro del vial, inmediatamente se cerró con una tapa roscada provista de un septo de silicona con una capa de teflón (Supelco ®). Se procesó de a una por vez todas las muestras. Cada vial se ingresó en un baño maría termostatzado a 30 °C, durante un tiempo denominado “de equilibrio” de 30 minutos. La extracción de volátiles se realizó mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME, del inglés Solid Phase Micro Extraction). Se insertó en el septo del vial una fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, marca Supelco) de 2

cm de longitud y 50/30 μm de espesor de fase. Se mantuvo al vial con la fibra insertada, en el baño termostaticado a 30 $^{\circ}\text{C}$, durante un tiempo de 15 minutos, denominado “de extracción”. En ese tiempo la fibra adsorbe los volátiles del espacio cabeza dentro del vial (HS, del inglés headspace). Finalizado el tiempo de extracción de volátiles se retrajo la fibra y se la insertó en el puesto de inyección de un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas, durante 5 minutos (Figura 2.4) (Tateo & Bononi 2010, Díaz Duarte 2018, López et al. 2022).

2.2.4. Análisis químico de volátiles

Los compuestos se analizaron en un cromatógrafo de gases (GC Perkin Elmer Serie Clarus 580), directamente acoplado a un espectrómetro de masas (MS Perkin Elmer Clarus SQ8S); denominado GC-MS. El instrumento pertenece a la Cátedra de Química Orgánica, FCEFyN de la Universidad Nacional de Córdoba–IMBIV-CONICET. Para los análisis, la inyección fue en modo splitless. Los compuestos volátiles fueron separados en una columna capilar DB-5 MS, de 30 metros de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase (marca Agilent). El programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial 50 $^{\circ}\text{C}$, la cual se mantuvo durante 5 minutos. Luego se aumentó a razón de 1 $^{\circ}\text{C}$ por minuto, hasta alcanzar los 70 $^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo a esa temperatura durante 4 minutos. Finalmente se aumentó a razón de 6 $^{\circ}\text{C}$ por minuto, hasta alcanzar los 200 $^{\circ}\text{C}$. El gas transportador fue Helio a una presión de 49.6 psi. La temperatura del inyector y del detector FID se conservó a 250 $^{\circ}\text{C}$ y la línea de transferencia del GC a 200 $^{\circ}\text{C}$. La ionización se realizó en el espectrómetro de masas en alto vacío y por impacto electrónico a 70 eV. Los cromatogramas se obtuvieron en modos “scan”, el cuádruplo de 50 m/z a 300 m/z (scan time: 0.2 s, inter-scan time: 0.1 s) (Díaz Duarte 2018, López et al. 2022).



Figura 2.4. Izquierda: extracción de volátiles mediante SPME. Cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS). GC Perkin Elmer Serie Clarus 580, MS Perkin Elmer Clarus SQ8S.

2.2.5. Identificación general de volátiles

La identificación de los volátiles se realizó por comparación de los espectros de masa con las librerías Adams (2017) y NIST (v. 2009). Se utilizó el software AMDIS (v. 2012), y por correspondencia con espectros de masa de literatura. Se determinó el tiempo de retención de los compuestos volátiles, relativos a una serie normal de alcanos (alcanos de cadena C6-C18). La abundancia de cada compuesto detectado e identificado se cuantificó con el área relativa por pico de cada cromatograma. Valores de abundancia menores al 0,05% se consideraron traza. Se realizó la identificación de los compuestos que en literatura se describen como kairomonas (K) y los que tienen actividad electroantenográfica (EAG+), particularmente para hembras de carpocapsa. En el Cuadro 2.1, se detallan los compuestos de literatura que coinciden con los identificados en membrillo.

Cuadro 2.1: Compuestos con actividad kairomona y electroantenográfica para hembras de carpocapsa, según los antecedentes en la literatura.

Compuesto	Actividad	Referencias
(Z)-3-Hexenol	EAG+	Bengtsson et al. (2001), Ansebo et al. (2004), Casado et al. (2006)
Limoneno	K/EAG+	Witzgall et al. (2005), Casado et al. (2006), Landolt & Guédot (2008)
Acetato de hexilo	EAG+	Casado et al. (2006)
Benzaldehído	EAG+	Casado et al. (2006)
β -Mirceno	EAG+	Casado et al. (2006)
(E)- β -Ocimeno	EAG+	Witzgall et al. (2005)
Acetato de (Z)-3-Hexenol	EAG+	Witzgall et al. (2005), Casado et al. (2006)
Nonanal	EAG+	Witzgall et al. (2005), Casado et al. (2006), El-Sayed et al. (2013)
6-Metil-5-Hepten-2-ona	EAG+	Casado et al. (2006)
Decanal	EAG+	Casado et al. (2006), El-Sayed et al. (2013)
(E,E)- α -Farneseno	K/EAG+	Bengtsson et al. (2001), Bäckman et al. (2001), Ansebo et al. (2004), Witzgall et al. (2005), Landolt & Guédot (2008), El-Sayed et al. (2013)
(Z,E)- α -Farneseno	EAG+	Bengtsson et al. (2001), Bäckman et al. (2001), El-Sayed et al. (2013)
2-Hexenal	EAG+	Casado et al. (2006)
Octanal	EAG+	Casado et al. (2006)
Salicilato de Metilo	EAG+	Bengtsson et al. (2001), Bäckman et al. (2001), Casado et al. (2006), El-Sayed et al. (2013)
β -Pino	EAG+	Casado et al. (2006)
D-Germacreno	EAG+	Bengtsson et al. (2001), Bäckman et al. (2001), Witzgall et al. (2005)
β -Cariofileno	K/EAG+	Bengtsson et al. (2001), Casado et al. (2006), Landolt & Guédot (2008)

K: kairomona. EAG+: compuesto con actividad electroantenográfica. Determinado por GC-MS, Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS), con posterior análisis en Detección Cromatográfica-Electroantenográfica de Gases (GC-EAD).

Se realizó el análisis multivariado de componentes principales para analizar la relación entre grupos químicos de volátiles y los cultivares. Se promediaron las proporciones de cada compuesto entre los órganos analizados en cada cultivar (flores y hojas o frutos y hojas). Se calculó la similitud entre cultivares teniendo en cuenta la distancia “Euclídea”.

Los análisis se realizaron con el programa InfoStat versión 2020p.

2.3. Resultados

A continuación, se detallará por apartado, la caracterización del perfil de compuestos volátiles en cada etapa fenológica planteada. En forma general, se identificaron grupos químicos como Hidrocarburos (alcanos y alquenos: HC), Tioles (TI), Alcoholes (AL), Aldehídos (AH), Cetonas (CT), Ácidos Orgánicos (AC), Ésteres (ES), compuestos con un anillo aromático (AR), Norisoprenoides (N), Monoterpenos (MT) y Sesquiterpenos (SQ). De estos grupos químicos, algunos compuestos no fueron detectados (nd) en las muestras de flores, frutos y hojas de todos los cultivares. Para todas las etapas se logró una identificación entre el 81,14% y 99,97% del área total de los cromatogramas.

2.3.1. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en Etapa de Floración

2.3.1.1. Perfil general de volátiles

En las muestras de flores y hojas de todos los cultivares recolectados en etapa de floración, se observó que la mayor proporción de compuestos volátiles, corresponden al grupo de ésteres y sesquiterpenos. En cada grupo se identificaron diez compuestos diferentes. Se observó que las proporciones de ésteres fueron mayores en hojas y las de sesquiterpenos en las flores de todos los cultivares (Cuadro 2.2). El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 81,14% hasta un 99,95%.

El análisis de componentes principales sobre la base de la relación entre los grupos químicos y los cultivares de membrillo explicó el 93,10% de la variabilidad total (Figura 2.5). En el primer componente del análisis, los alcoholes y sesquiterpenos son mayoritarios en los cultivares Champion e INTA 117. En el segundo componente, los hidrocarburos y ésteres predominaron el cultivar INTA 147 y los monoterpenos en el INTA 37. Los cultivares Champion e INTA 117 son más similares entre sí en relación

con sus grupos químicos. Los cultivares INTA 37 e INTA 117 son los más disímiles entre sí, teniendo en cuenta la composición química.

Cuadro 2.2: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en flor y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de floración. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja
Ésteres	10	1,70	67,22	10,61	98,83	14,89	71,03	25,12	97,10
Sesquiterpenos	10	94,82	8,03	38,73	0,33	73,30	5,47	52,56	0,001
Hidrocarburos	6	0,70	4,57	4,62	0,06	1,12	1,34	9,63	0,004
Tioles	1	1,95	4,06	11,83	0,001	-	-	2,34	-
Alcoholes	2	0,01	6,30	0,85	0,54	1,85	4,33	0,11	2,78
Aromáticos	2	0,37	1,16	4,87	0,04	0,88	0,15	6,12	0,005
Monoterpenos	2	0,03	2,32	5,53	0,05	1,62	0,05	0,77	0,01
Aldehídos	5	-	0,27	1,75	-	0,37	0,04	1,10	0,06
Ácidos orgánicos	1	0,23	-	2,35	-	0,16	-	-	-
%Área total identificada		99,81	93,93	81,14	99,85	94,20	82,41	97,73	99,95

Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

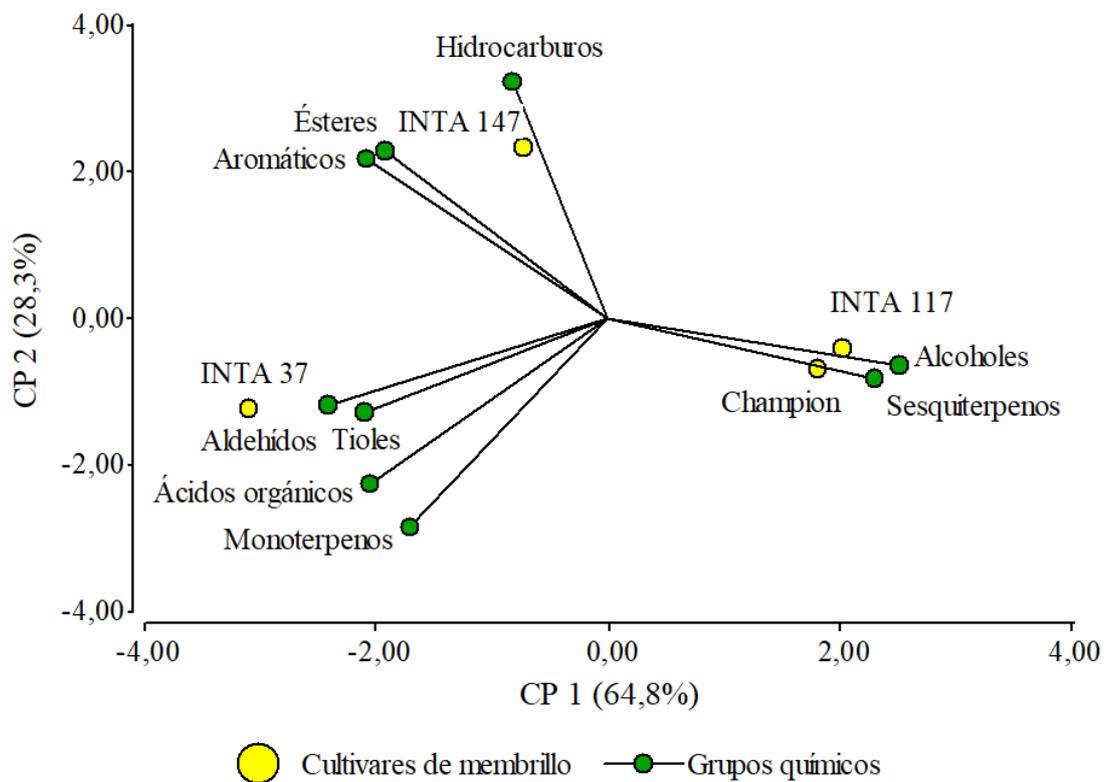


Figura 2.5. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en flores y hojas de cuatro cultivares de *C. oblonga* en floración. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

Se identificaron un total de treinta y nueve compuestos volátiles diferentes (Cuadro 2.3). De los compuestos identificados, veintidós ocurrieron en proporciones menores al 0,05%, las cuales fueron consideradas trazas.

El cultivar con el perfil de volátiles más variado fue Champion, con un total de treinta compuestos químicos diferentes, representando un 99,81% y 93,93% del área total entre flores y hojas respectivamente. El cultivar INTA 147 fue el del perfil de volátiles menos variado en hojas, con veinte compuestos volátiles diferentes, pero con un área mayor al resto con un valor del 99,95% (Cuadro 2.3).

Entre todos los cultivares se observó que la mayor proporción relativa de ésteres corresponden al Acetato de (Z)-3-Hexenol, fue más abundante en hojas en comparación con las flores. Este compuesto fue mayoritario en las hojas de los cultivares INTA 147 (Apéndice Figura 1) e INTA 37, con una proporción del 96,40% y 95,99%, respectivamente. En las flores de todos los cultivares, este compuesto se encontró en proporciones menores en comparación a lo hallado en hojas. De este compuesto, los cultivares Champion e INTA 147 tuvieron valores menores de abundancia relativa con un 0,08% y 0,34% respectivamente (Cuadro 2.3). El Éster Ciclohexilmetil Isobutílico del ácido Sulfuroso, se encontró con mayor proporción en las flores del cultivar INTA 147, con un valor de 24,54%.

Los sesquiterpenos siguieron en mayor proporción entre cultivares, en donde predominó el (E,E)- α -Farneseno en las flores. En flores del cultivar Champion (Apéndice Figura 2), este compuesto presentó una abundancia relativa del 94,05%, siendo mayor en comparación con el resto de los cultivares. Este compuesto también estuvo presente en las hojas de todos los cultivares, pero en menor proporción. El β -Cariofileno estuvo presente mayoritariamente en las hojas del cultivar Champion con un 4,87%. Luego en

las hojas de los cultivares INTA 37 e INTA 117, con 0,33% y 0,11% respectivamente. En el cultivar INTA 147 solo se presentó en las flores, con un 0,86%. El D-Germacreno se presentó solo en las hojas del cultivar Champion, con un 0,86%. En este cultivar se registró un 0,76% de (Z)- β -Farneseno en las flores y un 0,08% de (Z,E)- α -Farneseno en las hojas. Del (Z,E)- α -Farneseno se encontró un 1,18% y un 0,07% respectivamente en flores y hojas del cultivar INTA 117.

Sólo se registraron dos compuestos del grupo de alcoholes, el (Z)-3-Hexenol estuvo presente en todas las muestras más abundante en las hojas. En hojas del cultivar Champion, este compuesto tuvo una abundancia de 6,30%, siendo un valor mayor a lo hallado en los otros cultivares.

Se identificaron dos monoterpenos, de los cuales el (E)- β -Ocimeno fue abundante en las muestras de flores en comparación a las hojas, excepto en el cultivar Champion. Otro monoterpeno encontrado fue el Limoneno, en proporciones de 1,36% en flores del cultivar INTA 37 y de 0,80% en hojas de Champion.

Del grupo de aldehídos, el Benzaldehído fue el mayoritario en flores del cultivar INTA 37, con un 0,87%. Luego se registró un 0,37% en flores del cultivar INTA 117, 0,27% en hojas del cultivar Champion y una cantidad traza en hojas del cultivar INTA 117. El Decanal solo estuvo presente en las flores del cultivar INTA 37 con un 0,30%.

2.3.1.2. Cultivares según su actividad electroantenográfica y de kairomonas

En esta etapa fenológica se han identificado doce compuestos con actividad electroantenográfica (EAG+) para hembras de carpocapsa entre todos los cultivares (Cuadro 2.3). En orden de aparición según los tiempos de retención, se observaron los compuestos: (Z)-3-Hexenol, Benzaldehído, Acetato de (Z)-3-Hexenol, Limoneno, (E)- β -

Ocimeno, (3Z)-Butanoato de hexenilo, Decanal, β -Cariofileno, (Z,E)- α -Farneseno, D-Germacreno, (E,E)- α -Farneseno y (3Z)-Benzoato de hexenilo. De estos compuestos electroantenográficos, los más abundantes fueron el (E,E)- α -Farneseno y el Acetato de (Z)-3-Hexenol en flores y hojas respectivamente.

De los once compuestos con actividad electroantenográfica, se registraron tres kairomonas (K) (Cuadro 2.3). En orden de aparición según los tiempos de retención, se observaron los compuestos: Limoneno, β -Cariofileno y el (E,E)- α -Farneseno. El (E,E)- α -Farneseno fue la kairomona más abundante en las flores de todos los cultivares.

A continuación, se presentan los cultivares en función de la abundancia total de compuestos electroantenográficos y de las kairomonas que registraron.

En primer lugar, el cultivar Champion registró la mayor proporción y variedad de compuestos electroantenográficos tanto en flores como en hojas, con abundancias de 94,17% (cuatro compuestos) y 80,59% (once compuestos) respectivamente. El compuesto más abundante con solo actividad electroantenográfica fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con un 64,36% en hojas. Fue el único cultivar que presentó solo en las hojas, abundancias de D-Germacreno y (3Z)-Benzoato de hexenilo con un 0,58% y un 0,08% respectivamente. También presentó la mayor abundancia del (Z)-3-Hexenol en hojas, con un 6,30% y cantidad traza en flores. El (E)- β -Ocimeno fue mayoritario en hojas con un 1,52%. Respecto a compuestos con actividad electroantenográfica y kairomona, registró cuatro compuestos, con abundancia de 94,06% en flores y de 7,10% en hojas. De estos compuestos, el (E,E)- α -Farneseno fue más predominante con un 94,06% en flores y 1,43% en hojas. También presentó mayor abundancia del β -Cariofileno en hojas, con un 4,87%. La abundancia en hojas del Limoneno fue de 0,80%.

En segundo lugar, el cultivar INTA 117 registró una mayor proporción y frecuencia de compuestos electroantenográficos con abundancia de 82,76% en flores y de 76,03% en hojas, con siete y ocho compuestos respectivamente. El compuesto más abundante con solo actividad electroantenográfica fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con un 66,29% en hojas. Presentó al (Z)-3-Hexenol en hojas, con un 4,33% y con un 0,92% en flores. El (E)- β -Ocimeno fue mayoritario en flores con un 1,62%. Es el único cultivar que registró al Decanal con una abundancia del 0,30% solamente en las hojas. En cuanto a las kairomonas, también registró valores altos, con una abundancia de 72,12% en flores y de 5,29% en hojas, con una frecuencia de dos y tres compuestos respectivamente. La kairomona más predominante en este cultivar fue el (E,E)- α -Farneseno con un 71,25% y el β -Cariofileno con un 0,86% en flores. El Limoneno se presentó solamente en hojas en proporciones traza.

En tercer lugar, el cultivar INTA 147 registró solo tres compuestos electroantenográficos con una abundancia de 52,92% en flores y de 99,17% en hojas. De estos compuestos el más abundante fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con un 96,40% en hojas. Del (Z)-3-Hexenol presentó un 0,10% en flores y un 2,78% en hojas. El (E)- β -Ocimeno solo fue mayoritario en flores con un 0,77%. La única kairomona presente en este cultivar fue el (E,E)- α -Farneseno, con una proporción de 52,48% en flores y valores traza en hojas.

Por último, el cultivar INTA 37 presentó seis compuestos electroantenográficos en flores y cuatro en hojas, con proporciones del 43,27% y del 96,68% respectivamente. El compuesto más abundante con solo actividad electroantenográfica fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con un 95,99% en hojas. La proporción del (Z)-3-Hexenol fue de 0,43% en flores y de 0,54% en hojas. El (E)- β -Ocimeno fue mayoritario en flores con un 4,17%.

Este cultivar fue el que menor proporción de kairomonas obtuvo, con 39,83% en flores y 0,33% en hojas, con solo dos compuestos identificados. La kairomona más predominante en este cultivar fue el (E,E)- α -Farneseno con 38,46% en flores y valores traza en hojas. Además, es el cultivar que mayor proporción de Limoneno obtuvo, con 1,36% en flores.

Cuadro 2.3: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en flor y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de floración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares								
				Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147		
				Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	
1	Etanotiol	TI	1,7	528	1,95	4,06	11,83	0,001	nd	nd	2,34	nd
2	Hexano	HC	1,9	605	0,52	3,33	3,17	0,05	0,99	nd	5,44	nd
3	Ácido etanoico	AC	2,4	667	0,23	nd	2,35	nd	0,16	nd	nd	nd
4	2-propenilideno Ciclobuteno	HC	3,7	759	0,06	0,51	0,51	nd	nd	1,08	0,58	nd
5	(Z)-3-Hexenol (EAG+)	AL	6,2	846	0,01	6,30	0,43	0,54	0,92	4,33	0,10	2,78
6	Hexanol	AL	6,8	862	0,002	nd	0,42	nd	0,92	nd	0,01	nd
7	Estireno	AR	7,8	885	0,03	0,87	0,81	nd	0,07	nd	0,06	nd
8	Éster tridec-2-inílico del ácido 4-etilbenzoico	ES	8,7	904	0,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	(E,E)-2,4-hexadienal	AH	8,8	905	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,06
10	Benzaldehído (EAG+)	AH	12,1	943	nd	0,27	0,87	nd	0,37	0,04	nd	nd
11	Acetato de (Z)-3-Hexenol (EAG+)	ES	15,8	985	0,08	64,36	1,84	95,99	8,17	66,29	0,34	96,40
12	Limoneno (K/ EAG+)	MT	17,7	1013	nd	0,80	1,36	nd	nd	0,04	nd	nd
13	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,7	1030	0,03	1,52	4,17	0,05	1,62	0,01	0,77	0,01
14	(3Z)- Butanoato de hexenilo (EAG+)	ES	33,8	1191	nd	0,29	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	Dodecano	HC	34,6	1201	nd	0,20	0,24	nd	nd	0,02	0,12	nd
16	Decanal (EAG+)	AH	34,8	1202	nd	nd	0,30	nd	nd	nd	nd	nd
17	(3Z)- 3-metil Butanoato de hexenilo	ES	35,9	1234	nd	0,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	(3Z)-Valerato de hexenilo	ES	36,2	1240	nd	0,31	nd	nd	nd	0,69	nd	0,001
19	(2E)-Decenal	AH	37,1	1260	nd	nd	0,31	nd	nd	nd	0,47	nd
20	Tridecano	HC	38,5	1304	0,05	0,14	0,36	nd	0,05	0,16	1,31	0,001
21	(2E)-Undecenal	AH	40,4	1357	nd	nd	0,26	nd	nd	nd	0,63	nd
22	α-Copaeno	SQ	40,6	1371	nd	0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Cuadro 2.3. continuación

23	β -Bourboneno	SQ	40,8	1387	nd	0,16	nd	nd	nd	0,03	0,08	nd
24	β -Cubebeno	SQ	40,9	1387	nd	0,18	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25	Tetradecano	HC	41,3	1401	0,07	0,27	0,34	0,004	0,07	0,08	2,18	0,003
26	Acetato de decilo	ES	41,5	1409	nd	nd	0,46	nd	nd	nd	0,14	nd
27	β-Cariofileno (K/ EAG+)	SQ	41,7	1418	nd	4,87	nd	0,33	0,86	0,11	nd	nd
28	(Z)- β -Farneseno	SQ	41,7	1419	0,76	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
29	(E)- α - Bergamoteno	SQ	42,1	1434	nd	nd	0,26	nd	nd	nd	nd	nd
30	(Z,E)- α -Farneseno (EAG+)	SQ	42,1	1434	nd	0,08	nd	nd	1,18	0,07	nd	nd
31	α -cariofileno	SQ	42,6	1456	nd	0,57	nd	nd	nd	0,11	nd	nd
32	(E)-2-hexenil (E)-2-hexenoato	ES	43,1	1468	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,10	nd
33	D-Germacreno (EAG+)	SQ	43,3	1482	nd	0,58	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	2-(2-Etilhexil) Tiofeno	AR	43,4	1490	0,34	0,29	4,07	0,04	0,82	0,15	6,06	0,005
35	(E,E)-α-Farneseno (K/ EAG+)	SQ	43,8	1504	94,06	1,43	38,46	0,002	71,26	5,14	52,48	0,001
36	(3Z)-Benzoato de hexenilo (EAG+)	ES	45,2	1565	nd	0,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
37	Hexadecano	HC	45,8	1602	nd	0,13	nd	nd	nd	nd	nd	nd
38	Acetato de dodecilo	ES	45,9	1609	nd	nd	0,71	nd	1,60	nd	nd	nd
39	Éster ciclohexilmetil isobutílico del ácido sulfuroso	ES	47,6	1697	1,50	2,01	7,60	2,84	5,12	4,05	24,54	0,71
Área total identificada					99,81	93,93	81,14	99,85	94,20	82,41	97,73	99,95
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja
Frecuencia de Kairomonas (K)					1	3	2	2	2	3	1	1
Proporción de Kairomonas					94,06	7,10	39,83	0,33	72,12	5,29	52,48	0,001
Frecuencia de compuestos EAG+					4	11	7	5	7	8	4	4
Proporción de compuestos EAG+					94,18	80,59	47,44	96,91	84,38	76,04	53,69	99,18

Grupos químicos. TI: Tiol, HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantagráfica en hembras de carpocapsa.

2.3.2. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de poscujaje a fruto inmaduro

2.3.2.1. Perfil general de volátiles

En muestras de frutos y hojas de todos los cultivares recolectados en etapa de poscujaje a fruto inmaduro, se observó que la mayor proporción de compuestos volátiles correspondía al grupo de ésteres, alcoholes y monoterpenos. Se identificaron cuatro compuestos diferentes en el grupo de ésteres y alcoholes, mientras que en el grupo de monoterpenos se identificaron seis compuestos diferentes. Se observó que las proporciones de ésteres fueron mayores en hojas y las de alcoholes y monoterpenos en los frutos de todos los cultivares (Cuadro 2.4). El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 97,10% hasta un 99,98%.

Cuadro 2.4: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de poscujaje-fruto inmaduro. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
Ésteres	4	6,27	96,24	18,07	91,70	42,14	97,16	42,32	97,33
Alcoholes	4	38,44	0,59	65,35	0,79	37,61	2,74	43,41	1,30
Monoterpenos	6	51,07	0,06	10,44	0,02	11,94	0,01	10,19	0,05
Hidrocarburos	3	0,03	2,39	0,07	7,39	1,33	0,08	0,76	0,62
Aromáticos	4	2,63	-	2,95	0,03	0,38	-	0,79	-
Sesquiterpenos	1	0,05	-	0,04	-	4,77	-	0,13	-
Aldehídos	3	0,17	-	0,18	-	0,01	-	1,98	-
%Área total identificada		98,66	99,29	97,10	99,93	98,17	99,98	99,58	99,30

Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

El análisis de componentes principales sobre la base de la relación entre los grupos químicos y los cultivares de membrillo explicó el 80% de la variabilidad total (Figura 2.6). En el primer componente del análisis, los ésteres y sesquiterpenos son mayoritarios en los cultivares INTA 117 e INTA 147. En el segundo componente, los alcoholes e

hidrocarburos predominaron en el cultivar INTA 37 y los monoterpenos en el cultivar Champion. Los cultivares INTA 117 e INTA 147 son más similares entre sí en relación con sus grupos químicos. Los cultivares Champion e INTA 117 son los más disímiles entre sí, teniendo en cuenta la composición por grupos químicos.

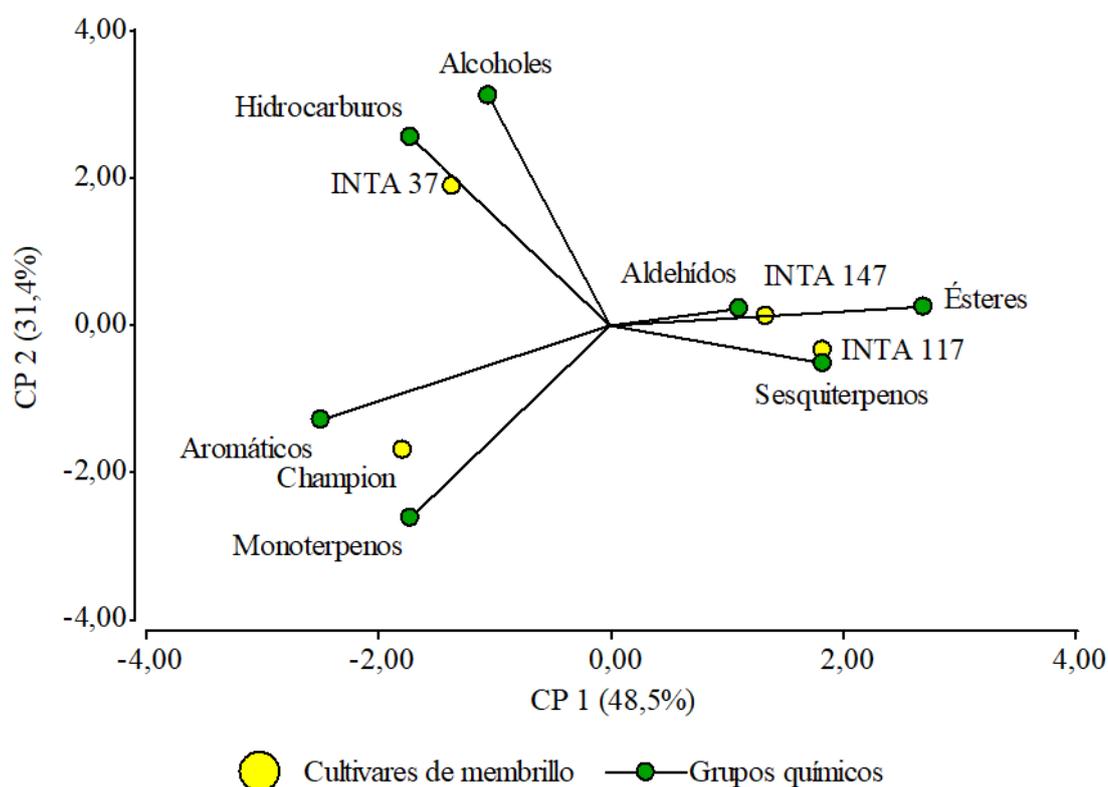


Figura 2.6. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas y frutos de cuatro cultivares de *C. oblonga* en poscujaje a fruto inmaduro. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

Entre las muestras de frutos y hojas de todos los cultivares recolectados en etapa de poscujaje a fruto inmaduro se identificaron un total de veintiséis compuestos volátiles (Cuadro 2.5). De los compuestos identificados, quince ocurrieron en cantidades consideradas trazas (menores al 0,05%).

El cultivar con el perfil de volátiles más variado fue INTA 37, con un total de veinte compuestos químicos diferentes entre hojas y frutos. El cultivar INTA 147 fue el del perfil

de volátiles menos variado, con dieciséis compuestos diferentes. El perfil de volátiles identificados en hojas de todos los cultivares, fue muy bajo con cinco a ocho compuestos.

Entre todos los cultivares se observó que la mayor proporción relativa de ésteres corresponden al Acetato de (Z)-3-Hexenol, que fue más abundante en hojas en comparación con los frutos. Este compuesto fue mayoritario en las hojas de los cultivares INTA 147 (Apéndice Figura 3) e INTA 117, con una proporción del 97,24% y 97,13%, respectivamente. En los frutos de todos los cultivares se halló en proporciones de 5,98% al 40,68%, siendo mayor la abundancia en cultivares INTA que en el cultivar Champion.

Del grupo de alcoholes se identificaron cuatro compuestos, de los cuales el (Z)-3-Hexenol estuvo presente en todas las muestras, pero fue más abundante en los frutos. En frutos del cultivar INTA 37, este compuesto tuvo una abundancia de 34,93% (Apéndice Figura 4), siendo un valor mayor a lo hallado en los otros cultivares. El 1-Hexanol fue abundante solo en frutos de todos los cultivares, siendo mayor la proporción hallada en el cultivar INTA 37, con un valor de 30,42%.

De seis monoterpenos identificados el (E)- β -Ocimeno fue el más abundante, pero solo estuvo presente en los frutos de todos los cultivares, con una mayor proporción en el cultivar Champion de 48,58%. El δ -3-Careno solo se presentó en frutos, siendo mayoritario en el cultivar Champion con 1,83%. En este cultivar se presentó solo en frutos el Pironeno con una abundancia de 0,56%. El Limoneno se presentó en proporciones menores, pero fue un poco mayor la abundancia en frutos que en hojas. La mayor proporción se registró en los frutos del cultivar INTA 147. El β -Mirceno solo se presentó en el cultivar INTA 117 con un 0,31% de abundancia en frutos. El cultivar INTA 37 fue el único en registrar al Alo-Ocimeno en frutos, con una proporción de 0,09%.

El único sesquiterpeno que se identificó fue el (Z,E)- α -Farneseno, y solo se presentó en frutos, siendo mayoritario en el cultivar INTA 117 con un 4,77%.

De tres aldehídos, el Benzaldehído estuvo presente solo en frutos de todos los cultivares. Se registró en un 0,11% en INTA 37, en un 0,10% en Champion y en cantidades traza en INTA 117 e INTA 147. El Hexanal solo se presentó en los frutos de INTA 147 con un 1,95%. El Nonanal se presentó en frutos de los cultivares Champion e INTA 37 con proporciones de 0,07% y 0,08% respectivamente.

2.3.2.2. Cultivares según su actividad electroantenográfica y de kairomonas

En esta etapa fenológica se registraron nueve compuestos con actividad electroantenográfica (EAG+) para hembras de carpocapsa entre todos los cultivares (Cuadro 2.5). En orden de aparición según los tiempos de retención, se observaron los compuestos: (Z)-3-Hexenol, Benzaldehído, β -Mirceno, Acetato de (Z)-3-Hexenol, Acetato de Hexilo, Limoneno, (E)- β -Ocimeno, Nonanal y el (Z,E)- α -Farneseno. De estos compuestos electroantenográficos, en todos los cultivares, el más abundante fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol en frutos y hojas y el (Z)-3-Hexenol en frutos.

De los ocho compuestos con actividad electroantenográfica, solo se registró una sola kairomona (K), el Limoneno y ocurrió en proporciones entre el 0,02% y 0,23% en todos los cultivares (Cuadro 2.5).

A continuación, se presentan los cultivares en función de la abundancia total de compuestos electroantenográficos y de las kairomonas que registraron.

En primer lugar, el cultivar INTA 147 registró seis compuestos electroantenográficos en frutos con abundancias de 66,89% y tres compuestos en hojas, con un 98,60%. El compuesto más abundante con solo actividad electroantenográfica fue el Acetato de (Z)-

3-Hexenol, con 40,68 en frutos y 97,24% en hojas. Luego, con una proporción de 24,39% se observó al (Z)-3-Hexenol en frutos. El (E)- β -Ocimeno solo se presentó en frutos con un 9,65%. El único compuesto con actividad electroantenográfica y kairomona registrado fue el Limoneno, con una proporción de 0,23% y 0,05% en frutos y hojas respectivamente.

En segundo lugar, el cultivar Champion presentó compuestos electroantenográficos con proporciones de 23,74% en los frutos y de 96,33% en hojas. Las proporciones corresponden con siete compuestos identificados en frutos y tres en hojas. De estos compuestos, el más abundante fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con 5,98% en frutos y 95,99% en hojas. Luego siguió el (Z)-3-Hexenol, con un 17,23% en frutos. Este cultivar presentó la mayor proporción de (E)- β -Ocimeno, el cual tuvo un valor de 48,58% en frutos. La kairomona encontrada en este cultivar fue el Limoneno con 0,10% en frutos y 0,06% en hojas.

En tercer lugar, el cultivar INTA 37 registró compuestos electroantenográficos con proporciones de 53,06% en frutos y 92,18% en hojas. Las proporciones corresponden a siete compuestos en los frutos y tres en las hojas. El compuesto electroantenográfico más abundante fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con un 17,05% en frutos y 91,39% en hojas. Luego siguió el (Z)-3-Hexenol, con un 34,93% en frutos. El (E)- β -Ocimeno se presentó en una proporción de 9,81% en frutos. La única kairomona presente en este cultivar fue el Limoneno, con una proporción de 0,12% en frutos y cantidad traza en hojas.

Por último, el cultivar INTA 117 presentó compuestos electroantenográficos con abundancia de 60,97% en frutos y de 99,86% en hojas, con seis y dos compuestos respectivamente. El compuesto electroantenográfico más abundante fue el Acetato de (Z)-3-Hexenol, con un 40,61% en frutos y 97,13% en hojas. Luego siguió el (Z)-3-

Hexenol, con un 18,58% en frutos. El (E)- β -Ocimeno se presentó en un 11,28% en frutos.

Solo en este cultivar se registró el β -Mirceno con un 0,31% en frutos. La kairomona

encontrada solo en frutos fue el Limoneno, con una proporción de 0,05%.

Cuadro 2.5: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de poscujaje-fruto inmaduro. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

	Compuesto		Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares							
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
1	Hexano	HC	2,0	611	nd	2,39	nd	7,39	1,33	0,08	0,76	0,62
2	3-Metil Furano	AR	2,1	642	2,41	nd	2,79	nd	nd	nd	nd	nd
3	1-Pentanol	AL	3,2	742	1,18	nd	nd	nd	0,39	nd	nd	nd
4	(Z)-2-Penten-1-ol	AL	3,8	770	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,04	nd
5	Tolueno	AR	3,8	794	nd	nd	nd	0,02	0,03	nd	nd	nd
6	Hexanal	AH	4,4	806	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,95	nd
7	(Z)-3-Hexen-1-ol (EAG+)	AL	6,2	847	17,23	0,59	34,93	0,79	18,58	2,74	24,39	1,30
8	1-Hexanol	AL	6,8	861	20,03	nd	30,42	nd	18,63	nd	18,98	nd
9	Benzaldehído (EAG+)	AH	12,1	952	0,10	nd	0,11	nd	0,01	nd	0,03	nd
10	β-mirceno (EAG+)	MT	14,4	969	nd	nd	nd	nd	0,31	nd	nd	nd
11	Acetato de (Z)-3-Hexen-1-ol (EAG+)	ES	15,8	985	5,98	95,87	17,05	91,39	40,61	97,13	40,68	97,24
12	Acetato de Hexilo (EAG+)	ES	16,5	990	0,22	nd	0,74	nd	1,42	nd	1,44	nd
13	(-)-Limoneno (K/EAG+)	MT	17,7	1018	0,10	0,06	0,12	0,02	0,05	nd	0,23	0,05
14	δ-3-Careno	MT	18,7	1018	1,83	nd	0,297	nd	0,25	nd	0,25	nd
15	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,6	1029	48,58	nd	9,81	nd	11,28	nd	9,65	nd
16	Nonanal (EAG+)	AH	25,9	1100	0,07	nd	0,08	nd	nd	nd	nd	nd
17	α-Pironeno	MT	28,8	1133	0,56	nd	0,13	nd	0,05	nd	0,06	nd
18	alo-Ocimeno	MT	30,2	1117	nd	nd	0,09	nd	nd	nd	nd	nd
19	3,5,5-Trimetil-Ciclohexeno	AR	32,4	1182	0,16	nd	nd	nd	0,29	nd	0,67	nd
20	Éster Butílico del ácido (Z)-3-Hexenoico	ES	32,5	1184	nd	nd	nd	0,09	nd	nd	nd	nd
21	Tridecano	HC	38,498	1301	nd	nd	0,026	nd	nd	nd	nd	nd

Cuadro 2.5. *continuación.*

22	Tetradecano	HC	41,3	1400	0,032	nd	0,041	nd	nd	nd	nd	nd
23	(Z,E)-α-Farneseno (EAG+)	SQ	42,1	1432	0,05	nd	0,03	nd	nd	nd	0,13	nd
24	(E)- α -Bergamoteno	SQ	42,1	1433	nd	nd	nd	nd	4,77	nd	nd	nd
25	2-(2-Etilhexil) Tiofeno	AR	43,4	1489	0,06	nd	0,15	0,01	0,05	nd	0,11	nd
26	Éster Ciclohexilmetil Isobutílico del ácido Sulfuroso	ES	47,6	1694	0,07	0,37	0,28	0,22	0,12	0,03	0,21	0,08
Área relativa total					98,66	99,29	97,10	99,93	98,17	99,97	99,58	99,30
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
Frecuencia de Kairomonas (K)					1	1	1	1	1	0	1	1
Proporción de Kairomonas					0,10	0,06	0,12	0,02	0,05	0,00	0,23	0,05
Frecuencia de compuestos EAG+					8	3	8	3	6	2	6	3
Proporción de compuestos EAG+					72,33	96,53	62,87	92,20	72,26	99,86	76,54	98,60

Grupos químicos. HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantenográfica en hembras de carpocapsa.

2.3.3. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de fruto en crecimiento

2.3.3.1. Perfil general de volátiles

En las muestras de frutos y hojas de todos los cultivares recolectadas en etapa de crecimiento, se observó que estaban compuestas principalmente de alcoholes, monoterpenos, ésteres y aldehídos. En cada grupo se identificaron diferentes cantidades de compuestos, incluyendo ocho alcoholes, trece monoterpenos, diecinueve ésteres y once aldehídos. Se observó que en todos los cultivares INTA, las proporciones de alcoholes fueron mayores en los frutos y las de monoterpenos en las hojas (Cuadro 2.6). En esta etapa se identificaron compuestos volátiles pertenecientes a los Norisoprenoides y Cetonas. El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 91,31% hasta un 98,53%.

Cuadro 2.6: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
Alcoholes	8	68,81	8,99	47,62	1,07	67,71	0,85	86,08	0,99
Monoterpenos	13	0,79	0,63	3,57	59,71	0,54	61,19	0,35	70,83
Ésteres	19	3,55	41,61	19,34	0,49	17,34	0,31	1,58	0,80
Aldehídos	11	11,60	38,93	7,21	0,52	3,57	0,60	5,69	0,23
Hidrocarburos	13	1,43	0,38	0,66	20,01	0,83	22,73	0,61	18,20
Aromáticos	6	0,12	0,32	0,07	14,22	0,80	12,32	0,05	7,04
Norisoprenoides	2	2,81	-	17,36	-	1,09	-	0,11	-
Sesquiterpenos	3	0,79	0,35	0,02	0,01	3,49	0,01	0,91	0,05
Tioles	1	1,44	0,11	0,10	-	0,40	-	-	-
Cetonas	1	-	-	-	0,44	-	0,44	-	0,35
Ácidos	1	-	-	-	0,07	-	0,09	-	0,04
%Área total identificada		91,36	91,31	96,79	96,59	95,76	98,53	94,55	98,48

Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

El análisis de componentes principales sobre la base de la relación entre los grupos químicos y los cultivares de membrillo explicó el 85,90% de la variabilidad total (Figura 2.7). En el primer componente del análisis, los aldehídos, cetonas y monoterpenos son mayoritarios en los cultivares INTA 37 e INTA 117, y los ésteres en el cultivar Champion. En el segundo componente, los alcoholes predominaron el cultivar INTA 147 y los hidrocarburos en el cultivar Champion. Los cultivares INTA 37 e INTA 117 son más similares entre sí en relación con sus grupos químicos. Los cultivares Champion vs. INTA son los más disímiles entre sí, teniendo en cuenta la composición química.

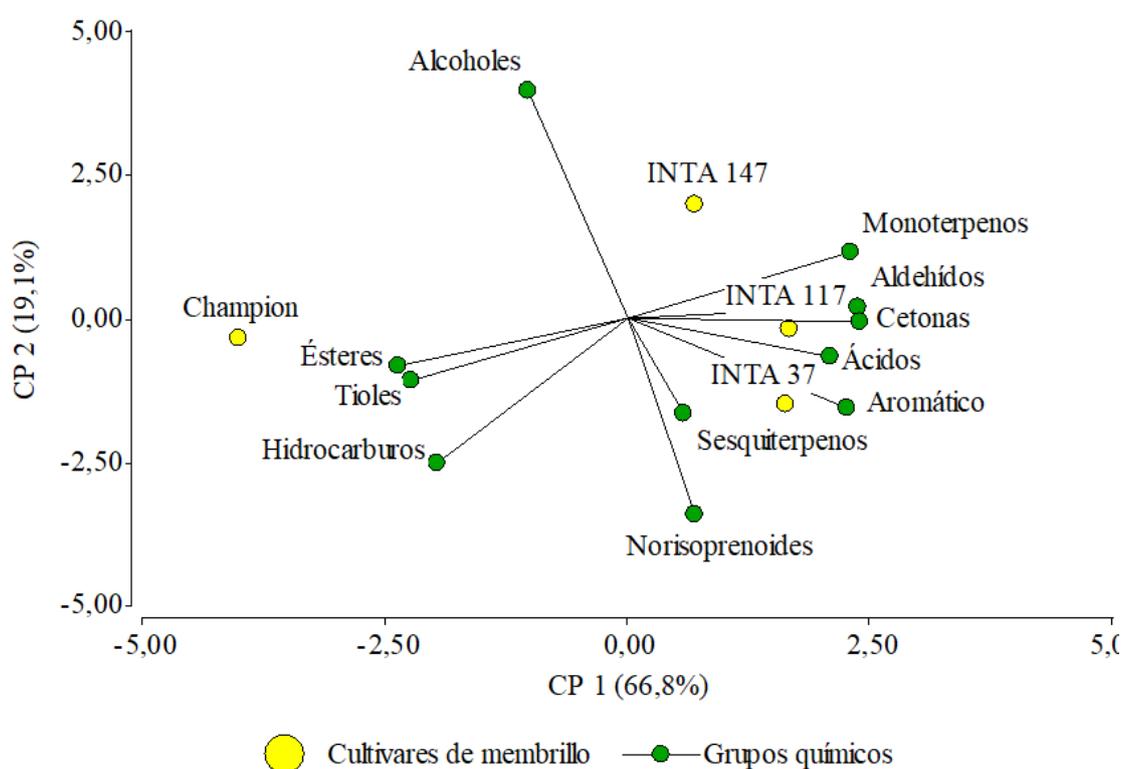


Figura 2.7. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas y frutos de cuatro cultivares de *C. oblonga* en crecimiento. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

Entre las muestras de frutos y hojas de todos los cultivares recolectados en etapa de crecimiento se identificaron un total de setenta y ocho compuestos volátiles diferentes (Cuadro 2.7). De los compuestos identificados, dieciséis ocurrieron en cantidades consideradas trazas (menores al 0,05%).

El cultivar con el perfil de volátiles más variado fue INTA 117, con un total de sesenta compuestos químicos diferentes, representando un 95,76% y 98,53% del área total entre frutos y hojas respectivamente. El cultivar Champion fue el del perfil de volátiles menos variado, con cuarenta y tres compuestos volátiles diferentes con un área de 91,36% y 91,31% entre frutos y hojas respectivamente.

En todos los cultivares, de los ocho alcoholes identificados, se observó que la mayor proporción se registró en los frutos. Una gran proporción corresponde al Hexanol, el cual fue más abundante en frutos en comparación con las hojas. Este compuesto fue mayoritario en los frutos del cultivar INTA 147 (Apéndice Figura 5), con una proporción del 66,68%. En las hojas de todos los cultivares, este compuesto se encontró en proporciones menores en comparación a lo hallado en frutos, con valores de 0,45% a 1,52%. Luego el (Z)-3-Hexenol se registró en una mayor proporción en los frutos del cultivar INTA 147, con un 19,40%.

Se identificaron trece monoterpenos diferentes en todos los cultivares INTA, de los cuales cuatro aparecieron en el cultivar Champion. De este grupo, once monoterpenos aparecieron solo en las hojas de todos los cultivares, y de ellos, nueve en las hojas de los cultivares INTA. El Limoneno fue mayoritario en las hojas de los cultivares INTA, siendo abundante en el INTA 147 (Apéndice Figura 6), con un valor de 40,18%. El β -Mirceno tuvo una abundancia del 7,41% en las hojas del cultivar INTA 147, siguiendo el o-Cimeno con 6,41% en hojas del INTA 37. La Isomentona apareció con un 5,55% en hojas del cultivar INTA 147. El β -Pinenol fue mayoritario en las hojas del cultivar INTA 117 con un 3,21%. El γ -Terpineno y el α -Terpineno fueron mayoritarios en hojas del INTA 147 con un 3,15% y un 1,77% respectivamente. El α -Pinenol estuvo presente con un 1,99% en hojas de INTA 37. El (E)- β -Ocimeno fue mayoritario en los frutos del INTA 37 con un

3,41%. El Limoneno junto al (E)- β -Ocimeno aparecieron tanto en frutos como en hojas de todos los cultivares.

Se identificaron diecinueve ésteres diferentes, la mayoría aparecieron solo en los frutos. En el cultivar Champion se identificaron catorce ésteres entre frutos y hojas, de los cuales el Acetato de (Z)-3-Hexenol fue mayoritario en las hojas con un 36,89% y se encontró en bajas proporciones en hojas de los cultivares INTA. El Acetato de hexilo fue mayoritario en frutos del cultivar Champion con un 0,81%. El Hexanoato de etilo registró un 0,80% en frutos del INTA 37. El Tiglato de etilo estuvo presente solo en frutos de todos los cultivares, siendo mayoritario en el INTA 37, con 0,66%.

Del grupo de aldehídos se identificaron once compuestos diferentes entre todos los cultivares. La proporción de aldehídos fue mayor en hojas en comparación a los frutos. Los cultivares INTA registraron mayor número de aldehídos diferentes. El Benzaldehído solo estuvo presente en las hojas y en el cultivar INTA 117 fue mayoritario registrando un 10,48%. El 2-Hexenal fue mayoritario en hojas de los cultivares INTA 147 e INTA 117 con un 6,45% y 6,46% respectivamente. El Hexanal fue abundante en hojas del cultivar INTA 117, con 3,90%. El Octanal y Nonanal estuvieron presentes en mayor proporción en las hojas del cultivar INTA 147 con un 0,93% y 0,82% respectivamente. El Heptanal fue mayoritario en hojas del cultivar INTA 117 con un 0,51%. El Decanal apareció con un 0,22% en frutos del cultivar Champion.

De los sesquiterpenos identificados, el (Z)- β -Farneseno solo estuvo presente en frutos del cultivar INTA 147. El (E,E)- α -Farneseno estuvo presente en todos los cultivares, siendo mayoritario en los frutos en comparación a las hojas. En frutos del cultivar INTA 117 fue más abundante, con una proporción de 3,35%.

Del grupo de norisoprenoides, se presentó el Teaspirano en sus dos posibles isómeros, Z o E. Solo se presentaron en frutos, siendo más abundante en el cultivar INTA 37, con un 8,92%.

En esta etapa apareció la cetona 6-Metil-5-Hepten-2-ona y solo se detectó en hojas de los cultivares INTA, con proporciones entre 0,35% y 0,44%.

2.3.3.1. Cultivares según su actividad electroantenográfica y de kairomonas

En esta etapa fenológica se han registrado quince compuestos con actividad electroantenográfica (EAG+) para hembras de carpocapsa entre todos los cultivares (Cuadro 2.7). En orden de aparición según los tiempos de retención, se observaron los compuestos: (Z)-3-Hexenol, 2-Hexenal, Benzaldehído, β -Pino, 6-Metil-5-Hepten-2-ona, β -Mirceno, Acetato de (Z)-3-Hexenol, Octanal, Acetato de Hexilo, Limoneno, (E)- β -Ocimeno, Nonanal, Salicilato de Metilo, Decanal y el (E,E)- α -Farneseno.

Los compuestos 2-Hexenal, 6-Metil-5-Hepten-2-ona, Octanal y Nonanal solo se presentaron en las hojas de los cultivares INTA.

De los catorce compuestos con actividad electroantenográfica, se registraron dos kairomonas (K), en orden de aparición según los tiempos de retención, el Limoneno y el (E,E)- α -Farneseno (Cuadro 2.7).

A continuación, se presentan los cultivares en función de la abundancia total de compuestos electroantenográficos y de las kairomonas que registraron.

En primer lugar, el cultivar INTA 147 presentó compuestos electroantenográficos con una proporción del 23,54% en frutos (seis compuestos) y 67,04% en las hojas (doce compuestos). El Limoneno fue el compuesto con actividad electroantenográfica y kairomona más abundante, con un 40,18% en hojas y 0,26% en los frutos. El (Z)-3-

Hexenol se presentó con un 19,40% en frutos y 0,17% en hojas. El Acetato de (Z)-3-Hexenol registró un 3,18% en frutos y un 0,04% en hojas. El Acetato de Hexilo solo se presentó en los frutos con un 0,59%. Solamente en las hojas se registró un 7,06% de Benzaldehído, 7,41% de β -Mirceno, 6,45% de 2-Hexenal, 2,63% de β -Pinoeno, 0,94% de Octanal, 0,35% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona, 0,82% de Nonanal y un 0,07% de Decanal. El (E)- β -Ocimeno fue mayoritario con un 0,90% en hojas. El (E,E)- α -Farneseno, se presentó en cantidades traza en frutos y en hojas.

En segundo lugar, la proporción de compuestos electroantagráficos en el cultivar INTA 117 fue de 10,74% en frutos y de 66,98% en hojas, con cinco y doce compuestos respectivamente. El Limoneno fue el compuesto con actividad electroantagráfica y kairomona más abundante en hojas, con un 38,86%. Del (Z)-3-Hexenol se registró un 6,38% en frutos y 0,15% en hojas. El Acetato de (Z)-3-Hexenol registró un 0,41% en frutos y un 0,25% en hojas. Solo en los frutos presentó un 0,12% de Acetato de Hexilo. En hojas registró un 10,48% de Benzaldehído, 6,46% de 2-Hexenal, 6% de β -Mirceno, 3,21% de β -Pinoeno, 0,72% de Octanal, 0,44% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona, 0,36% de Nonanal y cantidad traza de Decanal. El (E)- β -Ocimeno fue mayoritario en hojas con un 0,44%. Este cultivar fue el que presentó la mayor proporción de la kairomona (E,E)- α -Farneseno, con un 3,35% en frutos y traza en hojas.

En tercer lugar, el cultivar INTA 37 registró una proporción de compuestos electroantagráficos en frutos y en hojas de 16,15% (seis compuestos) y 67,42% (doce compuestos) respectivamente. De estos compuestos, el más abundante y con actividad kairomona fue el Limoneno con un 34,16% en hojas y un 0,15% en frutos. Luego se registró con solo actividad electroantagráfica al (Z)-3-Hexenol con 8,21% en los frutos y 0,18% en hojas. Solo en los frutos presentó un 0,63% de Acetato de Hexilo. En hojas

se registró un 5,49% de β -Mirceno, 10,33% de Benzaldehído, 4,20% de 2-Hexenal, 3,16% de β -Pinoeno, 0,84% de Octanal, 0,40% de Nonanal, 0,44% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona y cantidades traza de Decanal. El Acetato de (Z)-3-Hexenol presentó un 3,14% en frutos y 0,31% en hojas. el (E)- β -Ocimeno fue mayoritario en frutos con un 3,41%. La kairomona (E,E)- α -Farneseno obtuvo valores de abundancia de 0,59% en frutos.

Por último, la proporción de volátiles con actividad electroantagráfica en el cultivar Champion fue de 16,86% en frutos (siete compuestos) y un 44,98% en hojas (siete compuestos). El Acetato de (Z)-3-Hexenol fue el compuesto electroantagráfico más abundante, con un 36,89% en hojas y 2,98% en frutos. El (Z)-3-Hexenol presentó una proporción del 11,36% en frutos y 7,21% en hojas. La kairomona más predominante en este cultivar fue el (E,E)- α -Farneseno con 0,79% en frutos y 0,34% en hojas. Luego siguió el Limoneno con 0,37% en frutos y de 0,30% en hojas. Este cultivar presentó mayor proporción de Acetato de Hexilo solo en los frutos, con un 0,81%. El (E)- β -Ocimeno se presentó mayoritariamente en frutos con un 0,42%. Es el único cultivar que presentó en frutos un 0,33% de Salicilato de Metilo. Solo estuvieron presentes en las hojas el β -Mirceno con 0,12%, el Benzaldehído con 0,09% y cantidad traza de β -Pinoeno.

Cuadro 2.7: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

	Compuesto	TI	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares							
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
1	Etanotiol	TI	1,7	528	1,44	0,11	0,10	nd	0,40	nd	0,10	nd
2	Hexano	HC	1,9	601	1,53	40,27	19,18	nd	16,35	nd	19,18	nd
3	Benceno	AR	2,3	660	nd	nd	nd	nd	0,62	nd	nd	nd
4	2-Metil-2-Butenal	AH	3,2	742	0,26	nd	0,17	nd	0,26	nd	0,17	nd
5	Tolueno	AR	3,6	756	0,12	0,32	0,07	9,36	0,18	7,95	0,07	9,36
6	3-Metil-2-Butenal	AH	4,2	791	nd	nd	nd	0,19	nd	0,19	nd	0,19
7	Hexanal	AH	4,3	795	0,69	0,29	0,49	3,49	0,56	3,91	0,49	3,49
8	(Z)-3-Hexenol (EAG+)	AL	6,1	840	11,36	7,21	8,21	0,18	6,38	0,15	8,21	0,18
9	2-Hexenal (EAG+)	AH	6,4	851	nd	nd	nd	4,20	nd	6,46	nd	4,20
10	Hexanol	AL	6,8	860	56,80	1,52	37,29	0,57	56,87	0,51	37,29	0,57
11	m-Xileno	AR	7,1	869	nd	nd	nd	3,35	nd	3,10	nd	3,35
12	Éster 2-Metilpropílico del ácido 2-Propenoico	ES	8,0	890	nd	0,26	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	p-Xileno	AR	8,2	898	nd	nd	nd	1,09	nd	0,98	nd	1,09
14	Heptanal	AH	8,7	904	nd	nd	nd	0,47	nd	0,51	nd	0,47
15	(E,E)-2,4-Hexadienal	AH	9,1	909	nd	nd	nd	0,08	nd	0,05	nd	0,08
16	Anisol	AR	9,5	914	nd	nd	nd	0,28	nd	0,23	nd	0,28
17	Cumeno	AR	10,0	919	nd	nd	nd	0,15	nd	0,06	nd	0,15
18	α -Tujeno	MT	10,3	920	nd	nd	nd	0,80	nd	0,66	nd	0,80
19	Tiglato De Etilo	ES	10,5	921	0,26	nd	0,66	nd	0,19	nd	0,66	nd
20	α -Pineno	MT	10,7	927	nd	nd	nd	1,99	nd	1,63	nd	1,99
21	Canfeno	MT	11,6	938	nd	nd	nd	0,54	nd	0,39	nd	0,54

Cuadro 2.7. continuación

49	Butanoato de (Z)-4-Hexen-1-ilo	ES	33,7	1176	nd	0,10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
50	(Z)-4-Octenoato de Etilo	ES	33,9	1190	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,08	nd
51	1-Dodeceno	HC	34,1	1193	nd	0,14	nd	nd	nd	nd	nd	nd
52	Octanoato de Etilo	ES	34,4	1197	nd	nd	0,10	nd	nd	nd	nd	nd
53	5-Etil-5-Metil-Decano	HC	34,6	1198	nd	0,17	0,01	nd	0,17	nd	0,07	nd
54	Decanal (EAG+)	AH	34,7	1200	0,22	nd	nd	0,01	nd	0,04	nd	0,07
55	Pulegona	MT	36,5	1248	nd	nd	nd	0,16	nd	0,03	nd	0,48
56	Teaspirano Z o E	N	38,2	1298	2,30	nd	8,92	nd	0,41	nd	0,01	nd
57	Tridecano	HC	38,4	1300	0,18	0,07	0,04	nd	0,05	nd	0,03	nd
58	Teaspirano Z o E	N	38,7	1308	0,51	nd	8,44	nd	0,68	nd	0,10	nd
59	Éster Isobutílico del ácido 2,2,4-Trimetil-3-Isopropilcarboxipentanoico	ES	39,7	1331	0,12	nd						
60	4,8-Dimetil-3,7-Nonadien-2-ol	AL	40,0	1349	nd	nd	0,21	nd	0,31	nd	nd	nd
61	Éster del ácido 2,2-Dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil) Propil 2-Metil-Propanoico	ES	40,4	1353	0,17	nd						
62	(Z)-3-Tetradeceno	HC	41,1	1391	0,25	0,30	0,08	nd	0,15	nd	0,16	nd
63	Tetradecano	HC	41,3	1399	0,13	nd	0,03	nd	0,14	nd	nd	nd
64	Dodecanal	AH	41,5	1402	0,26	nd						
65	(Z)- β -Farneseno	SQ	41,7	1418	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,05	nd
66	Dihidro- β -Ionona	SQ	42,0	1428	nd	nd	0,27	nd	0,14	nd	nd	nd
67	(E)-2-Dodecen-1-ol	AL	42,3	1440	nd	nd	0,19	nd	0,08	nd	nd	nd
68	(E,E)-α-Farneseno (K/ EAG+)	SQ	43,7	1502	0,79	0,35	0,59	0,05	3,35	0,01	0,02	0,01
69	Éster Isobutílico del ácido 2,2,4-Trimetil-3-Carboxiisopropilpentanoico	ES	45,5	1586	2,53	nd	nd	nd	0,12	nd	nd	nd

Cuadro 2.7. continuación

70	Tridecan-1-ol	AL	45,6	1596	nd	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd
71	Hexadecano	HC	45,8	1600	0,60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
72	Éster del ácido Alil Octil Oxálico	ES	47,0	1660	0,72	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
73	Éster bis(2-metilpropílico) del ácido Hexanodioico	ES	47,4	1663	nd	nd	nd	nd	0,08	nd	0,07	nd
74	Éster Ciclohexilmetil Isobutílico del ácido Sulfuroso	ES	47,6	1694	2,59	1,68	1,88	nd	2,49	nd	1,52	nd
75	Éster del ácido Alil Nonil Oxálico	ES	47,7	1701	0,81	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
76	2-Hexil-1-Decanol	AL	48,9	1764	0,32	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
77	Octadecano	HC	49,6	1801	0,87	nd	nd	nd	nd	nd	0,06	nd
78	Éster del ácido mono(2-etilhexil) Hexanodioico	ES	50,3	1845	nd	nd	nd	nd	nd	0,15	nd	nd
Área relativa total					91,36	91,31	96,79	96,59	95,76	98,53	94,55	98,48
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
Frecuencia de Kairomonas (K)					2	2	2	2	2	2	2	2
Proporción de Kairomonas					1,17	0,65	0,75	34,22	3,83	38,86	0,29	40,18
Frecuencia de compuestos EAG+					8	8	6	12	6	12	6	12
Proporción de compuestos EAG+					17,28	45,17	16,15	60,12	10,80	67,42	23,54	67,04

Grupos químicos. TI: Tiol; HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; N: Norisoprenoide; CT: Cetona; SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantagráfica en hembras de carpocapsa.

2.3.4. Caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de fruto en maduración

2.3.4.1. Perfil general de volátiles

En las muestras de frutos y hojas de todos los cultivares recolectados en etapa de maduración, se observó que la mayor proporción de compuestos volátiles correspondía a los grupos químicos de monoterpenos, alcoholes, ésteres y aldehídos. La cantidad de compuestos diferentes identificada en cada grupo, abarcó once monoterpenos, seis alcoholes, once ésteres y nueve aldehídos. En esta etapa se identificaron compuestos volátiles pertenecientes a los Norisoprenoides y Cetonas. El área total identificada entre todos los cultivares fue en promedio del 96% (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en fruto y hoja de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
Monoterpenos	11	9,50	61,37	28,83	73,42	8,55	66,40	4,36	54,07
Alcoholes	6	5,43	26,21	12,16	19,15	4,74	24,24	4,22	35,23
Ésteres	11	9,66	0,36	7,18	0,76	19,25	0,38	22,46	0,23
Aldehídos	9	3,31	4,43	12,78	2,21	7,29	3,06	4,84	5,35
Hidrocarburos	6	18,02	0,04	14,52	0,98	28,40	1,73	24,33	2,01
Sesquiterpenos	3	24,99	0,01	17,89	0,03	4,73	0,01	0,72	0,005
Norisoprenoides	2	14,14	-	0,54	-	20,44	-	33,75	-
Tioles	1	-	8,10	-	1,19	0,52	1,66	0,47	2,89
Aromáticos	2	1,06	0,66	0,97	0,40	1,43	1,10	0,98	0,91
Cetonas	1	-	0,10	-	0,15	-	0,11	-	0,11
%Área total identificada		86,12	99,35	94,86	98,29	95,34	98,70	96,13	99,28

Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

El análisis de componentes principales sobre la base de la relación entre los grupos químicos y los cultivares de membrillo explicó el 85,40% de la variabilidad total (Figura 2.8). En el primer componente del análisis, los ésteres y norisoprenoides son mayoritarios

en los cultivares INTA 117 e INTA 147 y en correlación opuesta, los monoterpenos en el cultivar INTA 37. En el segundo componente, los tioles y sesquiterpenos predominaron el cultivar Champion y los aldehídos en el cultivar INTA 37. Los cultivares INTA 117 e INTA 147 son más similares entre sí en relación con sus grupos químicos. Los cultivares INTA 37 e INTA 147 son los más disímiles entre sí, teniendo en cuenta la composición química.

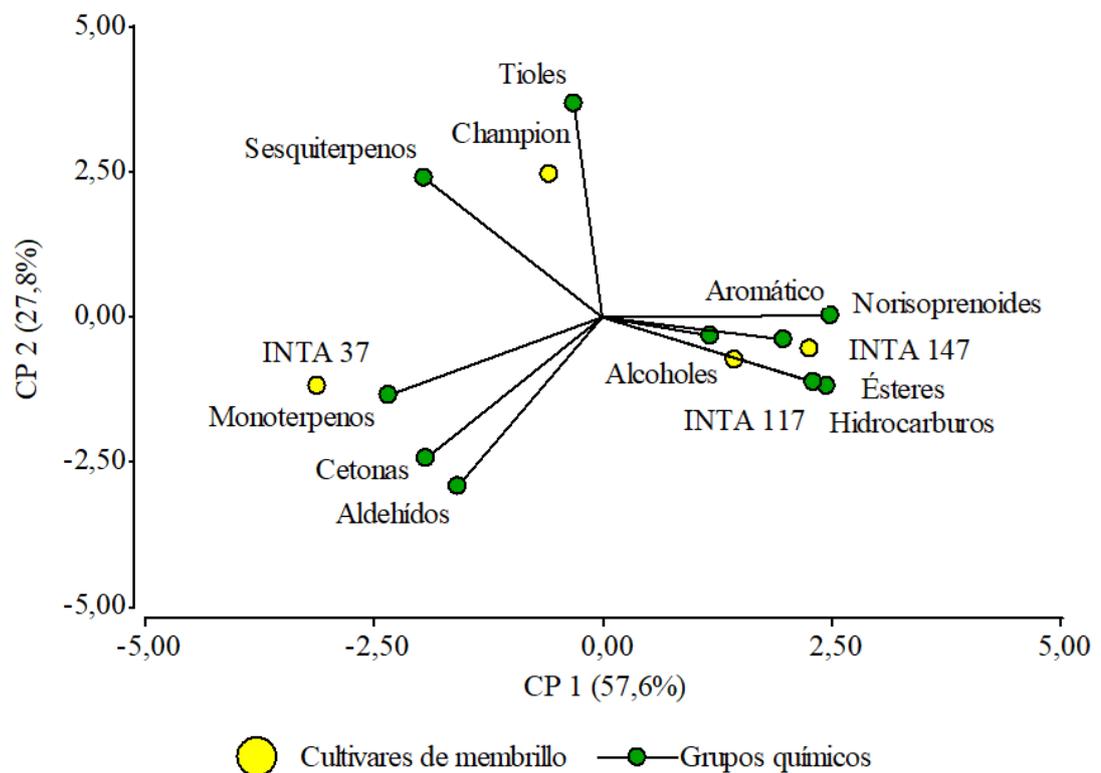


Figura 2.8. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas y frutos de cuatro cultivares de *C. oblonga* en maduración. En amarillo se representan los cultivares y en verde los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

Entre las muestras de frutos y hojas de todos los cultivares recolectados en etapa de maduración se identificaron un total de cincuenta y dos compuestos volátiles diferentes (Cuadro 2.9). De los compuestos identificados, treinta y seis ocurrieron en cantidades consideradas trazas (menores al 0,05%). El cultivar con el perfil de volátiles más variado fue el INTA 147, con un total de cincuenta compuestos químicos diferentes, representando un 96,13% y 99,28% del área total entre frutos y hojas respectivamente.

Los demás cultivares tuvieron entre cuarenta y seis y cuarenta y ocho compuestos diferentes entre frutos y hojas.

Se identificaron once monoterpenos diferentes entre todos los cultivares. De este grupo, siete monoterpenos aparecieron solo en las hojas de todos los cultivares. El Limoneno fue mayoritario en las hojas de todos los cultivares, siendo más abundante en el cultivar INTA 37 (Apéndice Figura 7), con un valor de 70,63% en hojas y 27,84% en frutos. En el resto de los cultivares, este compuesto también estuvo presente en los frutos, con proporciones desde 3,81% a 8,89. El Canfeno, β -Citronelal y (E)- β -Ocimeno estuvieron presentes en frutos y hojas de todos los cultivares y en la mayoría de los casos fueron mayoritarios en los frutos. El Canfeno fue mayoritario en los frutos del cultivar INTA 37, con un 0,64%. El β -mirceno, Sabineno, α -Pinenol, o-Cimeno, p-Cimeno y α -Felandreno solo se presentaron en las hojas de todos los cultivares. El β -Mirceno fue mayoritario con un 1,91% en las hojas de INTA 37. El α -Tujeno, estuvo presente en hojas de todos los cultivares, excepto en el INTA 37.

En todos los cultivares se observó que la mayor proporción de alcoholes corresponden al (Z)-3-Hexenol, presente con mayor abundancia en las hojas. Este compuesto fue mayoritario en las hojas del cultivar INTA 147 (Apéndice Figura 8), con una proporción del 30,33%. Luego se registró una mayor proporción del Hexanol en las hojas del cultivar INTA 117 con un valor del 15,76%. Solo se presentó en los frutos del cultivar INTA 37, con un valor de 2,73%.

Se identificaron once ésteres diferentes, de los cuales seis aparecieron solo en los frutos. El Hexanoato de etilo fue el éster más abundante, siendo mayoritario en los frutos del cultivar INTA 147, con una proporción de 11,42%. También estuvo presente en las hojas con proporciones entre el 0,09% y 0,28%. El Octanoato de etilo, Heptanoato de etilo, Tiglato de etilo y Acetato de Hexilo estuvieron presentes en todos los cultivares,

pero solo en los frutos. El Octanoato de etilo fue mayoritario en los frutos del cultivar INTA 117.

El grupo de aldehídos en algunos cultivares se presentó en mayor proporción en los frutos. El Hexanal estuvo presente en todos los cultivares, siendo mayoritario en los frutos del cultivar INTA 37, con un 12,51%. El Decanal estuvo presente en todos los cultivares, siendo levemente mayor la proporción encontrada en los frutos en comparación a las hojas. El Benzaldehído estuvo solo presente en las hojas de todos los cultivares, siendo mayoritario en el INTA 147 con un 0,79%.

De los sesquiterpenos identificados, el D-Germacreno solo estuvo presente en frutos del cultivar INTA 147 con una proporción de 0,25%. El (E,E)- α -Farneseno estuvo presente en todos los cultivares, siendo mayoritario en los frutos en comparación a las hojas. En frutos del cultivar Champion fue más abundante, con una proporción de 24,97%.

Del grupo de norisoprenoides, se presentó el Teaspirano en sus dos posibles isómeros, Z o E. Solo se presentaron en frutos, siendo más abundante en el cultivar INTA 147, con un 18,35%.

En esta etapa apareció la cetona 6-Metil-5-Hepten-2-ona y solo se identificó en hojas de todos los cultivares, con proporciones entre 0,10% y 0,15%.

2.3.4.2. Cultivares según su actividad electroantenográfica y de kairomonas

En esta etapa fenológica se han identificado diez compuestos con actividad electroantenográfica (EAG+) para hembras de carpocapsa entre todos los cultivares (Cuadro 2.9). En orden de aparición según los tiempos de retención, se observaron los compuestos: (Z)-3-Hexenol, Benzaldehído, 6-Metil-5-Hepten-2-ona, β -Mirceno, Acetato de Hexilo, Limoneno, (E)- β -Ocimeno, Decanal, D-Germacreno y el (E,E)- α -Farneseno.

De los nueve compuestos con actividad electroantegráfica, se registraron dos kairomonas (K) (Cuadro 2.9). En orden de aparición según los tiempos de retención, se observaron los compuestos: Limoneno y el (E,E)- α -Farneseno.

A continuación, se presentan los cultivares en función de la abundancia total de compuestos electroantegráficos y de las kairomonas que registraron.

En primer lugar, el cultivar INTA 37 registró abundancias de compuestos electroantegráficos de 48,69% (cinco compuestos) en frutos y de 86,42% (siete compuestos) en hojas. Los compuestos con actividad electroantegráfica y a la vez kairomona más abundantes fueron el Limoneno y el (E,E)- α -Farneseno. El Limoneno se presentó con un 27,84% en frutos y fue más abundante en hojas con un 70,63%. El (E,E)- α -Farneseno tuvo mayor proporción en los frutos con un 17,89% y cantidad traza en hojas. El (Z)-3-Hexenol fue mayoritario en hojas, con 13,42% y 2,73% en frutos. El Decanal se presentó en frutos con un 0,06% y cantidad traza en hojas. El Acetato de hexilo se registró solo en frutos con proporciones de 0,17%. El (E)- β -Ocimeno presentó un 0,09% en frutos. En hojas se registró un 1,91% de β -Mirceno, 0,27% de Benzaldehído y un 0,15% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona.

En segundo lugar, la proporción de compuestos electroantegráficos que presentó el cultivar Champion fue de 34,10% en frutos y de 82,16% en hojas, con cuatro y siete compuestos respectivamente. El Limoneno fue el compuesto con actividad electroantegráfica y kairomona más abundante en hojas, con un 59,17% y un 8,89% en frutos. Le siguió el (E,E)- α -Farneseno que se presentó con un 24,97% en los frutos, en mayor abundancia con respecto a los otros cultivares y con una cantidad traza en hojas. El Decanal estuvo presente en proporciones de 0,07% en frutos y traza en hojas. El Acetato de hexilo solo se registró en frutos con un 0,18%. El (E)- β -Ocimeno fue

mayoritario en frutos con un 0,10%. Solo en las hojas se registró un 21,24% de (Z)-3-Hexenol, 1,47% de β -Mirceno, 0,16% de Benzaldehído y un 0,10% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona.

En tercer lugar, el cultivar INTA 117 presentó compuestos electroantenográficos con una proporción del 12,68% en frutos y 72,81% en las hojas. El Limoneno fue el compuesto con actividad electroantenográfica y kairomona más abundante, con un 63,71% en hojas y 7,88% en los frutos. Siguió el (E,E)- α -Farneseno, con una proporción de 4,57% en frutos y en una cantidad traza en hojas. El Decanal estuvo presente en proporciones de 0,05% en frutos y en cantidad traza en hojas. El Acetato de Hexilo se registró solo en los frutos en un 0,17%. El (E)- β -Ocimeno presentó en frutos un 0,07%. Solo en las hojas se registró un 7,18% de (Z)-3-Hexenol, 1,58% de β -Mirceno, 0,21% de Benzaldehído y un 0,11% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona.

Por último, el cultivar INTA 147 presentó una proporción de compuestos electroantenográficos de 4,62% en frutos y un 84,28% en hojas. Este cultivar fue el que la menor proporción de kairomonas obtuvo, con 4,13% en frutos y 51,57% en hojas. El compuesto con actividad electroantenográfica y kairomona más abundante en este cultivar fue el Limoneno, con proporciones de 3,81% en frutos y de 51,56% en hojas. Luego siguió el (E,E)- α -Farneseno, presente con un 0,32% en frutos y en cantidad traza en hojas. El Decanal estuvo presente en proporciones de 0,06 en frutos y en cantidad traza en hojas. El Acetato de Hexilo registró solo en los frutos un 0,18% de abundancia. El D-Germacreno solo estuvo presente en este cultivar, en los frutos con una abundancia de 0,25%. Fue el cultivar que registró solo en hojas la mayor proporción de (Z)-3-Hexenol con un 30,33%. Presentó en frutos un 0,08% de (E)- β -Ocimeno. También solo en hojas registró un 1,48% de β -Mirceno, 0,79% de Benzaldehído y un 0,11% de 6-Metil-5-Hepten-2-ona.

Cuadro 2.9: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en frutos y hojas de cuatro cultivares de *C. oblonga*, en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares									
			Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147			
			Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja		
1	Etanotiol	TI	1,80	530	nd	8,10	nd	1,19	0,52	1,66	0,47	2,89
2	Hexano	HC	1,94	601	17,20	nd	14,24	0,79	27,99	1,65	23,66	1,93
3	1-Penten-3-ol	AL	2,47	679	nd	nd	nd	0,29	nd	1,06	nd	1,34
4	2-Metil-2-Butenal	AH	3,09	742	0,08	nd	0,14	nd	1,50	nd	1,01	nd
5	(E)-2-Pental	AH	3,41	747	nd	0,15	nd	0,05	nd	0,05	nd	0,29
6	Tolueno	AR	3,65	756	nd	0,60	0,53	0,27	0,91	1,04	0,73	0,86
7	Hexanal	AH	4,31	795	2,91	1,63	12,51	0,47	5,65	0,56	3,71	1,43
8	Éster etílico del ácido 2-metil Butanoico	ES	5,86	837	2,49	nd	1,00	nd	4,57	nd	4,59	nd
9	(Z)-3-Hexenol (EAG+)	AL	6,19	846	nd	21,24	2,73	13,40	nd	7,18	nd	30,33
10	Ciclohexanol	AL	6,66	857	nd	1,93	nd	nd	nd	nd	nd	1,53
11	1-Hexanol	AL	6,69	859	1,28	2,86	6,51	5,02	1,84	15,76	1,84	1,84
12	Acetato de Metilbutilo	ES	7,10	869	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,09	nd
13	(E,E)-2,4-Hexadienal	AH	8,75	904	nd	0,23	nd	0,48	nd	0,19	nd	0,66
14	α -Tujeno	MT	9,61	915	nd	0,02	nd	nd	nd	0,09	nd	0,03
15	α -Pino	MT	10,05	919	nd	0,30	nd	0,34	nd	0,36	nd	0,42
16	Tiglato de etilo	ES	10,47	921	0,25	nd	0,29	nd	0,70	nd	0,43	nd
17	Canfeno	MT	11,06	943	0,22	0,19	0,64	0,24	0,38	0,27	0,27	0,28
18	Benzaldehído (EAG+)	AH	11,93	942	nd	0,16	nd	0,27	nd	0,21	nd	0,79
19	Sabineno	MT	12,79	950	nd	0,06	nd	0,09	nd	0,10	nd	0,12
20	6-metil-5-hepten-2-ona (EAG+)	CT	13,93	963	nd	0,10	nd	0,15	nd	0,11	nd	0,11
21	β-Mirceno (EAG+)	MT	14,32	969	nd	1,47	nd	1,91	nd	1,58	nd	1,47

Cuadro 2.9 continuación.

22	Hexanoato de etilo	ES	15,14	978	2,46	0,28	3,58	0,11	9,71	0,16	11,42	0,09
23	4-etil-2-hexinal	AH	16,42	992	nd	0,15	nd	0,12	nd	0,14	nd	0,26
24	Acetato de hexilo (EAG+)	ES	16,51	991	0,18	nd	0,17	nd	0,17	nd	0,18	nd
25	p-Cimeno	MT	17,18	1002	nd	0,03	nd	0,03	nd	0,09	nd	0,05
26	Limoneno (K/EAG+)	MT	17,50	1005	8,89	59,17	27,84	70,63	7,88	63,71	3,81	51,56
27	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,40	1034	0,10	0,05	0,09	0,03	0,07	0,04	0,08	0,03
28	α -Felandreno	MT	20,52	1040	nd	0,03	nd	0,04	nd	0,06	nd	0,04
29	o-Cimeno	MT	23,29	1050	nd	0,03	nd	0,07	nd	0,07	nd	0,06
30	Heptanoato de etilo	ES	25,34	1092	0,45	nd	0,42	nd	0,84	nd	1,13	nd
31	(E,Z)-2,6-nonadienal	AH	26,89	1111	nd	0,17	nd	0,79	nd	1,90	nd	0,37
32	β -Citronelal	MT	29,62	1133	0,29	0,02	0,27	0,03	0,21	0,04	0,20	0,02
33	(Z)-2-Nonen-1-ol	AL	32,34	1174	3,92	0,18	2,87	0,43	2,90	0,24	2,38	0,20
34	(E)-1-(metoximetoxi)-2-octeno	HC	32,76	1175	0,22	0,01	0,16	0,03	0,25	0,03	0,58	0,02
35	(Z)-4-Octenoato de etilo	ES	33,85	1190	0,25	nd	0,10	nd	0,19	nd	0,34	nd
36	Octanoato de etilo	ES	34,34	1196	1,61	nd	0,89	nd	2,26	nd	2,05	nd
37	Decanal (EAG+)	AH	34,76	1200	0,07	0,01	0,06	0,03	0,05	0,01	0,06	0,02
38	Teaspirano Z o E	N	38,06	1291	9,16	nd	0,20	nd	11,90	nd	18,35	nd
39	Teaspirano Z o E	N	38,69	1307	4,99	nd	0,34	nd	8,54	nd	15,40	nd
40	Éster isobutílico del ácido 2,2,4-trimetil-3-isopropilcarboxipentanoico	ES	39,72	1331	0,59	nd	0,15	0,11	0,11	nd	0,21	nd
41	(E)-7-Tetradeceno	HC	39,99	1359	nd	0,03	nd	0,10	nd	0,06	nd	0,05
42	Éster del ácido 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil)propil 2-metil-propanoico	ES	40,39	1368	0,20	0,02	0,22	0,25	0,20	0,06	0,35	0,04
43	(Z)-3-Tetradeceno	HC	41,02	1391	0,19	nd	0,12	nd	0,16	nd	0,09	nd

Cuadro 2.9 *continuación.*

44	Tetradecano	HC	41,30	1399	nd	nd	nd	0,06	nd	nd	nd	0,01
45	Dodecanal	AH	41,46	1402	0,25	nd	0,07	nd	0,08	nd	0,05	nd
46	Dihidro- β -ionona	SQ	42,01	1428	0,02	nd	nd	nd	0,16	nd	0,15	nd
47	D-Germacreno (EAG+)	SQ	43,24	1482	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,25	nd
48	2-(2-etilhexil)-Tiofeno	AR	43,35	1489	1,06	0,06	0,44	0,13	0,52	0,06	0,26	0,05
49	(E,E)-α-Farneseno (K/ EAG+)	SQ	43,67	1503	24,97	0,01	17,89	0,03	4,57	0,01	0,32	0,005
50	3,7,11-trimetil-1-Dodecanol	AL	45,09	1565	0,23	nd	0,04	nd	nd	nd	nd	nd
51	Éster ciclohexilmetil isobutilico del ácido sulfuroso	ES	47,52	1691	1,17	0,06	0,36	0,29	0,51	0,16	0,68	0,10
52	2,6-dimetil-Heptadecano	HC	48,49	1760	0,41	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área relativa total					86,12	99,35	94,86	98,29	95,34	98,70	96,13	99,28
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja
Frecuencia de Kairomonas (K)					2	2	2	2	2	2	2	2
Proporción de Kairomonas					33,86	59,18	45,73	70,66	12,46	63,72	4,13	51,57
Frecuencia de compuestos EAG+					5	8	6	8	5	8	6	8
Proporción de compuestos EAG+					34,20	82,21	48,78	86,45	12,75	72,85	4,70	84,31

Grupos químicos, TI: Tiol, HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; N: Norisoprenoide; CT: Cetona, SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantagráfica en hembras de carpocapsa.

2.4. Discusión

Se caracterizó el perfil de compuestos volátiles del membrillo durante el desarrollo de la fenología del cultivo. Además, se identificaron los volátiles que actúan como atrayentes de carpocapsa. Se plantearon las etapas fenológicas desde floración hasta maduración, para después realizar ensayos relacionados al ciclo biológico de carpocapsa. En la caracterización de volátiles se tuvieron en cuenta flores, hojas o frutos, órganos en los que la hembra de carpocapsa puede oviponer.

Etapa de floración

En esta etapa, se identificaron treinta y nueve compuestos diferentes entre flores y hojas. En hojas predominaron los ésteres, representados en mayor proporción por el Acetato de (Z)-3-Hexenol y en flores los sesquiterpenos con el (E,E)- α -Farneseno. Se identificó la mayor cantidad de sesquiterpenos diferentes, algunos como el β -Cariofileno, D-Germacreno, (Z)- β -Farneseno y (Z,E)- α -Farneseno, estuvieron presentes, pero no en todos los órganos. El (Z)-3-Hexenol predominó en hojas mientras que, el (E)- β -Ocimeno, Limoneno y el Benzaldehído lo hicieron en las flores. Este trabajo presenta el primer aporte de la caracterización de volátiles de flores de membrillo.

En estudios previos, se reportó en hojas de membrillo al Benzaldehído, Linalol, (E,E)- α -Farneseno y Limoneno en alta proporción (Erdoğan et al. 2012). En ramas florales de manzano, se encontró una mayor proporción de sesquiterpenos, de los cuales el (E,E)- α -Farneseno fue el de mayor proporción, siguiendo el D-Germacreno, β -Cariofileno y (Z,E)- α -Farneseno. También se identificaron el Acetato de (Z)-3-Hexenol, Limoneno, (E)- β -Ocimeno, Benzaldehído y del (Z)-3-Hexenol (Bengtsson et al. 2001, Fraternali et al. 2014). En hojas de manzano, se encontró el Acetato de (Z)-3-Hexenol en mayor proporción que el (E,E)- α -Farneseno (Giacomuzzi et al. 2016). Baraldi et al. (1999) identificaron una mayor frecuencia de volátiles en las flores de manzano en comparación

con las flores de peral, en donde predominaron los monoterpenos Linalol y el Limoneno. Si bien el análisis se enfocó en los monoterpenos, también encontraron en ambas especies otros compuestos como el Hexanol y el Acetato de (Z)-3-Hexenol y al Benzaldehído. Omata et al. (1990) encontraron en flores de manzano que aproximadamente el 40% de los volátiles correspondían a hidrocarburos alifáticos, un grupo químico que no fue una fracción predominante en este trabajo. En ramas florales de peral el Acetato de (Z)-3-Hexenol se encontró en mayor proporción que el (E,E)- α -Farneseno (Najar-Rodriguez et al. 2013, Giacomuzzi et al. 2016). Las flores del membrillo fueron el órgano de mayor contribución a la emisión de kairomonas con valores de abundancia relativa entre 39,8% y 94,06%. Sin embargo, las hojas también contribuyeron con altos porcentajes de compuestos EAG+ (superiores al 43,27%), para los cuales aún no se ha determinado si actúan como kairomonas.

Etapas de poscujaje a fruto inmaduro

En esta etapa se identificaron veinticinco compuestos diferentes entre frutos en poscujaje y hojas. El perfil volátil de frutos fue más variado que el de las hojas. El (Z)-3-Hexenol predominó en los frutos de membrillo. En cuanto a los monoterpenos, se identificaron más que en floración y la mayoría apareció solo en frutos de membrillo. El más abundante fue el (E)- β -Ocimeno, pero también se registró δ -3-Careno, Limoneno, Pironeno, β -Mirceno y Alo-Ocimeno. El (Z,E)- α -Farneseno fue el único sesquiterpeno solo presente en los frutos de membrillo. El Benzaldehído, Hexanal y Nonanal solo se presentaron en los frutos de membrillo. En hojas predominaron los ésteres, representados por el Acetato de (Z)-3-Hexenol.

En frutos de manzano el (Z)-3-Hexenol fue predominante en hojas en comparación a los frutos (Bengtsson et al. 2001). En estudios previos Casado et al. (2006, 2008), hallaron en ramas con hojas y frutos de manzano y nogal, que este compuesto aumentó su

proporción al anochecer. En cambio, Vallat & Dorn (2005) observaron que, en ramas con hojas y frutos de manzano, el (Z)-3-Hexenol disminuyó desde caída de pétalos hasta el poscuaje. Se registró la presencia del (E)- β -Ocimeno, δ -3-Careno, Limoneno y β -Mirceno en manzano (Casado et al. 2006). En frutos de manzano el Limoneno, (E)- β -Ocimeno y δ -3-Careno aumentaron desde floración a cuaje (Rapparini et al. 2001) y desde cuaje a fruto inmaduro (Vallat & Dorn 2005). Se encontró que el (Z,E)- α -Farneseno está presente en proporciones menores en comparación con el (E,E)- α -Farneseno (Bengtsson et al. 2001). El Benzaldehído se presentó en manzano (Vallat & Dorn 2005) y en nogal (Casado et al. 2008). Respecto al Nonanal, se encontró en manzano que la proporción aumentó desde floración a poscuaje (Bengtsson et al. 2001) y también desde cuaje a frutos inmaduros (Vallat & Dorn 2005, Casado et al. 2006). También estuvo presente en etapa de frutos inmaduros en nogal (Casado et al. 2008). El Acetato de (Z)-3-Hexenol fue mayoritario en las hojas de manzano por (Bengtsson et al. 2001, Casado et al. 2006, El-Sayed et al. 2013). En esta etapa la contribución y abundancia de kairomonas fue muy baja. Sin embargo, la abundancia de compuestos EAG+ (superiores al 92,18%) fue elevada, principalmente debido a la presencia del Acetato de (Z)-3-Hexenol en las hojas.

Etapas de fruto en crecimiento

Se identificaron setenta y ocho volátiles diferentes entre hojas y frutos. En esta etapa la diversidad de compuestos volátiles fue mayor en comparación con la etapa de floración, poscuaje y maduración. En frutos de membrillo predominaron los alcoholes, representados por una mayor proporción en frutos del Hexanol y del (Z)-3-Hexenol. El grupo de monoterpenos fue muy variado, se destacó en hojas y estuvo representado por el Limoneno. El Acetato de (Z)-3-Hexenol se presentó con abundancia en los frutos y solo en el cultivar Champion fue mayoritario en hojas. El Benzaldehído solo estuvo

presente en hojas. El (E,E)- α -Farneseno fue mayoritario en frutos. El Teaspirano Z o E solo se identificó en frutos.

En estudios previos en manzano se identificaron como volátiles abundantes al Acetato de (Z)-3-Hexenol, al (Z)-3-Hexenol, al (E,E)- α -Farneseno y al Limoneno (Casado et al. 2006). Mattheis et al. (1991) no identificaron ningún monoterpeno o sesquiterpeno en sus estudios en manzano. En cambio, Hern & Dorn (2002), en frutos de manzano solamente identificaron al (E)- β -Ocimeno y al (E,E)- α -Farneseno. Lara et al. (2008) y (Villatoro et al. 2008), identificaron al Limoneno, Acetato de Hexilo, Hexanol y Hexanoato de etilo además de una gran variedad de ésteres no identificados en membrillo. Yang et al. (2021), utilizaron la misma fase de fibra empleada para la técnica de SPME que en este trabajo, para extraer los volátiles en frutos de manzano. Sin embargo, la identificación de dichos autores tiene pocas coincidencias con el membrillo. Los ésteres fueron numerosos, aparece el (E,E)- α -Farneseno, pero no observaron ningún monoterpeno. En frutos de peral se identificaron el hexanoato de etilo, salicilato de metilo y la 6-Metil-5-Hepten-2-ona. Se identificó como mayoritario al (E,E)- α -Farneseno y entre los monoterpenos, solo apareció el (E)- β -Ocimeno (Lu et al. 2012). Por otro lado, el Benzaldehído fue abundante, también el Acetato de (Z)-3-Hexenol, y de una gran variedad de monoterpenos, el (E)- β -Ocimeno fue mayoritario y se detectaron trazas del (E,E)- α -Farneseno (Najar-Rodriguez et al. 2013). En nogal, de una gran variedad de monoterpenos, el β -Pineno fue el más abundante y le siguió el Limoneno. De los ésteres el Acetato de (Z)-3-Hexenol fue mayoritario. Entre los sesquiterpenos se identificó al (E,E)- α -Farneseno, pero en menor cantidad. En esta etapa, la mayor contribución de kairomonas en abundancia se registró en las hojas, excepto en el cultivar Champion que fue en los frutos. Las hojas también aportaron la mayor abundancia de compuestos EAG+ (superiores al 44,98%).

Etapa de fruto en maduración

En la última etapa fenológica del ciclo se identificaron cincuenta y dos volátiles diferentes entre frutos y hojas. Los monoterpenos se destacaron en variedad y representados con el Limoneno mayoritariamente en hojas. Se destaca una gran variedad de monoterpenos como el β -Mirceno, α -Pineno, Canfeno, β -Citronelal, Sabineno, (E)- β -Ocimeno, o-Cimeno, p-Cimeno, α -Tujeno y α -Felandreno. El Hexanol se presentó mayoritariamente en hojas y el (Z)-3-Hexenol solo en hojas. Se identificó el Tiglato de etilo, Acetato de hexilo, Hexanoato de etilo, Heptanoato de etilo y el Octanoato de etilo. Se observó mayoritariamente al Hexanal y Decanal en frutos y al Benzaldehído solo en hojas. El (E,E)- α -Farneseno tuvo mayor proporción en frutos y el D-Germacreno solo se presentó en frutos de un solo cultivar. El Teaspirano Z y E solo se presentaron en los frutos del membrillo.

Schreyen et al. (1979), Tateo & Bononi (2010) y Griñán et al. (2019), encontraron al Limoneno en frutos membrillo en maduración, pero en pequeñas proporciones. Umamo et al. (1986) y Mihara et al. (1987), identificaron al Limoneno, pero en la piel del membrillo. En frutos de membrillo el Hexanol fue un poco mayor al (Z)-3-Hexenol (Schreyen et al. 1979, Tsuneya et al. 1983, Tateo & Bononi 2010). Veličković et al. (2016), encontraron que el Hexanol fue mayoritario en hojas de membrillo. Se concuerda con Erdoğan et al. (2012), quienes encontraron al (Z)-3-Hexenol en una mayor proporción en hojas de membrillo. Se coincide parcialmente con López et al. (2022), los cuales encontraron al Octanoato de etilo como mayoritario de un gran grupo de ésteres, en cultivares de membrillo como Champion e INTA 147. El Benzaldehído y Hexanal se identificaron en membrillo (Schreyen et al. 1979, Umamo et al. 1986, Veličković et al. 2016). Para Erdoğan et al. (2012), la proporción de Benzaldehído fue mayor a la de Hexanal en hojas de membrillo. López et al. (2022) identificó al (E,E)- α -Farneseno

abundante en frutos de membrillo. El (E,E)- α -Farneseno se presentó mayoritariamente en frutos de membrillo (Tateo & Bononi 2010, Veličković et al. 2016, Griñán et al. 2019, López et al. 2022). Erdoğan et al. (2012) además de encontrar al (E,E)- α -Farneseno en hojas, también pudieron identificar al D-Germacreno.

En manzano (Ferreira et al. 2009) y peral (Najar-Rodriguez et al. 2013), el Limoneno fue identificado junto al (E)- β -Ocimeno. En plantas con frutos de manzano, se presentó en gran proporción junto al p-Cimeno (Rapparini et al. 2001). Buttery et al. (2000) identificaron en nogal una gran variedad de monoterpenos que coinciden con los encontrados en este trabajo de tesis. Najar-Rodriguez et al. (2013), identificaron que el (Z)-3-Hexenol fue mayor al Hexanol. Cuando Ferreira et al. (2009) analizaron al fruto de manzano, encontraron que el (Z)-3-Hexenol solo se emitió en piel y pulpa, en una proporción mucho menor al Hexanol, el cual estuvo presente en todas las muestras. Cuando Ferreira et al. (2009) analizaron en partes al manzano, encontraron que el Hexanal y Benzaldehído tuvieron mayores proporciones en la fruta entera, y el Decanal en la pulpa. Buttery et al. (2000) encontraron proporciones similares de estos volátiles en frutos de nogal. La mayor contribución de kairomonas en membrillo se encontró en hojas con abundancias superiores a 51,57% y también la mayor contribución de compuestos EAG+ con abundancias superiores a 72,81%.

Kairomonas y compuestos con actividad electroantenográfica

En etapa de floración no se realizaron ensayos de comportamiento con individuos de carpocapsa. Esto es debido a que, en la floración en el campo experimental, no hubo capturas de adultos de carpocapsa. Esto fue monitoreado con el uso de trampas cebadas con feromonas y seguimiento de carpogrados. Sin embargo, en esta etapa las flores son órganos presentes por un corto periodo, pero con un rol ecológico importante para la atracción de polinizadores (Baraldi et al. 1999, Raguso 2008, Muhlemann et al. 2014).

Por esto la emisión de un “bouquet” diverso y exclusivo en composición, establecería una comunicación específica entre grupos específicos de polinizadores como, abejas, polillas, moscas, avispa, escarabajos (Dudareva & Pichersky 2000, De Vega et al. 2014, Bisrat & Jung 2022). También se ha demostrado que la emisión de volátiles en floración podría variar siguiendo ritmos circadianos, atrayendo tanto polinizadores diurnos como nocturnos (Dudareva & Pichersky 2000, Raguso 2008). De los compuestos con actividad electroantenográfica en floración, algunos se han reportado como atrayentes de abejas melíferas: el (Z)-3-Hexenol (Bisrat & Jung 2022); Benzaldehído (Bisrat & Jung 2022, Su et al. 2022); el (E,E)- α -Farneseno (Bisrat & Jung 2022) y (E)- β -Ocimeno (Bisrat & Jung 2022, Su et al. 2022). Los abejorros y abejas carpinteras son atraídos por el (E,E)- α -Farneseno (Klatt et al. 2013) y el Limoneno (Klatt et al. 2013, Bisrat & Jung 2022).

En el Capítulo 3 se presentan los ensayos de comportamiento con hembras fecundadas para evaluar la oviposición y con larvas neonatas de carpocapsa para la elección, frente a cultivares de membrillo. Estos ensayos se realizaron desde poscujaje hasta la maduración del membrillo.

La oferta de compuestos con actividad electroantenográfica y de kairomonas fue menor en poscujaje y mayor en crecimiento. Entre las tres etapas coinciden en presencia el Limoneno, (E)- β -Ocimeno, (Z)-3-Hexenol, Acetato de hexilo, Benzaldehído y β -Mirceno. El Limoneno sería una potencial kairomona de hembras de carpocapsa según lo hallado por Landolt & Guédot (2008). El Acetato de hexilo generó una mayor respuesta de hembras en comparación con el Benzaldehído y β -Mirceno según Casado et al. (2006). El Acetato de (Z)-3-Hexenol y el Nonanal solo se presentaron en poscujaje y crecimiento del membrillo. El Acetato de (Z)-3-Hexenol tuvo una mayor respuesta de hembras de carpocapsa que el (Z)-3-Hexenol (Casado et al. 2006). El (Z)-3-Hexenol generó una respuesta electroantenográfica consistente en hembras según Bengtsson et al. (2001) y

Ansebo et al. (2004). En manzano generó baja respuesta en electroantenografía según Casado et al. (2006) y de captura en trampa según Landolt & Guédot (2008). El (E)- β -Ocimeno estuvo presente en manzanas, peras y nueces y provocó una respuesta antenal en hembras de carpocapsa (Witzgall et al. 2005). El 6-Metil-5-Hepten-2-ona, Decanal, y el (E,E)- α -Farneseno estuvieron presentes en crecimiento y maduración del membrillo. En poscujaje no se registró al (E,E)- α -Farneseno, la kairomona principal de carpocapsa (Bengtsson et al. 2001, Bäckman et al. 2001, Ansebo et al. 2004, Casado et al. 2006, Landolt & Guédot 2008, El-Sayed et al. 2013). En cambio, se registró al (Z,E)- α -Farneseno, el cuál posee actividad electroantenográfica en hembras de carpocapsa (Bengtsson et al. 2001, Bäckman et al. 2001, El-Sayed et al. 2013). Ambos sesquiterpenos dieron respuestas similares en hembras de carpocapsa mediante electroantenografía, presentándose el (E,E)- α -Farneseno en mayor proporción que el (Z,E)- α -Farneseno (Bengtsson et al. 2001). El Decanal y nonanal provocaron respuestas en hembras superiores al (E,E)- α -Farneseno según Casado et al. (2006) y similares entre sí, según El-Sayed et al. (2013). El volátil 6-Metil-5-Hepten-2-ona mostró una respuesta antenal de hembras un poco menor en comparación al (E,E)- α -Farneseno (Casado et al. 2006). El 2-Hexenal, Octanal, Salicilato de Metilo y β -Pineno solo estuvieron presentes en la etapa de crecimiento del membrillo. Según Casado et al. (2006), el Octanal generó una respuesta antenal de hembras mayor, luego siguió el 2-Hexenal, Salicilato de Metilo y β -Pineno. El Salicilato de Metilo provocó una respuesta antenal de hembras constante (Bengtsson et al. 2001, Bäckman et al. 2001, El-Sayed et al. 2013). En algunos trabajos el β -Pineno ha sido reportado como repelente de hembras fecundadas (Vallat & Dorn 2005). El D-Germacreno solo se presentó en etapa de crecimiento del membrillo y provocó una respuesta antenal de hembras según Bäckman et al. (2001) y Bengtsson et al. (2001).

Kairomonas como el (E,E)- α -Farneseno y el (E,Z)-2,4-Decadienoato de Etilo (éster de pera), también atraen a las larvas neonatas de carpocapsa (Sutherland & Hutchins 1972, Knight & Light 2001). El éster de pera no se encontró en este trabajo, pero si fue reportado en variedades de membrillo por López et al. (2022). Según Landolt et al. (2000), las larvas neonatas respondieron en ensayos de doble elección y olfatometría, dirigiéndose hacia la fuente de emisión de extracto de manzana de frutos inmaduros. Estos extractos deben poseer kairomonas de atracción de larvas neonatas de carpocapsa.

Sobre la base de la presencia de kairomonas y sus proporciones en cada cultivar, se propone que en etapa de poscuaje y frutos inmaduros, los cultivares INTA 147 y Champion, podrían ser más atractivos hacia las hembras de carpocapsa y larvas neonatas. En etapa de crecimiento los cultivares INTA 147 e INTA 117 podrían ser los más elegidos. Por último, en maduración, los cultivares INTA 37 y Champion podrían ser los más atractivos hacia carpocapsa.

En los frutos, la producción y emisión de volátiles definen el aroma como un indicador de madurez (Villatoro et al. 2008). La contribución de cada compuesto en el aroma final depende de la disponibilidad de sustratos y la actividad enzimática correspondiente en cada ruta biosintética de los volátiles. Con el avance del desarrollo de la fenología, se espera una progresión natural de compuestos volátiles. Al principio el perfil puede estar representado por aldehídos que se reducen a alcoholes, que luego se esterifican y finalmente predominan los ésteres (Mattheis et al. 1991, Espino-Diaz et al. 2016). En este trabajo esta progresión de volátiles no ocurrió. La emisión de monoterpenos fue aumentando y la de sesquiterpenos disminuyendo a medida que avanzaba el desarrollo de la fenología del membrillo. La biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos ocurre en rutas y lugares separados, pero conectados entre sí, dependiendo del flujo de carbono (Dudareva et al. 2013, Muhlemann et al. 2014). La proporción de alcoholes y aldehídos

fue aumentando hasta la etapa de crecimiento y luego disminuyeron en maduración. En cambio, los ésteres aumentaron desde floración a poscujaje, para luego disminuir drásticamente hacia la madurez. Los norisoprenoides aparecieron en etapa de crecimiento y aumentaron su proporción en maduración. Hay grupos químicos que no tuvieron diversidad de compuestos volátiles como los tioles, cetonas, ácidos orgánicos y norisoprenoides. En la identificación se observaron compuestos que contienen azufre, como el Éster de Sulfuro, el Tiofeno y Etanotiol. Hay compuestos volátiles que desde su biosíntesis pueden derivar de aminoácidos (Dudareva et al. 2006, Espino-Diaz et al. 2016), la Metionina, puede originar compuestos como el Dimetilsulfuro o Tioésteres. Algunos compuestos de sulfuro han sido identificados en manzano y uva (Giacomuzzi et al. 2017), melón (El Hadi et al. 2013) y frutos tropicales (Cannon & Ho 2018). Por otro lado, el Tolueno, Estireno, p-Xileno y m-Xileno, están asociados a actividades antropogénicas y como contaminantes del aire (Baraldi et al. 1999, He et al. 2019).

Al analizar el perfil de volátiles por cultivar, órgano y según el desarrollo fenológico del membrillo, se observa que la presencia y proporción de algunos compuestos fue cambiando. A partir de la etapa de crecimiento hacia la maduración, se observó que los grupos de alcoholes, monoterpenos, ésteres y aldehídos fueron más diversos que en las etapas más tempranas. Por otro lado, los sesquiterpenos solo fueron abundantes y diversos en floración. A esto se suma a que la oferta de kairomonas y compuestos electroantenográficos fue distinta entre etapas fenológicas. Según lo analizado en este capítulo, se reúnen evidencias en favor de la Hipótesis: “El perfil de compuestos volátiles varía con las distintas etapas fenológicas del membrillo”. La emisión de compuestos volátiles puede variar por: el estado de desarrollo fenológico; condiciones ambientales; posición geográfica; la genética entre especies o cultivares y el manejo agronómico como fertilizaciones y aplicaciones químicas (Fellman et al. 2000, El Hadi et al. 2013, Espino-

Diaz et al. 2016). También pueden variar por diferencias metodológicas (Hern & Dorn 2002, Khoubnasabjafari & Jouyban 2011), como el método de extracción de volátiles y la parte de la planta a analizar. Incluso ocurren variaciones por factores bióticos. En situaciones de estrés hídrico, la emisión de volátiles puede disminuir (Ebel et al. 1995, Mpelasoka & Behboudian 2002, Griñán et al. 2019). La emisión de volátiles también puede variar según los ritmos circadianos (Dudareva & Pichersky 2000, Raguso 2008). Se ha encontrado una emisión diferente entre el día y el anochecer de algunos compuestos volátiles en frutales de pepita y nogal (Casado et al. 2006, 2008).

Se han identificado una gran variedad de compuestos volátiles en membrillo desde los primeros reportes (Shimizu & Yoshihara 1977, Khoubnasabjafari & Jouyban 2011). Con el paso del tiempo las técnicas de extracción de volátiles fueron variando, desde preparaciones que involucran una molienda o destrucción de la muestra, a poder muestrear la fruta entera o en porciones. La eficiencia de extracción de volátiles por fase sólida, además de las condiciones experimentales, también depende de las propiedades del recubrimiento de la fibra. La fibra SPME recubierta con DVB/CAR/PDMS, como fuera utilizada en este trabajo, proporcionó la mayor eficiencia de extracción en volátiles de manzano (Ferreira et al. 2009) y en membrillo (Tateo & Bononi 2010) en trabajos previos. Se destaca que algunos de los autores realizaron la identificación de volátiles en ramas con sus frutos y hojas.

Plagas como la carpocapsa y otros Tortricidos, frente a un perfil de volátiles cambiante según el desarrollo fenológico de su hospedero, tienden a interpretar la información química y adaptarse. Estas señales emitidas en una mezcla compuesta o en un bouquet específico, son percibidas por la hembra que es la que debe elegir el sitio para oviposición (Piñero & Dorn 2009, Tasin et al. 2011, Lu et al. 2014). La emisión de diferentes perfiles o bouquet de volátiles del membrillo, estaría influyendo en el comportamiento de la

carpocapsa en las diferentes etapas fenológicas. El perfil de volátiles cambia durante el desarrollo del membrillo y la carpocapsa ataca al cultivo durante casi todo el ciclo fenológico. Por esto, era interesante caracterizar el perfil de volátiles de este cultivo, en una interacción membrillo-carpocapsa poco estudiada. En el capítulo siguiente, se plantea evaluar el comportamiento de la plaga en las etapas fenológicas del membrillo.

2.5.Conclusión

Los resultados expuestos en este capítulo reúnen evidencias en favor de la hipótesis planteada ya que el perfil de compuestos volátiles fue cambiando en proporción y variedad durante la fenología del membrillo. En etapa de poscuaje y frutos inmaduros, los cultivares INTA 147 y Champion, podrían ser más atractivos hacia las hembras de carpocapsa y larvas neonatas. En etapa de crecimiento los cultivares INTA 147 e INTA 117 podrían ser los más elegidos. Por último, en maduración, los cultivares INTA 37 y Champion podrían ser los más atractivos para carpocapsa. De esto surge una alternativa interesante, al identificar en el membrillo posibles volátiles con actividad electroantenográfica o kairomonas, que tengan aplicación sobre otros hospederos. Este trabajo representa el primer aporte científico de la evaluación de compuestos volátiles en membrillo en distintas etapas fenológicas.

CAPÍTULO 3

Oviposición de hembras y elección de larvas neonatas de carpocapsa durante la
fenología del cultivo

3.1. Introducción

La Carpocapsa (*Cydia pomonella* L.) es reconocida como una plaga olífaga y sus principales hospederos son el manzano, peral, membrillero y el nogal (Wearing et al. 2001, Casado 2007). Esta plaga afecta intensamente los frutos y tiene impacto en la calidad de las producciones en la mayoría de las regiones donde estos cultivos están (Fernández 2012, Cichón et al. 2015). Una vez fecundada, la hembra de carpocapsa lleva a cabo la localización del hospedero y el reconocimiento del sitio adecuado para la oviposición de su descendencia. Este proceso de localización implica la respuesta a diversos estímulos, incluyendo los visuales, táctiles y semioquímicos volátiles (Gut 1980, Blomefield et al. 1997, Martí Martí 2000, Wearing 2016). La correcta localización del hospedero es de vital importancia para la alimentación y desarrollo de la larva neonata, y por ende, para la continuidad del ciclo de vida de la especie (Martí Martí 2000, Al Bitar et al. 2012, Wei et al. 2015). La carpocapsa muestra una preferencia notable en su elección de hospederos, siendo el manzano el más seleccionado en comparación con el peral, membrillero y nogal. Dentro de las variedades de manzano, la Golden Delicious es la más preferida, lo que la hace más susceptible a las infestaciones por carpocapsa (Hogmire & Miller 2005, Joshi et al. 2015, Wearing 2016).

La emisión de volátiles de los hospederos estimula la producción de feromona de las hembras, el llamado y cópula con los machos de carpocapsa y la posterior oviposición (Yan et al. 1999, Vallat & Dorn 2005, Witzgall et al. 2005). Durante las primeras etapas fenológicas, la mayoría de los huevos son depositados en las hojas cercanas a los frutos. A medida que el tiempo avanza, los huevos son colocados directamente sobre los frutos (Geier 1963, Blomefield et al. 1997, Martí Martí 2000, Wearing 2016). La hembra prefiere oviponer sobre superficies lisas, evitando las pubescentes (Geier 1963, Gut 1980, Martí Martí 2000, Al Bitar et al. 2010, Wearing 2016). Una vez que nacen las larvas,

deben localizar el fruto e ingresar rápidamente sino quedarían expuestas a condiciones desfavorables como la mortalidad por exposición a insecticidas, depredadores o factores abióticos (Martí Martí 2000, Hughes et al. 2003, Light & Beck 2012). Durante la localización del fruto, la larva realiza comportamientos de búsqueda en los que se orienta mediante la percepción de las kairomonas emitidas por el hospedero (Landolt et al. 1998, Hughes et al. 2003, Pasqualini et al. 2005).

En investigaciones sobre localización de hospedero, el uso de las kairomonas tomó relevancia cuando se emplearon para el monitoreo mediante trampas o combinadas con el uso de insecticidas (Knight & Light 2001, Witzgall et al. 2008, Knight et al. 2018). Las kairomonas principales de carpocapsa son el (E,E)- α -Farneseno y el Éster de Pera, ambos compuestos atraen adultos y larvas (Knight & Light 2001, Light et al. 2001, Knight et al. 2018). El (E,E)- α -Farneseno en altas dosis resulta ser repelente de hembras fecundadas (Hern & Dorn 1999). La exposición a ciertas dosis del Éster de Pera (Light & Beck 2010, 2012) y al (E,E)- α -Farneseno y extractos de manzano (Hughes et al. 2003), causaron el arresto en larvas neonatas y un aumento en el tiempo de merodeo antes de ingresar al fruto. Las larvas neonatas sobreviven en un breve periodo de tiempo sin alimentación, por lo que deben localizar y penetrar las frutas rápidamente (Jackson 1979, Martí Martí 2000). Una vez que la larva ingresa al fruto, se pierde el momento oportuno de control mediante insecticidas o depredadores (Knight et al. 2018).

Las hembras de carpocapsa son atraídas por los estímulos volátiles emitidos por los frutales. En ensayos en túnel de vuelo (Reed & Landolt 2002) y mediante olfatometría (Yan et al. 1999), las hembras fecundadas de carpocapsa se sintieron atraídas por los frutos y aromas del manzano. La aplicación de semioquímicos que puedan inducir repelencia en la oviposición o prolongar el tiempo de exposición de las larvas recién nacidas, representa una estrategia interesante para el control de plagas en el campo. Surge

entonces la posibilidad de identificar en el membrillo, posibles volátiles con actividad electroantenográfica o kairomonas, que tengan aplicación sobre otros hospederos. En el capítulo anterior se observó que los compuestos volátiles fueron cambiando en proporción y variedad durante la fenología del membrillo. Según la oferta de compuestos electroantenográficos y las kairomonas, indican que en etapa de poscujaje y frutos inmaduros, los cultivares INTA 147 y Champion, podrían ser más atractivos hacia las hembras de carpocapsa y larvas neonatas. En etapa de crecimiento los cultivares INTA 147 e INTA 117 podrían ser los más elegidos. Por último, en maduración, los cultivares INTA 37 y Champion podrían ser los más atractivos para carpocapsa.

En este capítulo los objetivos a determinar fueron: la preferencia de oviposición de hembras fecundadas y la elección de larvas neonatas de carpocapsa, entre los distintos cultivares en las diferentes etapas fenológicas del cultivo. También se determinó el sitio de preferencia de oviposición entre hojas y frutos en las diferentes etapas fenológicas del cultivo.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Obtención de individuos de carpocapsa

Se estableció una cría de carpocapsa en condiciones controladas de laboratorio, para garantizar el número de individuos necesarios en los bioensayos. Se inició un pie de cría a partir de huevos de carpocapsa. Los mismos fueron provistos de la cría establecida en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA-Alto Valle, Río Negro. Se mantuvieron los huevos con humedad, temperatura a 25°C y luz hasta que avanzaran en su desarrollo. Una vez que se observó el estado de huevo denominado “cabeza negra” (Cichón et al. 2015), una porción del material con huevos se destinó a ensayos con larvas neonatas y la otra a cría para mantener la colonia. Las larvas neonatas fueron colocadas en frascos de vidrios, con una porción de dieta artificial.

La dieta artificial para la cría de larvas consistió en una mezcla propuesta por Poitout et al. (1972), con ajustes y modificaciones del área de cría de carpocapsa de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA-Alto Valle, Río Negro. Esta dieta cumple con los requerimientos nutricionales y el medio físico, para garantizar el desarrollo de todos los estadios larvales. La dieta se elaboró con la consistencia adecuada, por lo cual las larvas neonatas pudieron explorar y alimentarse. Estas alcanzaron su último estadio en la dieta, y posteriormente formaron pupas. Una vez que el desarrollo avanzó en estado, de las pupas emergieron los adultos. Para mantener una colonia, los adultos que emergieron se dispusieron en cámaras de reproducción de forma similar a lo propuesto por Herrera et al. (2016), con ajustes y modificaciones. Las cámaras de oviposición consistieron en cilindros de PVC blanco de 2000 cm³. El interior de los cilindros se revistió con papel tipo “cocina”. Este papel tiene la textura lisa ideal para la oviposición de las hembras de carpocapsa. Dentro se colocó un bebedero con una solución de miel, ácido ascórbico, multivitamínico y antimicótico nipagin (Hernández 2015). Dentro del cilindro se colocaron hasta 200 parejas de carpocapsa, esta densidad de individuos maximiza la copula y oviposición. Las cámaras de oviposición se mantuvieron a 25 °C, con un 30-70% de humedad relativa y con iluminación natural. Cada cámara se mantuvo por 4 días. Luego se extrajo el papel con huevos, ya que en ese periodo los adultos dejaron el 80-94% de su descendencia (Dyck 2010). El papel se revisó cada dos días.

Una cantidad determinada de hembras se extrajo para los ensayos, y la otra se destinó a mantener la colonia. El ciclo de cría de carpocapsa en laboratorio, se esquematiza en la Figura 3.1.

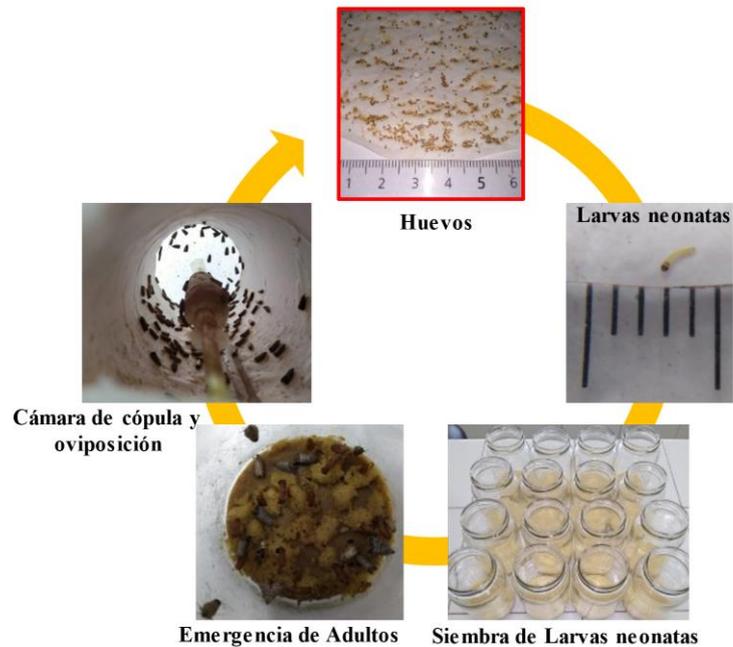


Figura 3.1: Esquema que representa el ciclo de cría de carpocapsa.

3.2.2. Ensayo de oviposición de hembras fecundadas

Para evaluar la elección de oviposición de hembras fecundadas, se dio a elegir entre los distintos cultivares. Los cultivares fueron: Champion, INTA 37, INTA 117 e INTA 147. Para ello se realizaron combinaciones entre los cultivares dispuestos de a pares en un contenedor plástico de 14000 cm³. Cada combinación de cultivares se repitió 6 veces. Cada par de elección consistió en una rama con su fruto y hojas. Las ramas fueron colocadas en viales conteniendo agua para prevenir la deshidratación mientras duró el ensayo. En cada contenedor se ingresaron 4 parejas de carpocapsa, y se las dejó con una fuente de agua durante cuatro días. Cada contenedor se mantuvo tapado con tela *voile*, para permitir el ingreso de aire y luz natural. Luego se retiraron los adultos y se realizó el conteo del número de huevos. Se tomó registro del sitio preferido para la oviposición, ya sea en hojas (cara adaxial y abaxial), flores, frutos y/o ramas. El ensayo de oviposición se representa en la Figura 3.2. Estos ensayos se realizaron en las etapas fenológicas de poscuaje, fruto inmaduro, en etapa de frutos en crecimiento y en maduración. En etapa de

floración no se realizaron ensayos de comportamiento con individuos de carpocapsa. Esto es debido a que, en floración en el campo experimental, no hubo capturas de adultos de carpocapsa. Esto fue monitoreado con el uso de trampas cebadas con feromonas y seguimiento de carpogrados.

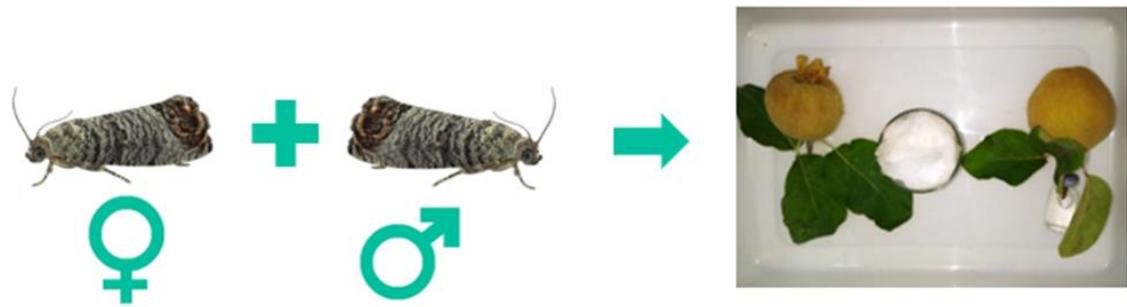


Figura 3.2: Esquema del ensayo de oviposición. Contenedor conteniendo los cultivares de a pares.

Para analizar la preferencia de oviposición entre combinaciones de cultivares por etapa fenológica, los datos se analizaron por una prueba de Chi cuadrado de Bondad de Ajuste con $p < 0,05$, con el programa InfoStat (V. 2020p). Para analizar el número de huevos puestos por hembras de carpocapsa por etapa fenológica y cultivar, se ajustó un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja, ramita y fruto, registrados por etapa fenológica, comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

3.2.3. Ensayos de doble elección de larvas neonatas

Las larvas neonatas fueron obtenidas según la descripción de la cría de carpocapsa del apartado 3.2.1. El ensayo de elección de larvas se realizó de acuerdo con la metodología de Andreadis et al. (2014) y Díaz Duarte (2018), con modificaciones. El diseño experimental consistió en un bioensayo de doble elección por parte de larvas neonatas (dual choice test), entre cultivares diferentes de membrillo. Para ello se realizaron

combinaciones entre los cultivares, dispuestos de a pares, en un contenedor plástico de 2000 cm³ (Figura 3.3).

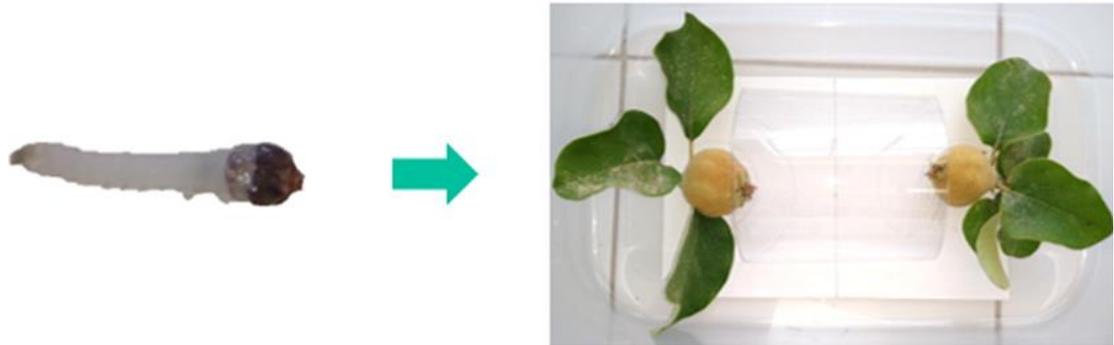


Figura 3.3: Esquema del ensayo de elección de larvas neonatas. Contenedor conteniendo los cultivares de a pares.

Para estos ensayos de doble elección, se testaron 80 larvas neonatas, de una por par de cultivares. Se fueron seleccionando las larvas el mismo día en el que fueron naciendo. Cada larva se colocó en el centro y se dio inicio al cronómetro para registrar el tiempo. Cada larva tuvo un tiempo total de observación de 10 minutos. Se registró la elección final por algún cultivar u otro comportamiento. Estos ensayos se realizaron en las etapas fenológicas de poscuaje, fruto inmaduro, en etapa de frutos en crecimiento y en maduración.

El espacio de observación de los comportamientos de las larvas consistió en un papel de filtro de 18 cm por 10 cm, el cual se colocó en el fondo del contenedor (Figura 3.4).

El papel estuvo seccionado en:

- Área de Elección: por el cultivar 1 o 2, cuando la larva neonata eligió definitivamente algún cultivar. En estas áreas se colocaron los cultivares en los extremos. Cada par de elección consistió en una rama con su fruto y hojas.
- Área de merodeo hacia el cultivar: se refiere a cuando la larva no llegó a elegir ningún cultivar, pero se quedó quieta en el área próxima al finalizar el tiempo de observación.

- Área de merodeo: se refiere a un área más distal a los frutos con ramas donde las larvas no realizaron una elección definida entre los dos cultivares testeados. Su comportamiento solo se basó en recorrer el espacio del ensayo, y al finalizar el tiempo de observación se localizaron en un lugar distinto al centro.
- El área del centro se refiere al área central, equidistante entre los cultivares. La distancia desde el centro hacia los cultivares fue de 9 cm. La elección centro se indica para las larvas que, al terminar el tiempo de observación, se quedaron en el centro, sin realizar ninguna elección.

Cada cinco larvas testeadas, se reemplazó cada cultivar y se cambió el papel.

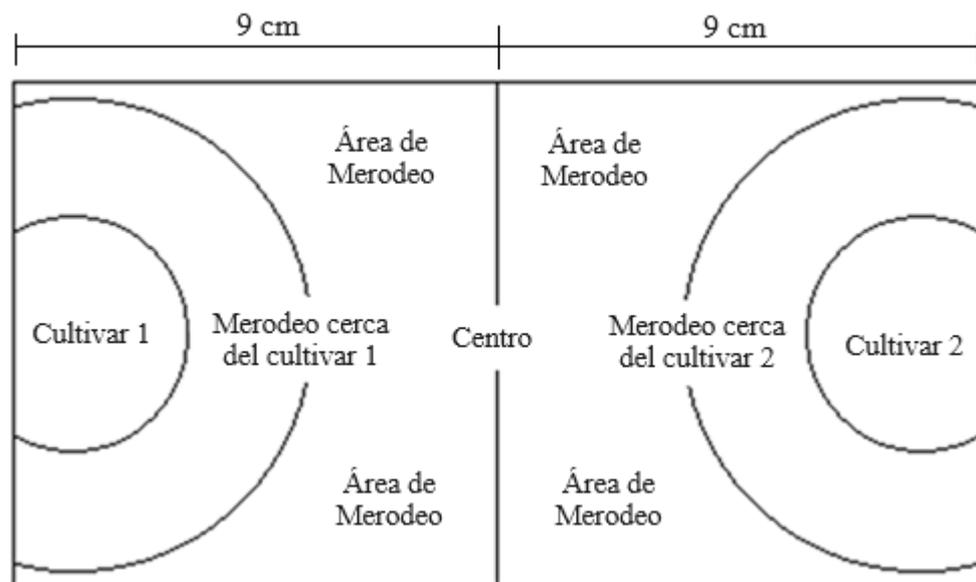


Figura 3.4: Esquema que representa las áreas delimitadas según los comportamientos a registrar en el ensayo de elección de larvas neonatas.

Los datos de preferencia por combinaciones y comportamientos entre cultivares se analizaron con una prueba de Chi cuadrado de Bondad de Ajuste con $p < 0,05$, con el programa InfoStat versión 2020p. El tiempo de elección fue analizado mediante la prueba de Wilcoxon (Mann-Whitney U) con $p < 0,05$, con el programa InfoStat versión 2020p.

3.3.Resultados

3.3.1. Oviposición de hembras de carpocapsa

Se presentan los resultados de oviposición de hembras de carpocapsa por combinación de cultivares y en cada etapa fenológica. También se presenta el sitio preferido de oviposición, ya que este fue variable entre etapas. En general se observó que las hembras colocaron sus huevos en las paredes de los contenedores plásticos de manera dispersa o agrupada. Solo se tuvo en cuenta lo registrado sobre los cultivares ofrecidos.

Etapas de frutos en poscujaje

En etapa de frutos en poscujaje, se contabilizaron 805 huevos en todo el ensayo. La oviposición de hembras de carpocapsa fue significativamente diferente en todas las combinaciones de cultivares (Champion/INTA37: $G^2= 11,06$; $p= 0,0009$; Champion/INTA117: $G^2= 7,39$; $p= 0,0065$; Champion/INTA147: $G^2= 4,21$; $p= 0,0402$; INTA37/INTA117: $G^2= 10,62$; $p= 0,0011$; INTA37/INTA147: $G^2= 43,07$; $p<0,0001$; INTA117/INTA147: $G^2= 8,93$; $p= 0,0028$) (Figura 3.5). Se observó que cuando el cultivar Champion fue testeado, la oviposición predominó hacia cultivares INTA. En todas las comparaciones en las que se probó el cultivar INTA 147, este resultó ser el más preferido para la oviposición, ya que registró la mayor cantidad de huevos. Luego el número de huevos puestos también indicó una preferencia por el cultivar Champion. El número de huevos puestos en el cultivar INTA 37 fue menor cuando se lo comparó con los otros cultivares INTA. El registro de huevos puestos de manera individual sobre el cultivar INTA 117, indican que fue el menos preferido.

Los huevos puestos en total en esta etapa se distribuyeron sobre diferentes órganos del membrillo. Se contabilizó una cantidad significativamente diferente de huevos colocados

sobre la cara adaxial de las hojas, en comparación con la cara abaxial (Figura 3.6). No se registraron huevos colocados en otras partes de la muestra de cultivar ofrecido.

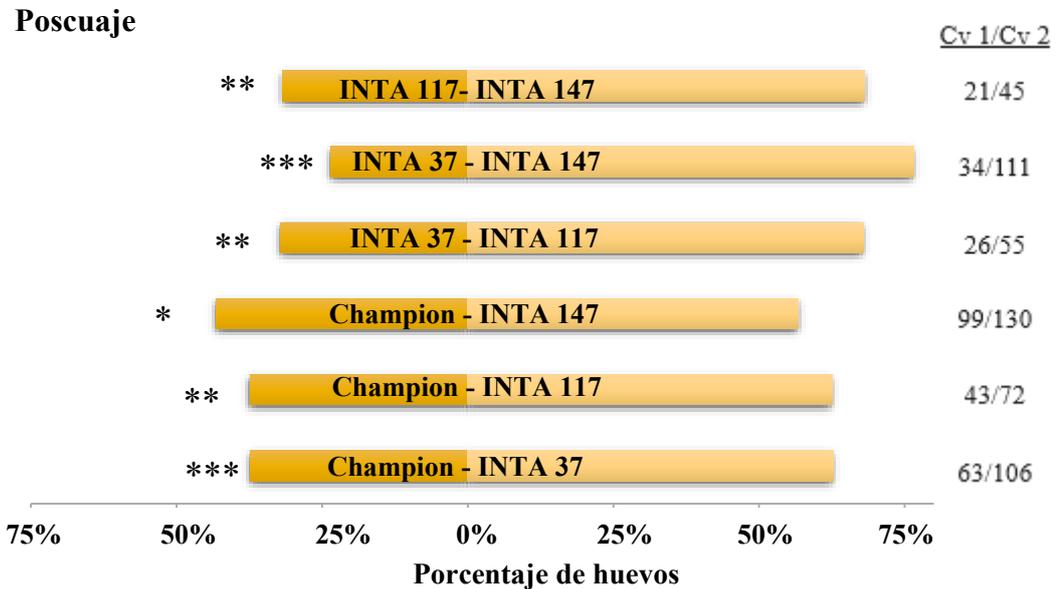


Figura 3.5: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos en poscuaje. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$), *($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

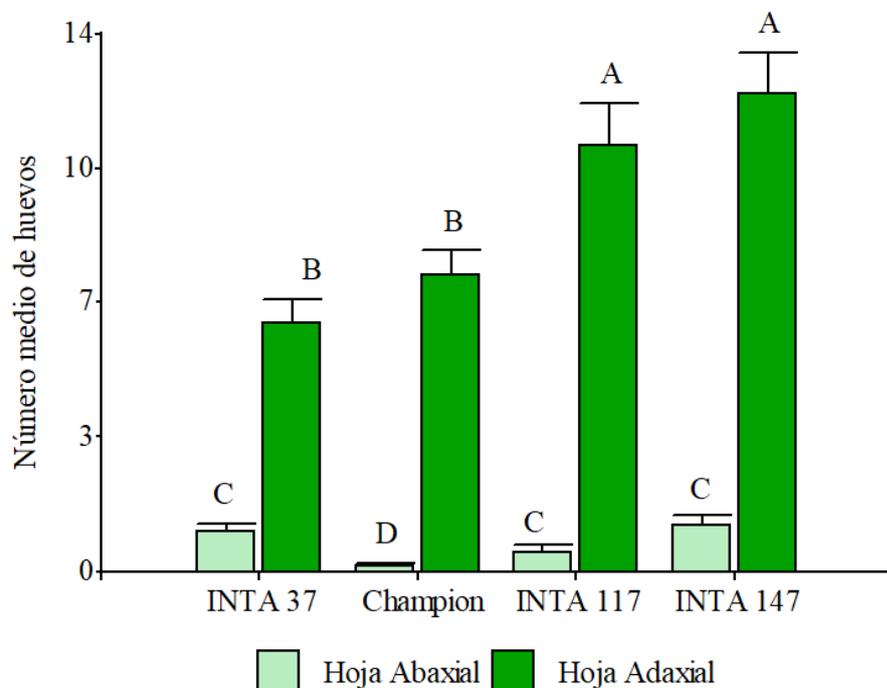


Figura 3.6. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de poscuaje. $N = 6$ para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial, registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Etapa de fruto inmaduro

En esta etapa se contabilizaron un total de 1101 huevos puestos en todo el ensayo. La oviposición fue significativamente diferente en todas las combinaciones de cultivares, excepto en la comparación Champion-INTA 147 (Champion/INTA37: $G^2= 4,12$; $p= 0,0425$; Champion/INTA117: $G^2= 15,19$; $p= 0,0001$; Champion/INTA147: $G^2= 3,29$; $p= 0,0698$; INTA37/INTA117: $G^2= 5,7$; $p= 0,0170$; INTA37/INTA147: $G^2= 14,88$; $p= 0,0001$; INTA117/INTA147: $G^2= 3,91$; $p= 0,0480$) (Figura 3.7). Cuando el cultivar Champion fue testado, la oviposición predominó en cultivares INTA 37 e INTA 117. El cultivar INTA 147 fue el más elegido para la oviposición en dos comparaciones con los otros cultivares INTA. Luego el número de huevos puestos en el cultivar Champion también indicó una preferencia. Cuando se comparó con los otros cultivares INTA, la cantidad de huevos puestos en el cultivar INTA 37 fue menor, lo que indica que fue el menos preferido para la oviposición.

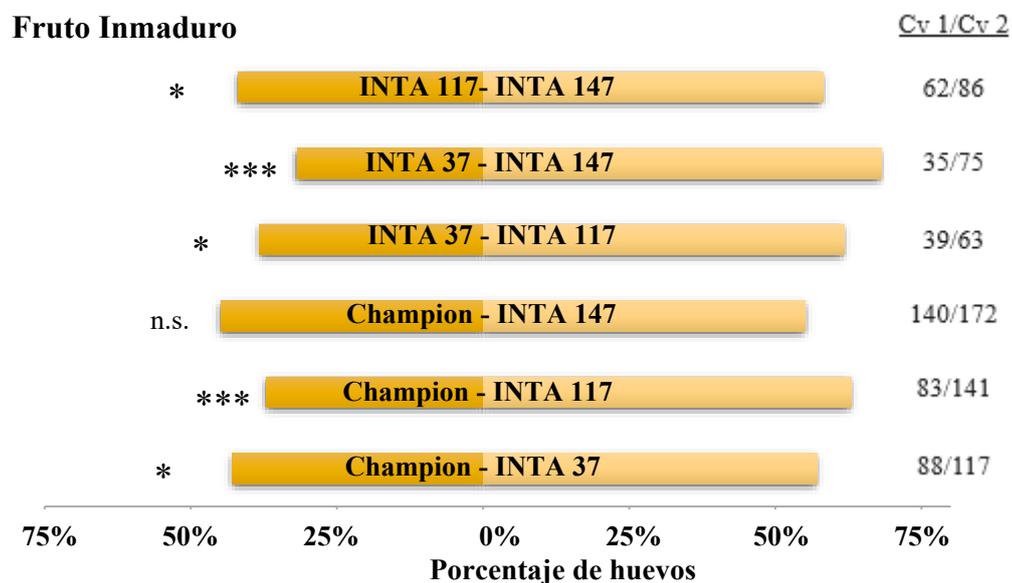


Figura 3.7: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos inmaduros. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p<0,001$), **($p<0,01$), *($p<0,05$) y n.s. ($p>0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha= 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Al registrar el sitio preferido para la oviposición, se observó que fue significativamente mayor la cantidad de huevos colocados sobre la cara adaxial en comparación con la cara abaxial de las hojas del membrillo (Figura 3.8). En esta etapa solo se observaron huevos puestos en las hojas.

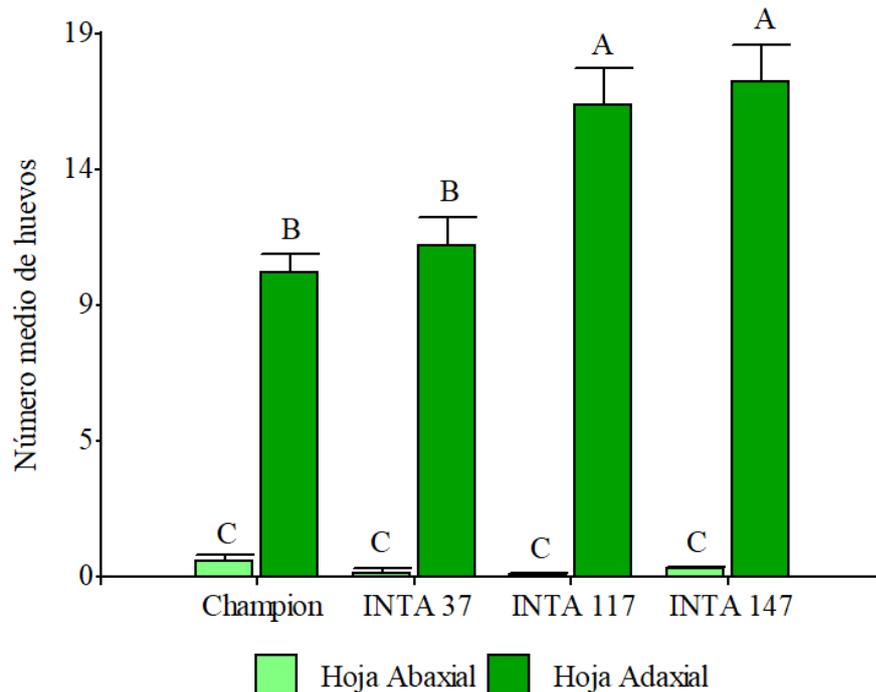


Figura 3.8. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de fruto inmaduros. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial, registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Etapa de fruto en crecimiento

En etapa de frutos en crecimiento se registraron un total de 2404 huevos colocados en todo el ensayo. La oviposición fue significativamente diferente en todas las combinaciones de cultivares, excepto en la Champion-INTA 117 (Champion/INTA37: $G^2= 7,89$; $p= 0,005$; Champion/INTA117: $G^2= 0,3$; $p= 0,5844$; Champion/INTA147: $G^2= 19,63$; $p<0,0001$; INTA37/INTA117: $G^2= 27,73$; $p<0,0001$; INTA37/INTA147: $G^2=$

54,2; $p < 0,0001$; INTA117/INTA147: $G^2 = 11,22$; $p = 0,0008$) (Figura 3.9). El cultivar INTA 147 fue el más elegido cuando se la testeó frente a Champion e INTA 37. Luego fue más elegido el cultivar INTA 117 frente a INTA 37 e INTA 147. El cultivar INTA 37 fue el menos elegido en cualquier combinación.

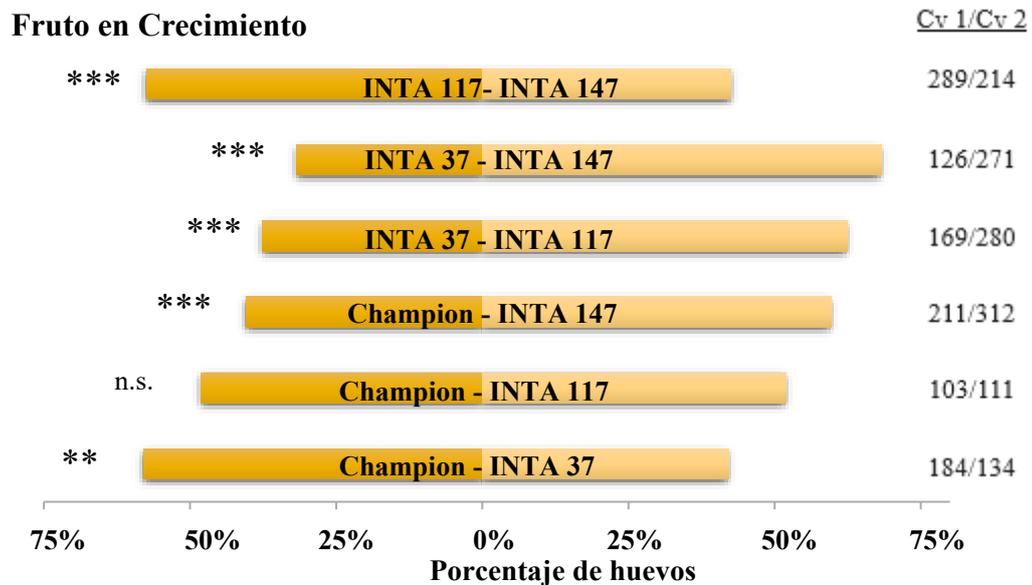


Figura 3.9: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos en crecimiento. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

En esta etapa, los huevos fueron ovipuestos de manera significativamente diferente entre la cara adaxial, cara abaxial y ramas del membrillo (Figura 3.10). La cantidad de huevos colocados en la cara adaxial de las hojas fue mayor a las otras partes de las muestras ofrecidas. Un número muy bajo de huevos fueron puestos en las ramas y se encontraron en zonas sin pubescencia.

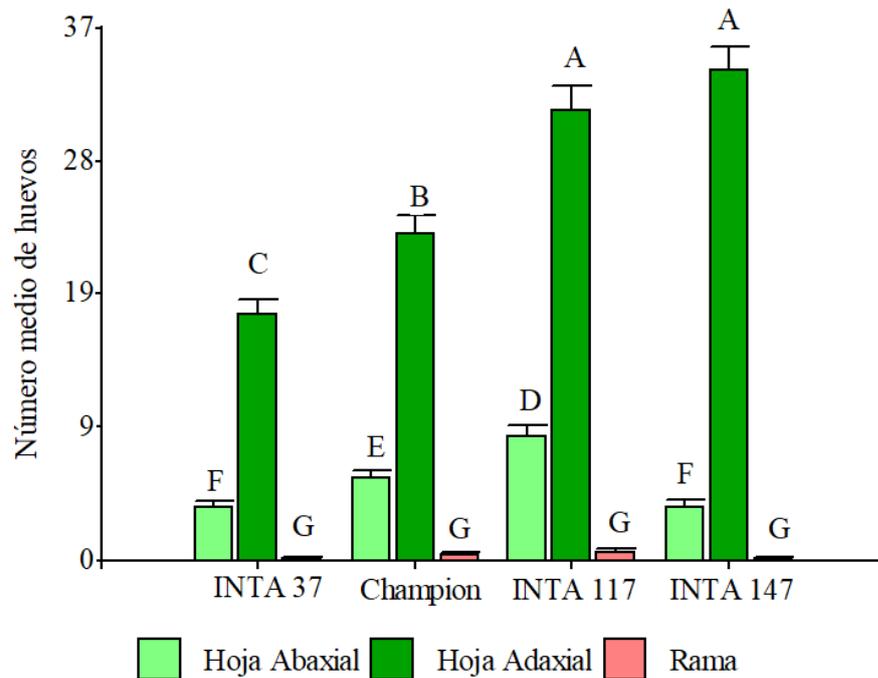


Figura 3.10. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de crecimiento. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial y ramas registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Etapa de fruto en maduración

En la última etapa de ensayos, se contabilizaron un total de 615 huevos. La oviposición fue significativamente diferente en todas las combinaciones de cultivares (Champion/INTA37: $G^2= 23,51$; $p < 0,0001$; Champion/INTA117: $G^2= 8,91$; $p= 0,0028$; Champion/INTA147: $G^2= 13,06$; $p= 0,0003$; INTA37/INTA117: $G^2= 5,82$; $p= 0,0158$; INTA37/INTA147: $G^2= 43,86$; $p < 0,0001$; INTA117/INTA147: $G^2= 15,23$; $p= 0,0001$) (Figura 3.11). El cultivar INTA 147 fue el más elegido frente a todos los cultivares. Luego Champion fue el más elegido en comparación con INTA 37 e INTA 117. El cultivar INTA 37 fue el menos elegido para la oviposición.

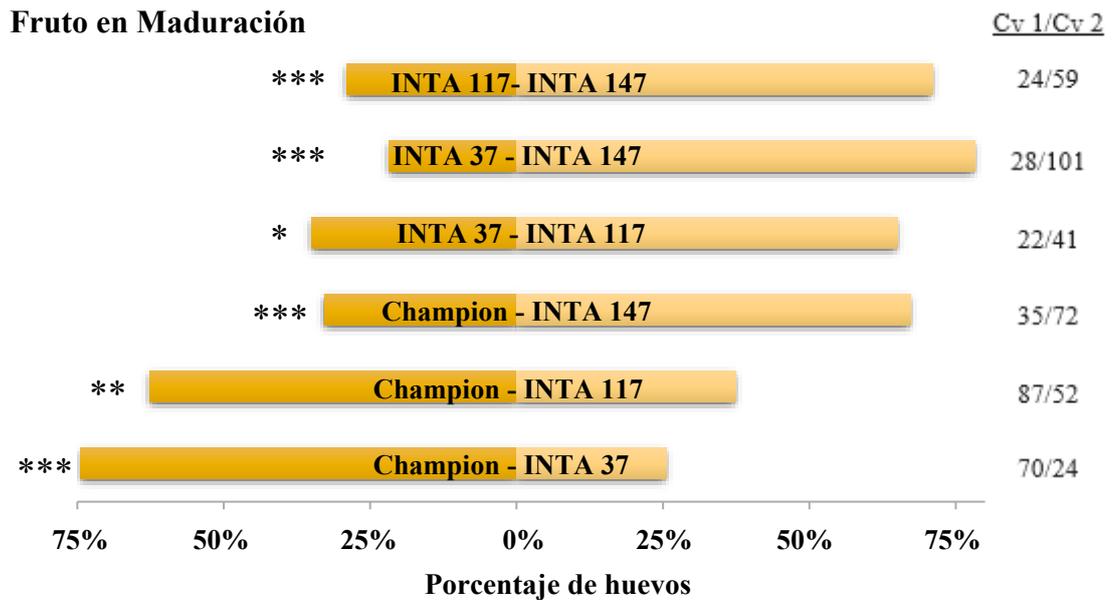


Figura 3.11: Porcentaje y número de huevos puestos según combinaciones de cultivares en etapa de frutos en maduración. El número de huevos difiere significativamente por combinaciones de cultivares ***($p < 0,001$), **($p < 0,01$), *($p < 0,05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de huevos en el cultivar 1 y en el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Al analizar la oviposición en las distintas partes del membrillo, se observó que el número de huevos puestos fue significativamente mayor en la cara adaxial en comparación con la cara abaxial del membrillo (Figura 3.12). Solo en la etapa de maduración de frutos, se observaron huevos puestos en las zonas donde se había perdido la pubescencia del fruto. La cantidad de huevos puestos fue mayor sobre los frutos del cultivar INTA 147.

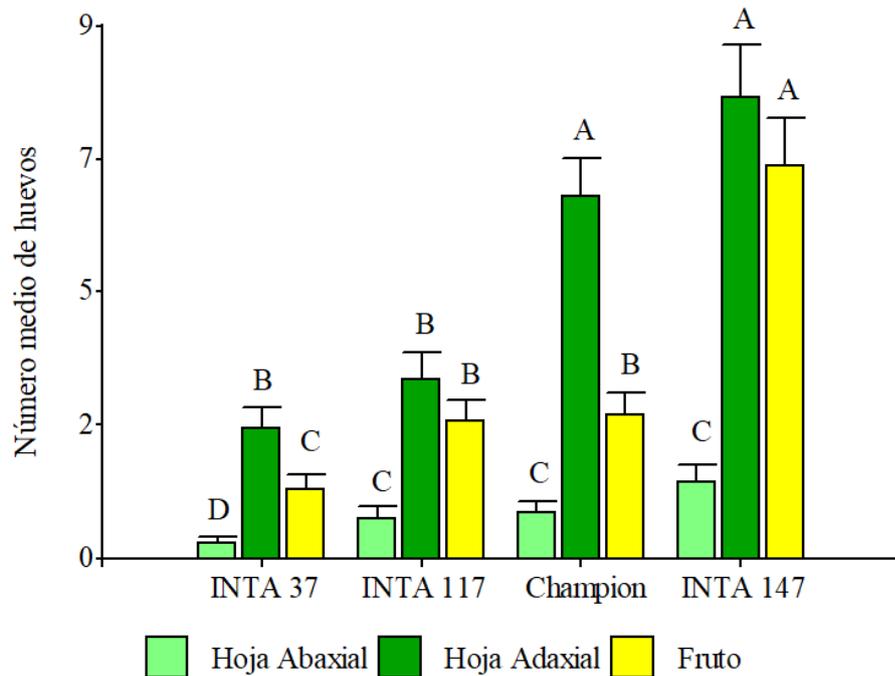


Figura 3.12. Número medio de huevos puestos por carpocapsa en etapa de maduración. N= 6 para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable respuesta número de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja adaxial, abaxial, registrados por comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Se destaca la elevada densidad de pubescencia en todos los cultivares y órganos testeados. Se observó que la pubescencia en ambas caras de las hojas fue disminuyendo conforme avanzaban las etapas fenológicas del membrillo (Figura 3.13). En la Figura 3.14 se muestra a una hembra de carpocapsa sobre fruto maduro (A), la pubescencia en la fruta madura (B), cara adaxial (C) y cara abaxial (D) de las hojas del membrillo. La pubescencia en la cara adaxial se observó en menor densidad en comparación con la cara abaxial de las hojas.

Respuesta de oviposición entre etapas fenológicas

Para este análisis se consideraron todos los huevos puestos independientemente del cultivar. La respuesta de oviposición mostró diferencias significativas entre etapas fenológicas (Figura 3.15). El número total de huevos aumentó desde la etapa de poscuaje,

siendo mayor durante la etapa de crecimiento de frutos y luego disminuyendo hacia el final del ciclo fenológico, en la etapa de maduración de frutos.



Figura 3.13: A) Inicio de floración. B) Floración. C) Poscuaje. D) Fruto inmaduro. E) Fruto en crecimiento. F) Fruto en maduración. Fotos de la colección de cultivares de membrillo EEA San Juan. Elaboración propia.

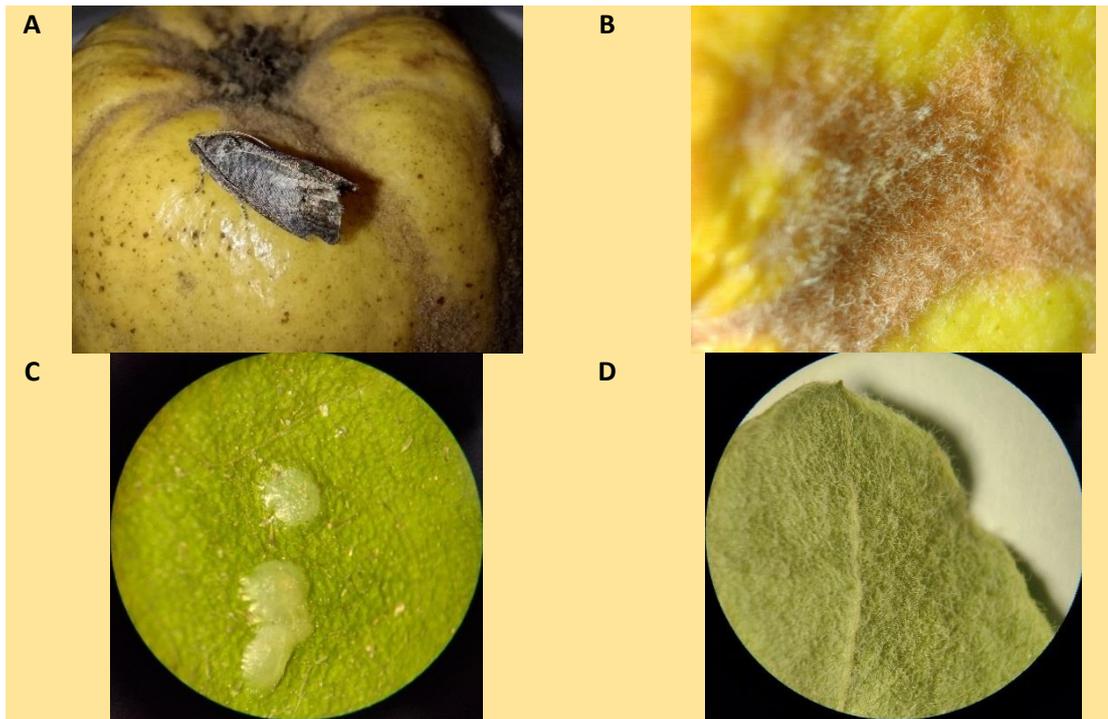


Figura 3.14: A) Adulto de carpocapsa sobre fruto de membrillo. B) Foto del detalle de pubescencia del fruto de membrillo. C) Huevos de carpocapsa sobre cara adaxial de una hoja de membrillo. D) Foto del detalle de la pubescencia en la cara abaxial de una hoja de membrillo. Fotos con lupa estereoscópica 40x. Elaboración propia.

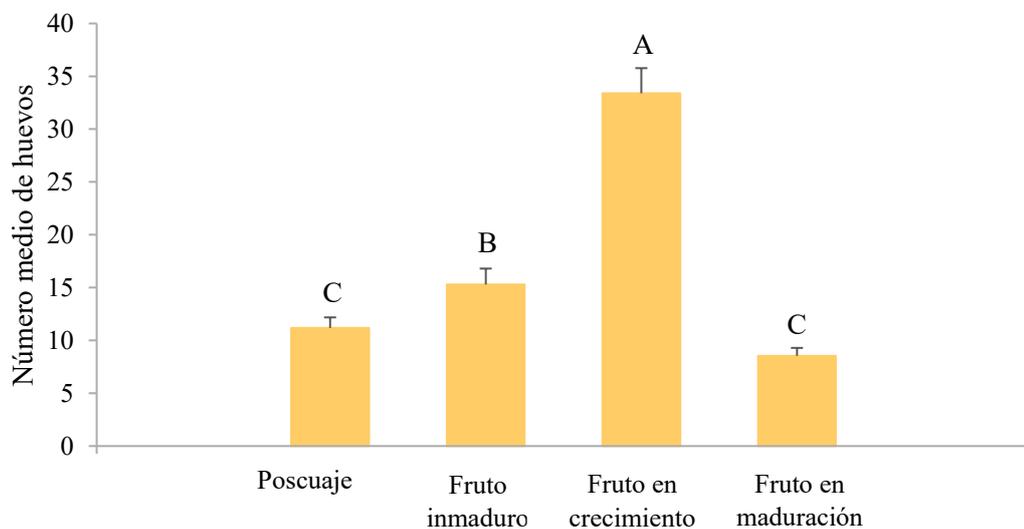


Figura 3.15: Número medio de huevos puestos por carpocapsa por etapa fenológica. $N=6$ para todas las comparaciones. Las medias se separaron mediante la prueba post hoc DGC ($p < 0,05$). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). La variable de respuesta conteo de huevos fue ajustada por un Modelo Poisson Generalizado. Este modelo incluye el número medio de huevos en la hoja, ramita y fruto, registrados por etapa fenológica, comparación y elección de cultivares. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

3.3.2. Elección de larvas neonatas

Se presentan los resultados de elección y los distintos comportamientos de larvas neonatas de carpocapsa, por combinación de cultivares y en cada etapa fenológica. Se tomó como elección, al comportamiento de larvas que optaron por algún cultivar de la comparación, llegando a tocar el fruto. Comportamientos como elección centro, merodeo y quedarse cerca de algún cultivar, tomaron la totalidad del tiempo asignado de observación. Quedarse sin moverse cerca de algún cultivar o en el centro, se consideraron “arresto”. En el periodo de observación se detectó que las larvas levantaron la cabeza por un breve momento. Pero este comportamiento no fue frecuente en todos los ensayos.

Etapa de poscuaje

La elección de las larvas neonatas por algún cultivar, no fue significativamente diferente en la mayoría de las combinaciones (Figura 3.16). En la combinación Champion-INTA 147, la elección fue significativa ($G^2= 4,61$; $p= 0,0317$), con diecinueve larvas que eligieron el cultivar Champion vs ocho del INTA 147. Luego, sin diferencias significativas, hubo una tendencia en elección por el cultivar Champion, comparado con INTA 117. Las elecciones entre pares de cultivares INTA fue similar.

No hubo diferencias significativas en el tiempo que tardaron en elegir un cultivar. Del total de 600 segundos que duró el ensayo, las larvas tomaron en promedio unos 313,53 segundos en elegir alguna opción (Cuadro 3.1). En las tres combinaciones en donde participó el cultivar INTA 147, este registró el menor tiempo de elección. Cuando participó el cultivar Champion, el tiempo de elección fue mayor en comparación con los demás cultivares.

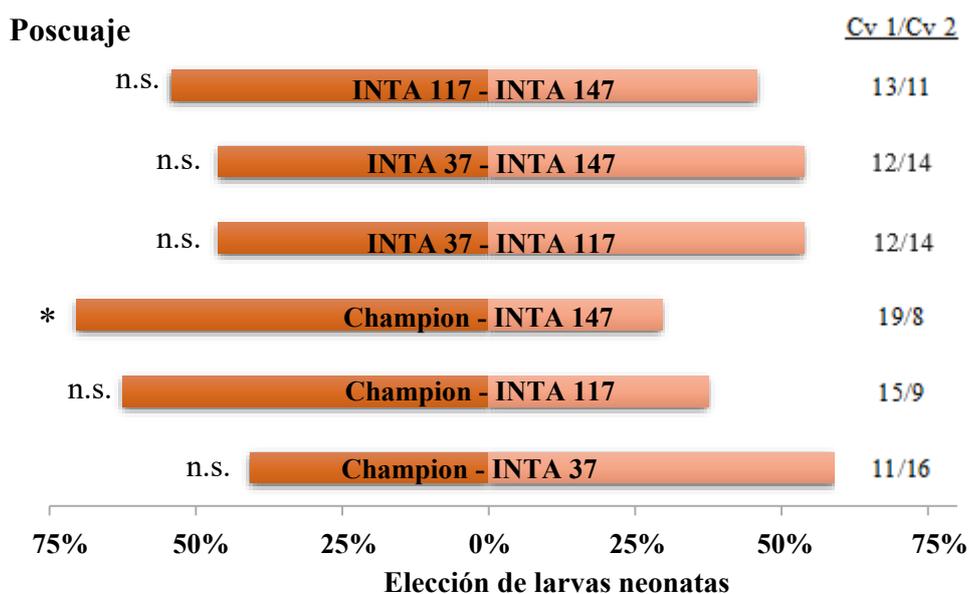


Figura 3.16: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos en poscuaje. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente *($p < 0.05$) y n.s. ($p > 0.05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Cuadro 3.1: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de poscuaje.

Cultivar 1	Tiempo 1	Cultivar 2	Tiempo 2	W	$p(2 \text{ colas})$
Champion	320,73	INTA 37	320,19	153,5	0,9803
Champion	292,07	INTA117	263,22	103	0,5711
Champion	389,47	INTA147	317,63	95	0,3667
INTA 37	296,07	INTA 117	363,83	179,5	0,3679
INTA 37	284,86	INTA 147	248,67	154	0,6807
INTA 117	346,77	INTA 147	318,82	130	0,6638

Tiempo 1: tiempo medio de elección por el cultivar 1. Tiempo 2: tiempo medio de elección por el cultivar 2. W: Prueba de signos de Wilcoxon ($p < 0.05$).

En esta etapa, entre todas las combinaciones de cultivares, un 32% de larvas realizaron una elección definida por algún cultivar y un 34% quedaron merodeando el espacio del ensayo sin elegir (Figura 3.17).

Porcentaje de Comportamientos: Poscuaje

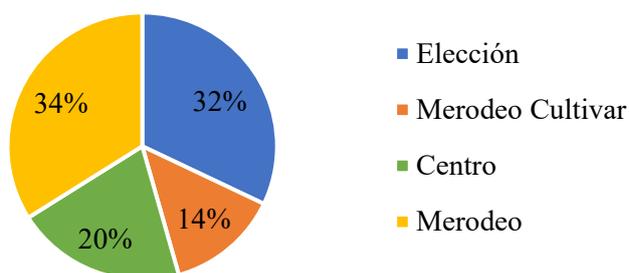


Figura 3.17. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de poscuaje. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

El comportamiento de merodeo por algún cultivar no arrojó diferencias significativas (Cuadro 3.2). En las combinaciones en donde participó el cultivar Champion, se observó una frecuencia mayor de larvas que merodearon cerca de la segunda opción, en este caso, cultivares INTA. Al analizar los comportamientos de las larvas que hicieron una elección, las que quedaron cerca de alguna opción, las que se quedaron en el centro y las que siguieron merodeando, hubo diferencias significativas en todas las combinaciones (Cuadro 3.3). Los valores de elección entre combinaciones fueron similares. La frecuencia de arresto y el merodeo entre todas las combinaciones supera a la elección por algún cultivar. En la comparación Champion-INTA 37 una mayor frecuencia de larvas no tuvo actividad, quedándose en el centro del área del ensayo.

Cuadro 3.2: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de poscuaje.

Combinación	Merodeo Cv 1	Merodeo Cv 2	G ²	gl	p
Champion-INTA37	2	6	2,09	1	0,148
Champion-INTA117	4	7	0,83	1	0,3627
Champion-INTA147	6	8	0,29	1	0,5923
INTA37-INTA117	4	6	0,4	1	0,5257
INTA37-INTA147	6	3	1,02	1	0,3127
INTA117-INTA147	8	5	0,7	1	0,4033

Cv1: Cultivar 1; Cv2: Cultivar 2. Merodeo por algún cultivar por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2.

Cuadro 3.3: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de poscuaje.

Combinación	Elección	Arresto			G ²	gl	p
		Merodeo Cv	Centro	Merodeo			
Champion-INTA37	27	8	22	23	12,17	3	0,0068
Champion-INTA117	24	11	15	30	11,3	3	0,0102
Champion-INTA147	27	14	13	26	8,66	3	0,0341
INTA37-INTA117	26	10	16	28	11,48	3	0,0094
INTA37-INTA147	26	9	19	26	10,96	3	0,0119
INTA117-INTA147	24	13	13	30	10,68	3	0,0136
Total	154	65	98	163			

Distintos comportamientos por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cv, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

Etapa de fruto inmaduro

La elección de larvas neonatas de carpocapsa por algún cultivar, tuvo diferencias significativas en todas las combinaciones realizadas en etapa de frutos inmaduros (Champion/INTA 37; G²= 10,32; p= 0,0013; Champion/INTA 117; G²= 9,43; p= 0,0021; Champion/INTA 147; G²= 18,29; p< 0,0001; INTA 37/INTA 117; G²= 7,84; p= 0,0051; INTA 37/INTA 147; G²= 7,57; p= 0,0059; INTA 117/INTA 147; G²= 19,53; p<0,0001) (Figura 3.18). En cada combinación en donde participó el cultivar INTA 147, fue el más elegido por las larvas neonatas. Luego, siguió como más elegido el cultivar INTA 117 cuando se la comparó con los cultivares Champion e INTA 37. En las tres combinaciones en donde se testeó el cultivar Champion, la preferencia de elección fue por cultivares INTA. El cultivar Champion e INTA 37 fueron los menos elegidos.

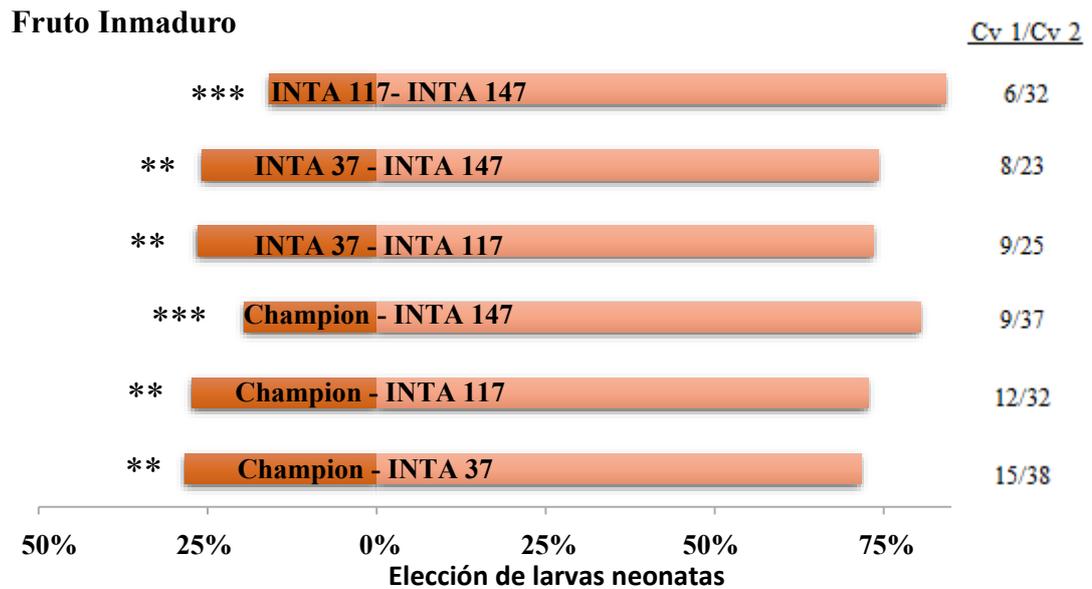


Figura 3.18: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos inmaduros. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente *($p < 0.05$) y n.s. ($p > 0,05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

Del tiempo total del ensayo, las larvas se tomaron unos 309,22 segundos en promedio para realizar alguna elección. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el tiempo de elección (Cuadro 3.4). En las tres combinaciones en donde participó el cultivar INTA 147, este registró el mayor tiempo de elección. Los cultivares INTA 117 y Champion, solo en una combinación registraron el menor tiempo de elección.

Cuadro 3.4: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de fruto inmaduro.

Cultivar 1	Tiempo 1	Cultivar 2	Tiempo 2	W	$p(2 \text{ colas})$
Champion	219,07	INTA 37	305,03	318,5	0,0876
Champion	383,17	INTA117	287,28	327	0,1328
Champion	320,22	INTA147	350,19	191	0,5702
INTA 37	285,72	INTA 117	389,44	200	0,0970
INTA 37	296,96	INTA 147	387,75	158,5	0,1685
INTA 117	212,83	INTA 147	273,09	93	0,3366

Tiempo 1: tiempo medio de elección por el cultivar 1. Tiempo 2: tiempo medio de elección por el cultivar 2. W: Prueba de signos de Wilcoxon ($p < 0.05$).

En esta etapa, un 51% de larvas que realizaron una elección definitiva por algún cultivar. Luego el merodeo del espacio de ensayo sin definir elección tuvo un 22% (Figura 3.19).

Porcentaje de Comportamientos: Fruto Inmaduro

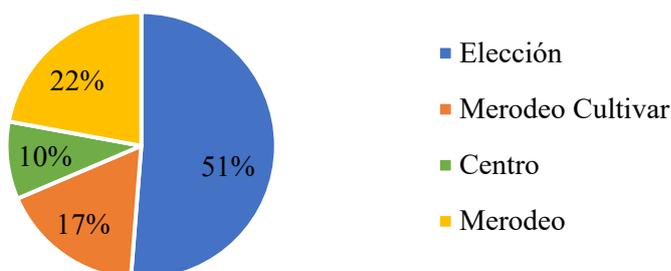


Figura 3.19. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de frutos inmaduros. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

El comportamiento de merodeo por algún cultivar no mostró diferencias significativas en la mayoría de las combinaciones (Cuadro 3.5). En la combinación Champion/INTA 37 hubo diferencias significativas de larvas que merodearon el cultivar INTA 37 ($G^2= 8,55$; $p= 0,0035$). Luego, en la combinación INTA 37/INTA 147 hubo diferencias significativas de larvas que merodearon el cultivar INTA 37 ($G^2= 3,98$; $p= 0,0461$). Respecto a los distintos comportamientos registrados por las larvas neonatas, estos fueron significativamente diferentes en cada combinación de cultivares (Cuadro 3.6). La frecuencia de elección por algún cultivar entre todas las combinaciones fue mayor en comparación con los demás comportamientos. La frecuencia de arresto entre todas las combinaciones fue inferior a la elección por algún cultivar. En la combinación Champion-INTA 37 se observó una mayor frecuencia de elección de larvas y una menor frecuencia de elección centro. En la combinación INTA 37-INTA 147 se registró una menor cantidad

de larvas que eligieron algún cultivar y una cantidad similar entre las que quedaron cerca y en el centro (arresto).

Cuadro 3.5: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de fruto inmaduro.

Combinación	Merodeo Cv 1	Merodeo Cv 2	G ²	gl	p
Champion-INTA37	1	10	8,55	1	0,0035
Champion-INTA117	4	9	1,97	1	0,1601
Champion-INTA147	6	5	0,09	1	0,7629
INTA37-INTA117	14	14	0	1	>0,9999
INTA37-INTA147	10	3	3,98	1	0,0461
INTA117-INTA147	6	14	3,29	1	0,0696

Cv1: Cultivar 1; Cv2: Cultivar 2. Merodeo por algún cultivar por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2.

Cuadro 3.6: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de fruto inmaduro.

Combinación	Arresto				G ²	gl	p
	Elección	Merodeo Cv	Centro	Merodeo			
Champion-INTA37	53	11	4	12	65,02	3	<0,0001
Champion-INTA117	44	13	6	17	38,21	3	<0,0001
Champion-INTA147	46	11	8	15	40,18	3	<0,0001
INTA37-INTA117	34	15	6	25	24,16	3	<0,0001
INTA37-INTA147	31	13	16	20	8,83	3	0,0316
INTA117-INTA147	38	20	5	17	29,39	3	<0,0001
Total	246	83	45	106			

Distintos comportamientos por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cv, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

Etapa de fruto en crecimiento

En etapa de frutos en crecimiento no se observó que la elección de larvas fuera significativa en cada combinación de cultivares (Figura 3.20). A pesar de no existir diferencias marcadas, la frecuencia individual de larvas que realizaron una elección indica que los cultivares INTA 117 e INTA 147 fueron los más preferidos. El cultivar Champion fue el menos preferido en cada comparación frente a los INTA.

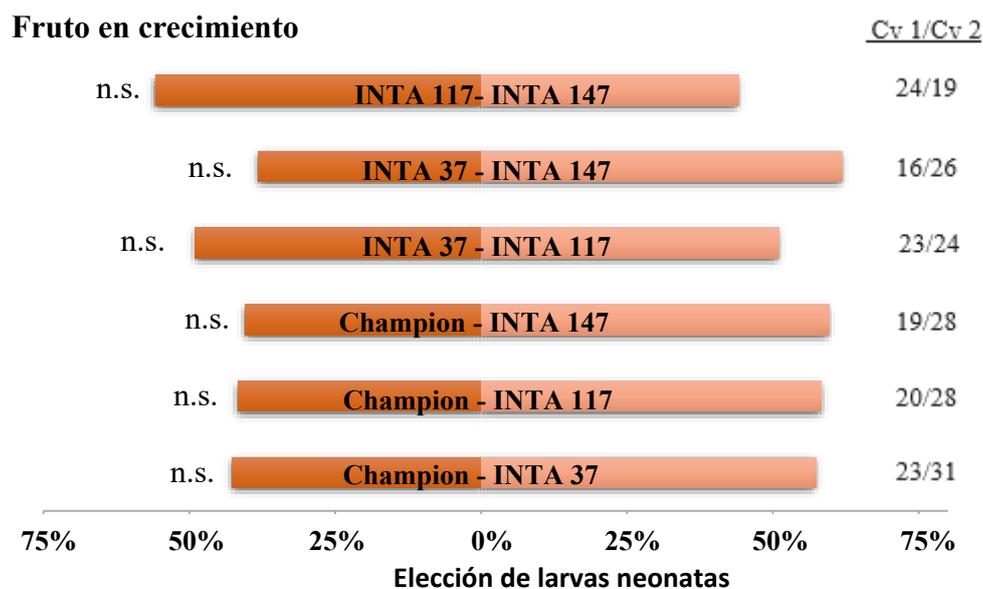


Figura 3.20: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos en crecimiento. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente *($p < 0.05$) y n.s. ($p > 0.05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0,05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

En esta etapa, las larvas tardaron en promedio unos 323,60 segundos en realizar la elección definitiva por algún cultivar. En cada combinación se observó que el tiempo de elección no fue significativo (Cuadro 3.7). El tiempo que las larvas tomaron en elegir el cultivar INTA 37 fue menor. El cultivar INTA 147 registra el mayor tiempo de elección.

Cuadro 3.7: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de crecimiento.

Cultivar 1	Tiempo 1	Cultivar 2	Tiempo 2	W	$p(2 \text{ colas})$
Champion	299,91	INTA 37	297,35	662	0,6058
Champion	312,4	INTA117	325,54	473,5	0,7300
Champion	328,58	INTA147	359,32	424	0,4876
INTA 37	294,75	INTA 117	349,48	599	0,3171
INTA 37	300,73	INTA 147	369,5	392	0,2137
INTA 117	323,96	INTA 147	321,63	390	0,4935

Tiempo 1: tiempo medio de elección por el cultivar 1. Tiempo 2: tiempo medio de elección por el cultivar 2. W: Prueba de signos de Wilcoxon ($p < 0.05$).

En esta etapa, un 58% de larvas realizaron una elección definida. Luego el merodeo del espacio de ensayo sin definir elección tuvo un 27% (Figura 3.21).

Porcentaje de Comportamientos: Crecimiento

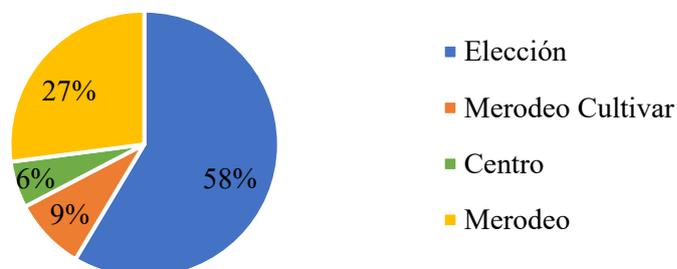


Figura 3.21. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de crecimiento. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

El comportamiento de merodeo por algún cultivar no mostró diferencias significativas en la mayoría de las combinaciones (Cuadro 3.8). Solo en la combinación INTA 117/INTA 147 hubo diferencias significativas de larvas que merodearon el cultivar INTA 147 ($G^2 = 5,06$; $p = 0,0245$). El análisis entre los distintos comportamientos en cada combinación fue significativamente diferente (Cuadro 3.9). La frecuencia de larvas que eligieron algún cultivar entre todas las combinaciones, fue mayor en comparación con los otros comportamientos. El comportamiento de arresto entre todas las combinaciones fue más bajo que el de elección y merodeo. El arresto fue similar en todas las combinaciones. La combinación Champion-INTA 37 registró una mayor frecuencia de elección por algún cultivar y de merodeo de larvas.

Cuadro 3.8: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de crecimiento.

Combinación	Merodeo Cv 1	Merodeo Cv 2	G ²	gl	p
Champion-INTA37	3	5	0,51	1	0,4772
Champion-INTA117	3	3	0	1	>0,9999
Champion-INTA147	5	5	0	1	>0,9999
INTA37-INTA117	4	1	1,93	1	0,165
INTA37-INTA147	3	2	0,2	1	0,6536
INTA117-INTA147	1	7	5,06	1	0,0245

Cv1: Cultivar 1; Cv2: Cultivar 2. Merodeo por algún cultivar por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2.

Cuadro 3.9: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de crecimiento.

Combinación	Arresto				G ²	gl	p
	Elección	Merodeo Cv	Centro	Merodeo			
Champion-INTA37	54	8	2	16	76,26	3	<0,0001
Champion-INTA117	48	6	6	20	55,15	3	<0,0001
Champion-INTA147	47	10	2	21	59,29	3	<0,0001
INTA37-INTA117	47	5	6	22	56,2	3	<0,0001
INTA37-INTA147	42	5	5	28	53,44	3	<0,0001
INTA117-INTA147	43	8	6	23	43,15	3	<0,0001
Total	281	42	27	130			

Distintos comportamientos por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cv, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

Etapa de fruto en maduración

En la última etapa de ensayos no hubo diferencias de elección en todas las combinaciones de cultivares (Figura 3.22). Si bien no hay diferencias marcadas, el cultivar Champion resultó ser el más preferido por las larvas neonatas, en combinaciones frente a los INTA 37 e INTA 117. Combinaciones en las que participó el cultivar Champion, registraron mayor frecuencia de larvas que realizaron una elección. Combinaciones en donde solo se compararon cultivares INTA, registraron la menor frecuencia de elección de larvas neonatas.

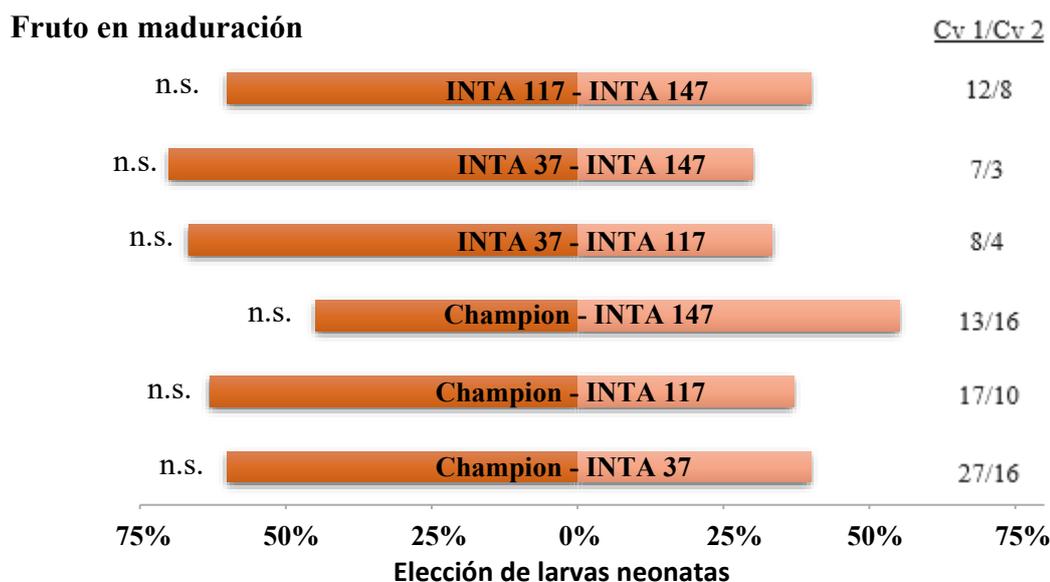


Figura 3.22: Porcentaje y frecuencia de elección de larvas neonatas por combinaciones de cultivares en etapa de frutos en maduración. N= 80. La frecuencia de larvas que realizaron elección por algún cultivar difiere significativamente *($p < 0.05$) y n.s. ($p > 0.05$, no significativa) con la prueba Chi Cuadrado MV-G2, $\alpha = 0.05$. Cv1/Cv2: número de larvas que eligieron el cultivar 1 vs. las que eligieron el 2. El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

El tiempo de elección definitivo de las larvas neonatas fue de unos 367,77 segundos. En cada combinación se observó que el tiempo de elección no fue significativo (Cuadro 3.10). Cuando participó el cultivar INTA 147, el tiempo de elección fue menor. El cultivar INTA 37 registró el mayor tiempo de elección de larvas.

Cuadro 3.10: Tiempo en segundos que tardaron las larvas neonatas en realizar una elección por algún cultivar en las distintas combinaciones en etapa de maduración.

Cultivar 1	Tiempo 1	Cultivar 2	Tiempo 2	W	$p(2 \text{ colas})$
Champion	335,63	INTA 37	344,44	315,5	0,7297
Champion	324,88	INTA117	359,6	148	0,6877
Champion	383,85	INTA147	331,88	207	0,5987
INTA 37	554,5	INTA 117	462,13	30	0,4930
INTA 37	353,67	INTA 147	281,43	20	0,4250
INTA 117	403,92	INTA 147	277,38	62	0,0889

Tiempo 1: tiempo medio de elección por el cultivar 1. Tiempo 2: tiempo medio de elección por el cultivar 2. W: Prueba de signos de Wilcoxon ($p < 0.05$).

En esta etapa, un 28,75% de larvas realizaron una elección definida. Luego el merodeo del espacio de ensayo sin definir elección fue superior a la elección, con un 48% (Figura 3.23).

Porcentaje de Comportamientos: Maduración

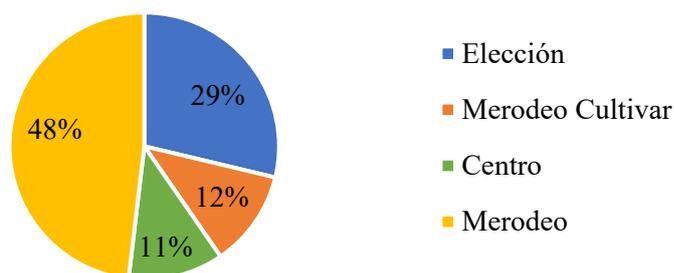


Figura 3.23. Porcentaje de todos los comportamientos realizados por las larvas neonatas en etapa de maduración. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cultivar, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

El comportamiento de merodeo por algún cultivar no arrojó diferencias significativas en todas las combinaciones (Cuadro 3.11). El análisis entre los distintos comportamientos en cada combinación fue significativamente diferente (Cuadro 3.12). La frecuencia de elección por algún cultivar entre todas las combinaciones, fue inferior al merodeo. La frecuencia de arresto fue un poco inferior a la de elección. La frecuencia de merodeo superó a la de elección y arresto. La combinación Champion-INTA 37 registró una mayor elección de larvas neonatas y una menor frecuencia de arresto. En la combinación Champion-INTA 117 se registraron valores similares entre elección, merodeo y arresto, siendo este último comportamiento mayor en comparación con las demás combinaciones. En las combinaciones en donde participaron solo los cultivares INTA, se observó una menor elección de larvas. En todas las combinaciones el comportamiento de merodeo fue alto, siendo mayor en la INTA 37-INTA 147 e INTA 37-INTA 117. En estas combinaciones la elección de larvas por algún cultivar fue menor.

Cuadro 3.11: Frecuencia de larvas neonatas que merodearon cerca de algún cultivar por cada combinación en etapa de maduración.

Combinación	Merodeo Cv1	Merodeo Cv2	G ²	gl	p
Champion-INTA37	2	4	0,68	1	0,4097
Champion-INTA117	3	8	2,36	1	0,1246
Champion-INTA147	5	3	0,51	1	0,4772
INTA37-INTA117	5	6	0,09	1	0,7629
INTA37-INTA147	2	5	1,33	1	0,2491
INTA117-INTA147	5	7	0,33	1	0,5628

Cv1: Cultivar 1; Cv2: Cultivar 2. Merodeo por algún cultivar por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2.

Cuadro 3.12: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos por cada combinación en etapa de maduración.

Combinación	Elección	Arresto			G2	gl	p
		Merodeo Cv	Centro	Merodeo			
Champion-INTA37	40	6	3	31	56,79	3	<0,0001
Champion-INTA117	27	11	15	27	10,63	3	0,0139
Champion-INTA147	29	8	8	35	31,4	3	<0,0001
INTA37-INTA117	12	11	11	46	38,06	3	<0,0001
INTA37-INTA147	10	7	12	51	54,66	3	<0,0001
INTA117-INTA147	20	13	6	41	33,21	3	<0,0001
Total	138	56	55	231			

Distintos comportamientos por combinación de un N= 80 larvas. Chi cuadrado MV-G2. Elección, larvas que eligieron algún cultivar. Merodeo Cv, se refiere a larvas que se quedaron quietas cerca de algún cultivar. Centro, larvas que se quedaron quietas en el centro del ensayo. Merodeo, larvas que se movieron por todo el espacio del ensayo, sin elección definida.

Elección de larvas neonatas entre etapas fenológicas

Al analizar la respuesta de elección de larvas por algún cultivar, entre las distintas etapas fenológicas del membrillo, estas fueron significativas (prueba no paramétrica de Friedman T2 = 45, P= <0,0001) (Figura 3.24). La frecuencia de larvas que realizaron alguna elección aumentó desde el poscuaje, siendo mayor en el crecimiento y luego disminuyendo hacia el final del ciclo fenológico, en la etapa de maduración de frutos.

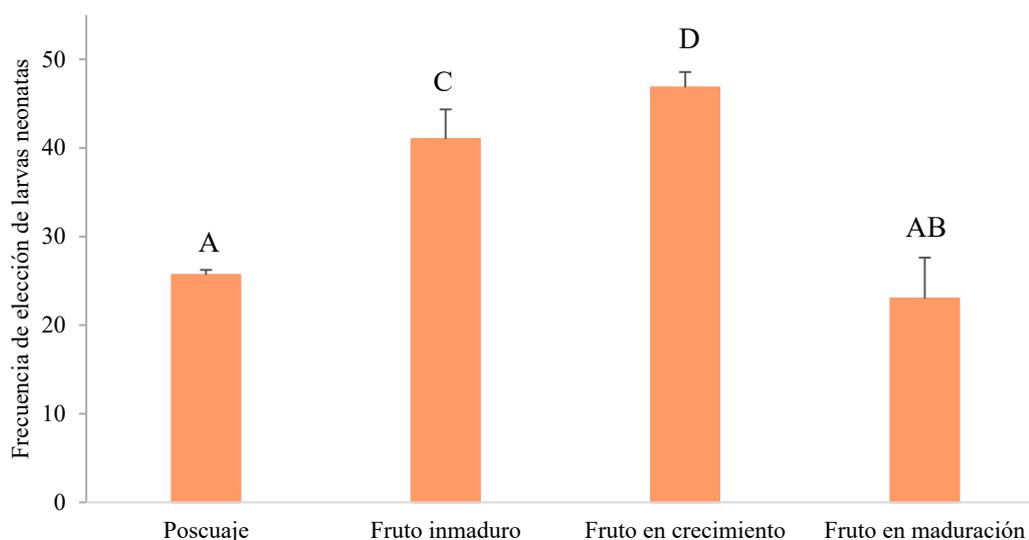


Figura 3.24: Frecuencia de elección de larvas neonatas por etapa fenológica. La frecuencia de larvas que eligieron algún cultivar difiere significativamente entre etapas fenológicas ($T^2 = 45$, $P = <0,0001$; con la prueba no paramétrica de Friedman). Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

3.4. Discusión

Las hembras de carpocapsa cumplen un rol biológico clave en la localización del hospedero y del sitio de oviposición (Martí Martí 2000, Hughes et al. 2003, Wearing 2016). El sitio de oviposición puede ser diferente entre las distintas especies de hospederos y los órganos vigentes según las etapas fenológicas del cultivo (Gut 1980, Blomefield et al. 1997, Bengtsson et al. 2001, Hern & Dorn 2003, Casado et al. 2006, Wearing 2016).

En este trabajo, se observó el comportamiento de oviposición en cultivares de membrillo en distintas etapas fenológicas del cultivo. La metodología empleada, permitió que los estímulos visuales, olfativos y de contacto estuvieran presentes para la oviposición de las hembras. En todas las etapas fenológicas hubo una respuesta activa de oviposición por parte de las hembras. Desde etapa de poscuaje hasta la finalización del ciclo del membrillo, la preferencia de oviposición fue marcada por cultivares INTA. En todas las

combinaciones testeadas, hubo mayor oviposición en los cultivares INTA 147. En la mayoría de las comparaciones la preferencia fue menor en el cultivar INTA 37. Si bien Gómez et al. (2023) estudiaron otras combinaciones de cultivares de membrillo en etapa de maduración, hubo respuesta de oviposición diferencial de las hembras. El cultivar Champion fue el más preferido frente a los cultivares Portugal, Smyrna e INTA 147, contrario a lo encontrado en este trabajo. Existe una preferencia entre hospederos de carpocapsa, en donde el manzano es lo más elegido frente a peral, membrillo y nogal. También hay una preferencia entre variedades de manzano, en donde la Golden Delicious es la más preferida, resultando más susceptible a infestaciones por carpocapsa (Hogmire & Miller 2005, Joshi et al. 2015, Wearing 2016).

La oviposición en el membrillo fue aumentando a medida que avanzaba la fenología, siendo mayor en etapa de crecimiento. En etapa de poscujaje y maduración se registró la menor cantidad de huevos puestos. Generalmente carpocapsa ovipone en menor cantidad en etapas tempranas (Geier 1963, Blomefield et al. 1997, Al Bitar et al. 2012, Joshi et al. 2015, Wearing 2016). Sumado a esto, se ha detectado que la emisión de volátiles en etapas tempranas es baja, y que la misma aumenta al finalizar la temporada (Bengtsson et al. 2001, Hern & Dorn 2003, Vallat & Dorn 2005). Estas emisiones diferentes a medida que avanza el desarrollo del cultivo tienen efecto en la orientación de las hembras de carpocapsa, indicando el momento y sitio adecuado para la oviposición (Geier 1963, Hern & Dorn 2003, Wearing 2016). Existiría un riesgo de mortalidad para los huevos puestos y las futuras larvas, si estos son puestos en etapas tempranas previas a las caídas naturales de frutos, que ocurren en la mayoría de los frutales antes de estabilizarse el cuaje final (Geier 1963, Wearing 2016). La mayor respuesta de oviposición de carpocapsa coincide con la etapa de crecimiento del fruto, en la que se detecta una mayor cantidad de compuestos volátiles en membrillo. Esto coincide con lo encontrado en manzano por

Geier (1963), Blomefield et al. (1997), Vallat & Dorn (2005), Al Bitar et al. (2012), Joshi et al. (2015) y Wearing (2016).

Las preferencias halladas afirman lo encontrado en la caracterización de kairomonas del Capítulo 2: *En base a la presencia de kairomonas y sus proporciones en cada cultivar, se propone que en etapa de poscuaje y frutos inmaduros, los cultivares INTA 147 y Champion, podrían ser más atractivos hacia las hembras de carpocapsa y larvas neonatas. En etapa de crecimiento los cultivares INTA 147 e INTA 117 podrían ser los más elegidos. Por último, en maduración, los cultivares INTA 37 y Champion podrían ser los más atractivos hacia carpocapsa.* Los resultados coinciden en todas las etapas, excepto por las preferencias de oviposición encontradas en maduración, que no concuerdan con la oferta de kairomonas halladas en esta etapa.

Las hembras de carpocapsa siempre responden al estímulo volátil emitido por el frutal. Las hembras fecundadas de carpocapsa fueron atraídas por frutos y aromas del manzano en ensayos en túnel de vuelo (Reed & Landolt 2002), y mediante olfatometría por frutos o trampas cebadas con volátiles del manzano (Yan et al. 1999). La atracción en el olfatómetro fue mayor en la elección de frutos y ramas con hojas y frutos, en comparación con oferta de ramas solo con hojas (Vallat & Dorn 2005). También respondieron positivamente hacia la oferta de frutos de membrillo (Gómez et al. 2023). Mediante olfatometría individual de volátiles del manzano, se observó que el Hexanoato de butilo, Limoneno y β -Cariofileno fueron atractivos, mientras que el Acetato de hexilo, Acetato de butilo, Nonanal, Benzaldehído y β -Pineno fueron repelentes (Hern & Dorn 2004, Vallat & Dorn 2005). Sin embargo, algunos de estos compuestos repelentes, tuvieron respuesta antenal de hembras en electroantenogramas (Casado et al. 2006, El-Sayed et al. 2013). En electroantenografía, cuando un compuesto tiene respuesta antenal, no significa que solo será atractivo (Casado et al. 2006, Knight et al. 2018). En el caso del cultivar

INTA 147, fue el más preferido en la mayoría de las etapas fenológicas, y poseía en su perfil volátiles como el Benzaldehído, Nonanal, Acetato de hexilo y β -Pino.

En algunos cultivares de membrillo, el perfil de frutos y hojas carecía de las kairomonas principales de carpocapsa, como el (E,E)- α -Farneseno y el (E,Z)-2,4-Decadienoato de Etilo (Éster de Pera), tanto en presencia como en proporción. El (E,E)- α -Farneseno por sí solo no explica completamente la atracción de carpocapsa, por lo que habría que buscar e identificar nuevos compuestos volátiles adicionales (Knight et al. 2018). Además, la emisión natural del (E,E)- α -Farneseno en campo dura poco tiempo (Knight & Light 2001). En el caso de carpocapsa la diferencia de oviposición entre cultivares de membrillo, podría estar regulada por un *bouquet* en distintas proporciones en vez de la presencia de un solo compuesto exclusivo (Bruce et al. 2005, Casado et al. 2006, Gómez et al. 2023). Se destaca que la capacidad de carpocapsa de percibir los estímulos volátiles es sesgada entre sexos, siendo más receptivos los machos que las hembras, y las larvas neonatas poseen otros receptores odorantes distintos (Walker et al. 2016). Por ello, se recomienda analizar la respuesta antenal con machos (Casado et al. 2006). Según lo analizado, se reunieron evidencias a favor de la Hipótesis: “La respuesta de oviposición de las hembras de carpocapsa será diferente entre cultivares y las etapas fenológicas del membrillo”.

Además del estímulo mediado por volátiles, participó la superficie de contacto como factor de decisión en la oviposición. Se observó que las hojas ramas y frutos del membrillo son pubescentes durante la mayor parte del ciclo fenológico. En todas las etapas la oviposición predominó en la cara adaxial de las hojas del membrillo. En etapa de crecimiento se observaron huevos en baja proporción, colocados en las ramas de los frutos. En etapa de maduración, se observaron oviposiciones sobre áreas de los frutos que habían perdido la pubescencia. Esto coincide con Geier (1963), Blomefield et al. (1997)

y Wearing (2016), los cuales encontraron que la cantidad de huevos de carpocapsa fue mayor en la cara adaxial de las hojas de manzano. Esta diferencia en oviposición se debe a la densidad de tricomas, lo que genera superficies con más o menos pubescencia (Al Bitar et al. 2012, 2014, Joshi et al. 2015). Una superficie rugosa otorga mayor superficie de contacto para la deposición de huevos (Al Bitar et al. 2012). Las ceras naturales presentes en la superficie de las hojas y frutos facilitan la adhesión de la sustancia que las hembras de la carpocapsa utilizan como cemento para la oviposición (Al Bitar et al. 2012, Joshi et al. 2015, Wearing 2016). Sin embargo, ocurre todo lo contrario, las superficies rugosas son las menos preferidas para la oviposición. Esto depende de la adaptación de carpocapsa a caminar sobre superficies en donde su *arolium* (en el pretarso) se adhiere mejor (Al Bitar et al. 2010). Lo que no se sabe es si existen diferencias entre los cultivares de membrillo a nivel de pubescencia. Esto es algo que no fue evaluado en este trabajo y tal variación podría ser un factor importante para ayudar a explicar las preferencias diferenciales de oviposición encontradas entre cultivares.

Respecto a lo analizado en este capítulo, se reunieron evidencias a favor de la Hipótesis “La elección de la ubicación para la oviposición resultará de la preferencia de las hembras fecundadas de carpocapsa. Esta elección será diferente entre los distintos cultivares de membrillo y las etapas fenológicas del membrillo”. También existen estímulos no volátiles en la superficie foliar que influyen positivamente en el comportamiento de oviposición. Carpocapsa puede detectar carbohidratos solubles, como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, y los alcoholes de azúcar, como el sorbitol, el quebrachitol y el mioinositol. Estos compuestos deben proporcionar información sobre la fisiología de la planta y su valor nutricional (Lombarkia & Derridj 2002, 2008, Derridj et al. 2012).

Luego de que nacen las larvas, los volátiles emitidos por el hospedero tienen un rol importante en guiarlas directamente hacia los frutos como también provocar otros

comportamientos. La localización y el ingreso al fruto deben ser de inmediato, caso contrario están expuestas a factores ambientales, que incrementan la mortalidad o la depredación. El comportamiento de las larvas neonatas puede ser variable, a veces es directo hacia la fruta, otras no se mueve o deambulan-merodean sin rumbo (Sutherland & Hutchins 1972). Este comportamiento de no moverse se contempla como un arresto en el movimiento de larvas (Knight & Light 2001, Hughes et al. 2003).

La elección de larvas neonatas entre los cultivares de membrillo, no mostró diferencias en casi todas las etapas fenológicas. Esto coincide con lo encontrado por Gómez et al. (2023), en donde las larvas neonatas no definieron una elección significativa entre cultivares de membrillo. Según lo hallado por Landolt et al. (2000), las larvas neonatas no discriminaron entre cultivares de manzano. Durante las etapas de crecimiento y maduración del membrillo, no se observaron diferencias significativas en la elección entre los diferentes cultivares. Esto podría deberse a la similitud de volátiles emitidos por cada cultivar. La preferencia de elección marcada en los cultivares INTA en etapa de frutos inmaduros, coincide con la oferta de kairomonas encontradas en el Capítulo 2. Sin embargo, en esta etapa la kairomona principal de las larvas, el (E,E)- α -Farneseno o el Éster de Pera, no estuvieron presentes. Por lo tanto, la preferencia podría estar siendo guiada por una mezcla y no por un compuesto específico. La menor elección por el cultivar Champion puede deberse a su composición volátil. Además de presentar menor oferta en proporción de compuestos atractivos, puede que alguno de ellos tenga efecto repelente para larvas. En poscúaje, el comportamiento de arresto fue mayor en comparación con otras etapas. En maduración el merodeo superó a los otros comportamientos. En cierta medida además de atracción, la presencia o aplicación de kairomonas en otras proporciones puede generar un arresto de las larvas neonatas y la interrupción en la localización del hospedero (Landolt et al. 1999, Hughes et al. 2003,

Light & Beck 2010, 2012, Gómez et al. 2023). La ocurrencia de arresto o merodeo en las larvas extiende el tiempo de exposición a condiciones desfavorables, aumentando la mortalidad y disminuyendo el riesgo de infestación (Knight & Light 2001, Hughes et al. 2003, Light & Beck 2012, Davis et al. 2013).

Ante lo analizado, se reunieron evidencias parcialmente a favor de la Hipótesis: “La respuesta de elección de las larvas neonatas de carpocapsa será distinta entre cultivares y las etapas fenológicas del membrillo”. Solo hubo diferencias en etapa de frutos inmaduros. No tener una preferencia entre cultivares u hospederos diferentes, puede ser una estrategia de supervivencia de las larvas neonatas. Además, Piskorski et al. (2010), señalan que las larvas de carpocapsa sintetizan sus propios carbohidratos independientemente del hospedero en el que se encuentren alimentándose. Las larvas neonatas no pueden elegir entre potenciales hospederos porque se desplazan solamente en distancias muy cortas y sobreviven en un breve periodo de tiempo sin alimentación (Jackson 1979, Martí Martí 2000). Por lo tanto, la selección del hospedero entre cultivares de membrillo queda limitado a las preferencias de las hembras de carpocapsa. Ante las respuestas de elección de oviposición de las hembras entre los diferentes cultivares, se reúnen evidencias en favor de la Hipótesis: “La predisposición del membrillo a ser atacado por carpocapsa es diferente entre cultivares”.

Se observó que, en etapa de crecimiento, coincidió la mayor respuesta de oviposición y la elección de cultivares por parte de las larvas neonatas de carpocapsa. En cada etapa fenológica planteada, todos los ensayos en laboratorio se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura, luz y humedad. En condiciones naturales, la etapa de crecimiento de los frutales de pepita ocurre en el verano. Según Blomefield & Giliomee (2011), observaron que la mayor oviposición se registró en el verano, con fluctuaciones de temperaturas más constantes en comparación con la primavera. Este comportamiento

de mayor oviposición, si bien coincide con lo encontrado en este trabajo, difiere en condiciones ambientales, ya que se realizó en laboratorio. Luego al finalizar la temporada del cultivo, la oviposición fue menor. Esto podría indicar una posible sincronización de las respuestas de la plaga, frente al *bouquet* de volátiles de la oferta fenológica.

Carpocapsa al elegir el sitio de oviposición, debe discriminar entre las opciones que asegurará su descendencia. Entre estas opciones también se presenta la elección frente a frutos infestados y que puedan distinguirlos mediante la información química volátil. Para esto se plantea el capítulo siguiente, en donde se presenta una caracterización de compuestos volátiles frente al daño por carpocapsa y la evaluación del comportamiento de oviposición y elección de larvas neonatas, entre frutos sanos e infestados.

3.5. Conclusión

En todas las etapas fenológicas, la elección de oviposición en las hojas fue mayor. El predominio de la oviposición en la superficie adaxial de las hojas coincide con la preferencia de *Cydia pomonella* por oviponer en superficies lisas. Los resultados de oviposición en hojas sugieren que este órgano debería ser de mayor interés de observación, al momento del monitoreo de la plaga en el cultivo de membrillo. Las preferencias de oviposición por el cultivar INTA 147, podrían estar indicando una posible mayor susceptibilidad a la infestación por carpocapsa. La menor respuesta de oviposición en la etapa de maduración podría estar indicando que la preferencia de la hembra de carpocapsa podría estar sincronizada con el ciclo y la disponibilidad del cultivo de membrillo. De acuerdo con lo observado en la etapa de fruto inmaduro y fruto en crecimiento, en estas etapas de mayor preferencia de la plaga, se deberían reforzar las técnicas de monitoreo de la plaga, para su control en campo. Sería interesante investigar

en profundidad qué volátiles o mezclas de lo encontrado en etapa de poscuaje pueden generar arresto en larvas como uso estratégico en control.

CAPÍTULO 4

Volátiles de membrillo infestados por carpocapsa. Oviposición de hembras y elección de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados.

4.1. Introducción

Las plantas en un contexto natural emiten diferentes cantidades de compuestos orgánicos volátiles al medioambiente. Los insectos al alimentarse de las plantas pueden inducir por herbivoría cambios en la proporción y composición de los volátiles (Dicke & A van Loon 2000, Dudareva et al. 2013, Bruce 2015). Al conjunto se le denomina volátiles vegetales inducidos por herbívoros (del inglés Herbivoría Induced Plant Volatiles - HIPVs) (Bruce 2015). Estos volátiles también participan en la mediación de las interacciones multitróficas entre plantas e insectos (Dicke & A van Loon 2000, Hare 2011). La emisión de estos volátiles en respuesta a la herbivoría es un fenómeno altamente dinámico y puede variar considerablemente por inducción por herbivoría y en relación con el ciclo diurno-nocturno (Dudareva et al. 2006).

Los volátiles inducidos por herbivoría, pueden afectar a individuos de la misma especie, atrayéndolos o repeliéndolos (Dicke & A van Loon 2000). También pueden tener un efecto positivo al mediar en las interacciones entre las plantas inducidas por los herbívoros y los enemigos naturales de los herbívoros (Dudareva et al. 2013, Bruce 2015). La mayoría de las investigaciones sobre los volátiles de las plantas inducidos por herbívoros se han centrado en los insectos filófagos, es decir, aquellos que se alimentan de las hojas de las plantas. Sin embargo, los estudios que exploran los efectos químicos desencadenados por los insectos carpófagos, que se alimentan de los frutos de las plantas, son menos frecuentes (Hern & Dorn 2002). Se ha demostrado que la infestación de carpocapsa en frutos de manzano, genera la emisión en mayor proporción del (E,E)- α -Farneseno y del (E)- β -Ocimeno (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002). También se ha demostrado la inducción del (E,E)- α -Farneseno en frutos de membrillo (López et al. 2022). Se ha encontrado mediante olfatometría, que los frutos infestados de manzano atraen a hembras y a larvas neonatas de carpocapsa (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn

2002, Reed & Landolt 2002). Como la mayoría de las investigaciones en comportamiento se han realizado en manzano, su hospedero principal, todavía quedan algunos interrogantes acerca de la interacción con el membrillo. Debido a esto, en el presente capítulo, el objetivo fue determinar si el perfil de compuestos volátiles en el membrillo cambiaba en respuesta a la infestación por carpocapsa. Luego se determinó la respuesta de oviposición y de elección de larvas neonatas de carpocapsa, frente a frutos sanos e infestados del membrillo.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Determinación de volátiles de membrillo expuestos al daño por carpocapsa

Para la determinación de volátiles de membrillo expuestos al daño por carpocapsa, se utilizaron los mismos cultivares que en el apartado 2.2.1. Para garantizar el daño, se dejó que el material vegetal en el campo esté expuesto a la infestación de carpocapsa durante todo el ciclo fenológico. La caracterización de volátiles se realizó con membrillos del cultivar Champion en etapa de crecimiento y maduración. Estas etapas fenológicas fueron propuestas, debido a que en infestaciones tempranas por carpocapsa los frutos se caen de la planta. Con frutos en etapa de crecimiento y maduración, al ser de mayor tamaño, se garantizó que permanecieran infestados en la planta hasta finalizar incluso el ciclo del cultivo. Se evidenció infestación en los frutos cuando presentaron orificios y galerías de ingreso de larvas de carpocapsa.

Para analizar si el perfil de volátiles cambia con la exposición a carpocapsa, se tomó una muestra de frutos infestados y hojas expuestas a la plaga. Las hojas con exposición no corresponden a material dañado por herbivoría de larvas, pero sí a la oviposición. El perfil de volátiles expuestos a la plaga se comparó con el perfil de volátiles sin exposición (información obtenida en el capítulo 2). Las muestras de material con y sin exposición a

la plaga, se tomaron el mismo día, entre las 17:00 y 18:00 de la tarde. Al día siguiente se procedió con la metodología de extracción, el análisis y la identificación general de volátiles. Para la extracción de compuestos volátiles del material expuesto a la plaga se siguió la metodología propuesta en el apartado 2.2.3. Las muestras se acondicionan de una por vez en viales y una vez realizada la extracción con la fibra se procede al análisis general de volátiles propuesto en el apartado 2.2.4. Posteriormente al análisis por GC-MS, se procedió a la identificación de los volátiles indicada en el apartado 2.2.5.

Se realizó el análisis multivariado de componentes principales para analizar la relación entre grupos químicos de volátiles y los cultivares. Para analizar en forma particular la diferencia de proporción de algunos compuestos entre sano e infestado, se utilizó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar. Luego se realizó la prueba no paramétrica de Friedman con $p < 0,05$. Los análisis se realizaron con el programa InfoStat versión 2020p.

4.2.2. Preferencia de oviposición de hembras fecundadas entre frutos sanos e infestados

En este objetivo se evaluó la preferencia de oviposición de hembras fecundadas entre frutos sanos e infestados por carpocapsa. Para ello se dio a elegir a hembras fecundadas de carpocapsa, entre frutos sanos e infestados del cultivar Champion. Se eligió este cultivar ya que es el más cultivado a nivel nacional y también es reconocido a nivel mundial.

Los frutos sanos se obtuvieron mediante la protección con una bolsa tipo *voile* como se describió en el apartado 2.2.1. Los frutos infestados utilizados en este objetivo corresponden a parte del material que se dejó expuesto a ser atacado por carpocapsa. Se dejaron expuestos a la plaga durante todo el ciclo fenológico. Se verificó el daño en los frutos, por la presencia de orificios de entrada, aserrín y galerías internas que progresaron

hasta las semillas. Los frutos infestados se cortaron en etapa de maduración. En esta etapa, al ser frutos más grandes, se garantiza que todavía estén en la planta aún infestados. Los frutos se utilizaron sin cortar, ni lavar y con la pubescencia intacta.

En un contenedor plástico de 14000 cm³, se colocó un fruto sano y otro infestado por carpocapsa. Se quitaron las hojas para evitar que sus emisiones de volátiles interfirieran en la elección. Al lado de cada fruto se colocó una placa de vidrio transparente cuadrado de 10 cm² de dimensión. Se eligió el vidrio ya que las hembras prefieren oviponer en superficies lisas. Cada contenedor se mantuvo tapado con tela *voile*, para permitir el ingreso de aire y luz (Figura 4.1). Se utilizaron 12 repeticiones.



Figura 4.1. Representación del ensayo de oviposiciones sobre frutos sanos e infestados por carpocapsa en el cultivar Champion.

En cada contenedor se ingresaron 4 parejas de adultos de carpocapsa de un día de edad, y se las dejó con una fuente de agua durante cuatro días. En este periodo las parejas copularon y luego las hembras comenzaron a oviponer. Luego se retiraron las placas de vidrio y se realizó el conteo del número de huevos puestos correspondientes a cada estado de fruto (sano/infestado).

Para analizar la preferencia de oviposición entre estado de fruto sano e infestado, los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de Friedman con $p < 0,05$, con el programa InfoStat versión 2020p.

4.2.3. *Dual-Choice* de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados

En este objetivo se evaluó la preferencia de elección de las larvas neonatas entre frutos sanos e infestados por carpocapsa. Se utilizaron frutos del cultivar Champion sanos e infestados cosechados en etapa de maduración.

De manera similar al apartado 3.2.2, se repitió la metodología para el ensayo de doble elección (*dual-choice*). Se quitaron las hojas para evitar que sus emisiones de volátiles interfieran en la elección. Se dió a elegir de a una larva neonata por vez, entre un fruto sano frente a uno infestado. Se testearon 45 larvas y se registró la elección final y el tiempo que tardaron en realizarla, de un tiempo total de observación de 600 segundos. También se registraron comportamientos de merodeo y el merodeo hacia alguna de las frutas ofrecidas o elección centro fueron considerados “arresto”. Cada cinco larvas testeadas se reemplazó la fruta y se cambió el papel de filtro.

Los datos de las preferencias de elección entre fruta sana e infestada y los distintos comportamientos se analizaron por una prueba de Chi cuadrado de Bondad de Ajuste con $p < 0,05$, con el programa InfoStat versión 2020p. El tiempo de elección fue analizado mediante la prueba de Wilcoxon (Mann-Whitney U) con $p < 0,05$, con el programa InfoStat versión 2020p.

4.3. Resultados

4.3.1. Caracterización del perfil de compuestos volátiles de membrillo sano e infestado

A continuación, se detalla por apartado, la caracterización del perfil de compuestos volátiles en etapa de crecimiento y maduración. Se compara el perfil de volátiles en los frutos sanos vs. infestados y en las hojas sin y con exposición a la plaga. En forma general, se identificaron grupos químicos como Hidrocarburos (alcanos y alquenos: HC), Tioles (TI), Alcoholes (AL), Aldehídos (AH), Cetonas (CT), Ácidos Orgánicos (AC), Ésteres (ES), compuestos con un anillo aromático (AR), Norisoprenoides (N), Monoterpenos (MT) y Sesquiterpenos (SQ). De estos grupos químicos, algunos compuestos no fueron detectados (nd) en las muestras de frutos y hojas de todos los cultivares. Para todas las etapas se logró una identificación entre el 81,14% y 99,97% del área total de los cromatogramas.

4.3.1.1. Perfil general de volátiles en etapa de crecimiento

De las muestras de frutos sanos e infestados de todos los cultivares recolectados en etapa de crecimiento, se observó que la mayor proporción de compuestos volátiles, corresponden al grupo de alcoholes (Cuadro 4.1). En este grupo se identificaron nueve compuestos diferentes. En los cultivares Champion e INTA 147, la proporción de alcoholes fue mayor en frutos sanos. El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 83,87% hasta un 99,97%. En el caso de las muestras de hojas sin exposición y con exposición a carpocapsa la mayor proporción de compuestos corresponden a los monoterpenos (Cuadro 4.2). Se identificaron catorce monoterpenos entre todos los cultivares y estados. La proporción de monoterpenos fue menor en las hojas que estuvieron expuestas a la plaga. El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 83,39% hasta un 98,97%.

Cuadro 4.1: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos vs. infestados de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		S	I	S	I	S	I	S	I
Alcoholes	9	68,81	35,62	47,62	11,35	67,71	81,34	86,08	83,28
Hidrocarburos	12	3,55	9,34	19,34	55,08	17,34	7,95	1,58	0,37
Ésteres	17	11,60	31,29	7,21	2,50	3,57	3,85	5,69	3,43
Norisoprenoides	2	2,81		17,36	6,67	1,09	1,68	0,11	-
Sesquiterpenos	3	0,79	2,47	0,91	20,32	0,21	3,54	0,02	0,13
Aldehídos	4	1,43	1,37	0,66	0,51	0,83	1,12	0,74	4,27
Monoterpenos	2	0,79	0,72	3,57	0,46	0,54	0,27	0,35	0,94
Tioles	1	1,44	2,58	0,10	-	0,40	-	-	-
Aromáticos	2	0,12	0,48	0,07	0,12	0,80	0,12	0,05	0,38
%Área total identificada		91,36	91,36	83,87	96,84	97,02	92,48	99,87	94,63

S: Frutos sanos. I: Infestados. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

Cuadro 4.2: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		NE	E	NE	E	NE	E	NE	E
Monoterpenos	14	0,63	0,43	59,71	39,49	61,19	58,79	70,83	56,71
Aldehídos	7	0,38	0,08	18,62	48,49	21,44	27,14	16,82	12,64
Hidrocarburos	13	41,61	83,73	0,49	0,22	0,31	0,32	0,80	0,93
Aromáticos	6	0,32	5,73	14,22	7,90	12,32	8,57	7,04	10,39
Alcoholes	7	8,99	0,36	2,46	2,06	2,13	1,97	2,37	1,92
Cetonas	1	-	-	0,44	0,36	0,44	0,40	0,35	0,46
Ésteres	9	38,93	3,08	0,70	0,40	0,75	0,53	0,40	0,33
Tioles	1	0,11	-	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos	1	0,35	0,03	0,05	0,01	0,01	-	0,01	-
Ácidos	1	-	-	0,07	0,03	0,09	0,05	0,04	-
%Área total identificada		91,31	91,31	93,44	96,76	98,97	98,68	97,78	98,65

NE: Hojas no expuestas, E: Expuestas. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

El análisis de componentes principales en base a la relación entre los grupos químicos y frutos sanos e infestados explicó el 65% de la variabilidad total (Figura 4.2). En el

primer componente del análisis, los hidrocarburos y sesquiterpenos son mayoritarios en frutos infestados del cultivar INTA 37. En correlación opuesta, los alcoholes fueron mayoritarios en los frutos infestados de los cultivares INTA 147 e INTA 117. En el segundo componente, los monoterpenos y norisoprenoides predominaron en frutos sanos del cultivar INTA 37. Los frutos sanos del cultivar INTA 147 y los infestados del INTA 117 son más similares entre sí en relación con sus grupos químicos. Los frutos infestados del cultivar INTA 37 y del INTA 147 son los más disímiles entre sí, teniendo en cuenta la composición por grupos químicos.

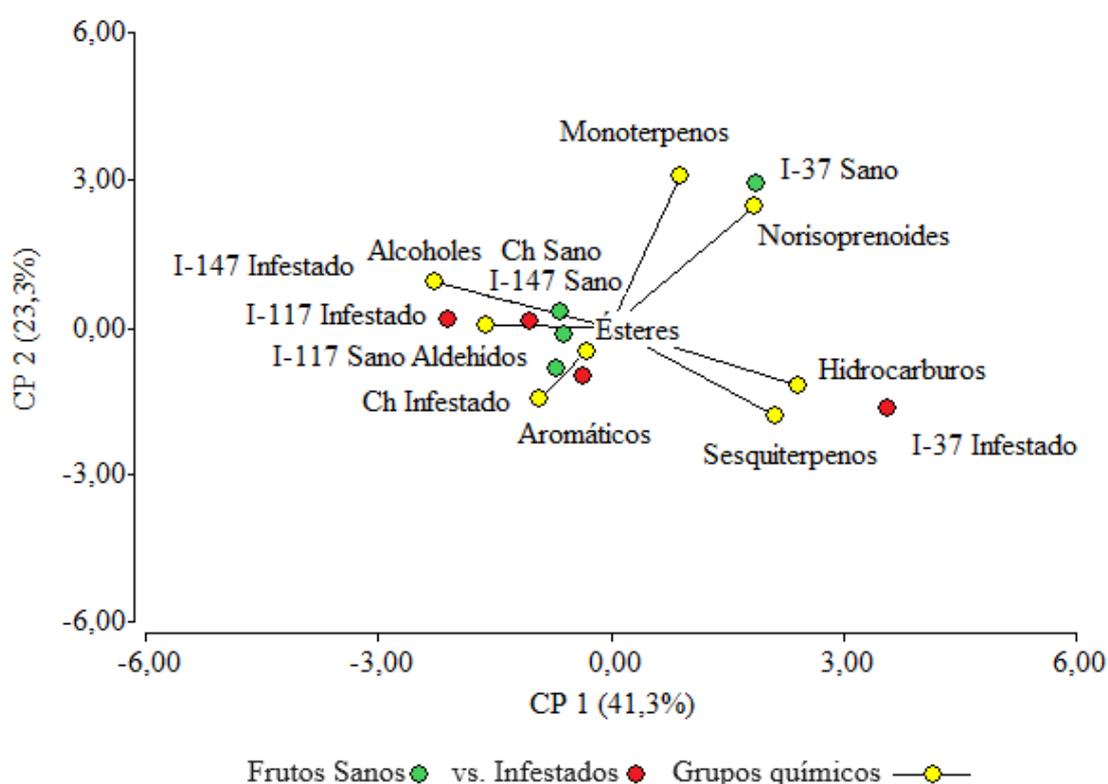


Figura 4.2. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en frutos sanos e infestados de cuatro cultivares de *C. oblonga* en crecimiento. En verde se representa lo sano, en rojo lo infestado y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

El análisis de componentes principales en base a la relación entre los grupos químicos y hojas no expuestas y expuestas explicó el 89% de la variabilidad total (Figura 4.3). En el primer componente del análisis, las cetonas, monoterpenos y aromáticos fueron mayoritarios en las hojas no expuestas y expuestas de los cultivares INTA y los ésteres y

sesquiterpenos en hojas no expuestas del cultivar Champion. En el segundo componente, los alcoholes fueron mayoritarios en las hojas no expuestas y los hidrocarburos en las expuestas, del cultivar Champion. Hay mayor similitud de composición química en las hojas no expuestas entre los cultivares INTA 117 e INTA 147. La menor similitud entre grupos químicos se dio entre las hojas no expuestas del cultivar Champion y el INTA 117.

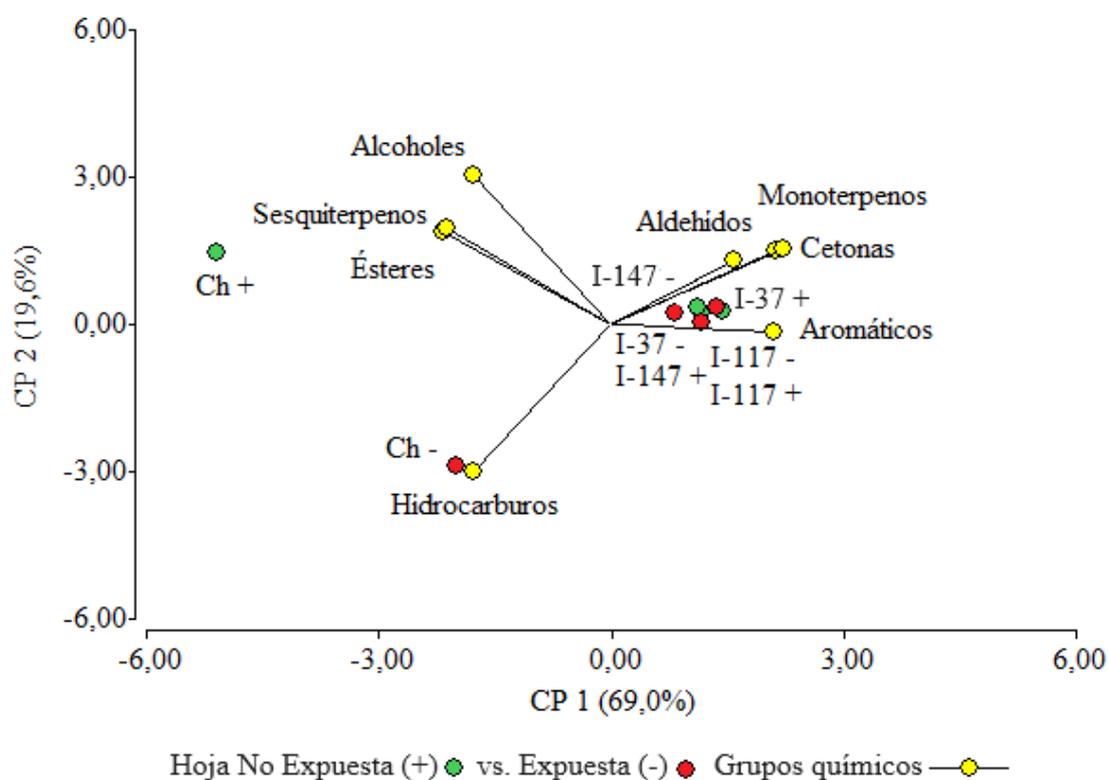


Figura 4.3. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas de cuatro cultivares de *C. oblonga* en crecimiento. En verde se representa lo no expuesto, en rojo lo expuesto y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

Análisis del perfil de volátiles por cultivares

Los frutos sanos e infestados del cultivar Champion presentaron el perfil de volátiles más variado en comparación con el cultivar INTA 147 (Cuadro 4.3). Lo opuesto ocurrió en las hojas no expuestas y expuestas del cultivar Champion, con un perfil de volátiles menos variado (Cuadro 4.4). En el cultivar INTA 37, el (E,E)- α -Farneseno presentó la mayor proporción en frutos dañados, con un 19,91% (Cuadro 4.3). En el cultivar INTA

147, el Limoneno se presentó en mayor proporción en las hojas no expuestas, con un 40,18%. El (E,E)- α -Farneseno se presentó en las hojas de algunos cultivares en proporciones trazas y solo fue mayoritario en el cultivar Champion con un 0,35% en hojas no expuestas. El Nonanal y Octanal fueron mayoritarios en las hojas no expuestas del cultivar INTA 147, con proporciones de 0,82% y 0,94% respectivamente (Cuadro 4.4).

Análisis del perfil de volátiles del membrillo expuesto a carpocapsa

Con el fin de analizar el cambio en el perfil de volátiles del cultivo del membrillo expuesto a carpocapsa, se usó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar.

Para analizar cambios en el perfil de frutos sanos e infestados, se logró una identificación de cincuenta y dos compuestos volátiles diferentes entre todos los cultivares (Cuadro 4.3). Al observar el perfil entre sano e infestado, la proporción de kairomonas aumentó con la infestación de carpocapsa en todos los cultivares. El (E,E)- α -Farneseno fue el único compuesto que tuvo un cambio consistente en todos los cultivares, aumentando significativamente la proporción en los frutos infestados (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.4). Respecto al Limoneno en frutos dañados, se observó un aumento en proporción sin diferencias significativas en todos los cultivares. De los compuestos con actividad electroantenográfica para hembras, se presentaron el (Z)-3-Hexenol, Acetato de (Z)-3-Hexenol, Acetato de Hexilo y (E)- β -Ocimeno, pero sin cambios significativos entre frutos sanos e infestados.

En el perfil de hojas no expuestas y expuestas se logró una identificación de sesenta compuestos volátiles entre todos los cultivares (Cuadro 4.4). El grupo de kairomonas se presentó en menor proporción en las hojas expuestas de todos los cultivares. El Limoneno tuvo un cambio consistente en todos los cultivares, disminuyendo significativamente la

proporción en las hojas expuestas (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.4). Se presentaron compuestos con actividad electroantenográfica como el (Z)-3-Hexenol, 2-Hexenal, Benzaldehído, β -Pinoeno, 6-Metil-5-Hepten-2-ona, β -Mirceno, Acetato de (Z)-3-Hexenol, Octanal, (E)- β -Ocimeno, Nonanal y Decanal, pero la mayoría sin diferencias significativas entre hojas no expuestas y expuestas. De este grupo, el Nonanal y Octanal se presentaron significativamente en menor proporción en las hojas expuestas (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.4). Ambos compuestos fueron mayoritarios en las hojas no expuestas del cultivar INTA 37, con proporciones de 0,82% y 0,94% respectivamente (Cuadro 4.4).

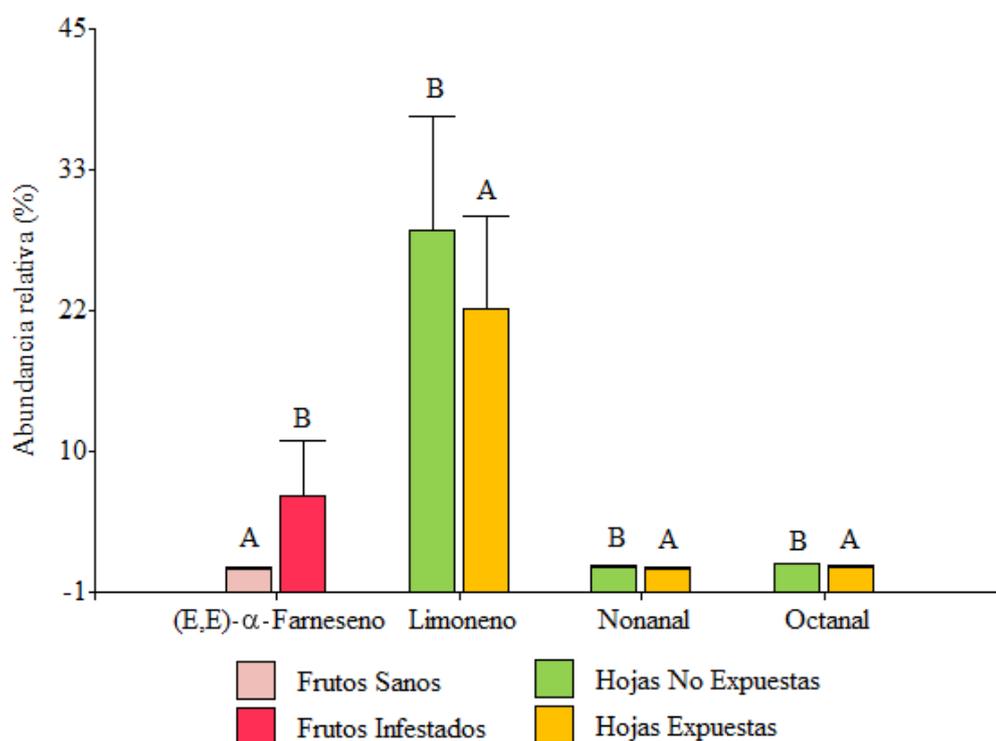


Figura 4.4. Abundancia relativa porcentual del (E,E)- α -Farneseno en frutos sanos e infestados. Abundancia relativa porcentual del Limoneno, Nonanal y Octanal en Hojas No Expuestas y Expuestas. Se usó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar, en etapa de crecimiento. Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; análisis de varianza de Friedman).

Cuadro 4.3: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos e infestados por carpocapsa, de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares								
				Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147		
				Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado	
1	Etanotiol	TI	1,70	528	1,44	2,58	0,10	nd	0,40	nd	nd	nd
2	Hexano	HC	1,91	601	1,53	5,10	19,18	54,85	16,35	7,26	1,00	nd
3	Benceno	AR	2,30	660	nd	0,26	nd	nd	0,62	nd	nd	nd
4	2-metil-2-butenal	AH	3,17	742	0,26	0,49	0,17	0,38	0,26	0,36	0,13	1,13
5	Tolueno	AR	3,64	756	0,12	0,22	0,07	0,12	0,18	0,12	0,05	0,38
6	Hexanal	AH	4,31	795	0,69	0,44	0,49	0,13	0,56	0,76	0,61	3,04
7	(Z)-3-Hexenol (EAG+)	AL	6,10	840	11,36	5,64	8,21	2,58	6,38	9,54	19,40	21,65
8	1-hexanol	AL	6,74	860	56,80	26,62	37,29	7,10	56,87	68,36	66,68	61,63
9	Nonano	HC	8,20	910	nd	0,57	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	Tiglato de etilo	ES	10,46	921	0,26	0,25	0,66	0,25	0,19	0,22	0,11	0,06
11	Hexanoato de etilo	ES	15,16	973	0,29	0,42	0,80	0,26	0,17	0,10	0,14	0,09
12	Acetato de (Z)-3-Hexenol (EAG+)	ES	15,63	984	2,98	0,58	3,14	0,13	0,41	0,76	3,18	1,06
13	Acetato de Hexilo (EAG+)	ES	16,34	991	0,81	0,10	0,63	0,02	0,12	0,21	0,59	0,25
14	Limoneno (K/EAG+)	MT	17,50	1017	0,38	0,46	0,15	0,32	0,47	0,23	0,26	0,76
15	2-etil-1-hexanol	AL	17,89	1018	0,33	nd	0,07	nd	nd	0,10	nd	nd
16	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,48	1034	0,42	0,26	3,41	0,14	0,07	0,04	0,09	0,18
17	2,4-dimetil-Decano	HC	25,01	1086	nd	nd	nd	nd	0,49	nd	nd	nd
18	Undecano	HC	25,45	1095	nd	nd	nd	nd	nd	0,26	0,26	0,16
19	(Z)-2-nonen-1-ol	AL	32,36	1172	nd	nd	1,64	1,37	4,07	2,98	nd	nd

Cuadro 4.3. Continuación.

20	Salicilato de Metilo (EAG+)	ES	33,61	1174	0,33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
21	(Z)-4-octenoato de etilo	ES	33,86	1190	nd	0,13	nd	nd	nd	nd	0,08	0,03
22	Octanoato de etilo	ES	34,38	1197	nd	nd	0,10	0,11	nd	nd	nd	nd
23	5-etil-5-metil-Decano	HC	34,57	1198	nd	nd	0,01	0,00	0,17	0,10	0,07	nd
24	Decanal	AH	34,73	1200	0,22	0,29	nd	nd	nd	nd	nd	0,10
25	Teaspirano Z o E	N	38,19	1298	2,30	nd	8,92	3,39	0,41	0,85	0,01	nd
26	Tridecano	HC	38,44	1300	0,18	0,07	0,04	0,04	0,05	0,05	0,03	nd
27	Teaspirano Z o E	N	38,74	1308	0,51	nd	8,44	3,28	0,68	0,83	0,10	nd
28	Éster isobutílico del ácido 2,2,4-trimetil-3-isopropilcarboxipentanoico	ES	39,74	1331	0,12	0,14	nd	nd	nd	nd	nd	nd
29	4,8-dimetil-3,7-nonadien-2-ol	AL	40,00	1349	nd	nd	0,21	0,18	0,31	0,27	nd	nd
30	Éster del ácido 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil)propil 2-metil-propanoico	ES	40,41	1353	0,17	0,27	nd	nd	nd	nd	nd	nd
31	(Z)-3-Tetradeceno	HC	41,07	1391	0,25	0,34	0,08	0,13	0,15	0,10	0,16	0,07
32	Tetradecano	HC	41,30	1399	0,13	0,24	0,03	0,06	0,14	0,08	nd	0,14
33	Dodecanal	AH	41,47	1402	0,26	0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	(Z)- β -Farneseno	SQ	41,70	1418	nd	nd	0,05	0,01	nd	nd	nd	nd
35	Dihidro- β -ionona	SQ	42,05	1428	nd	nd	0,27	0,40	0,14	0,19	nd	nd
36	trans-2-dodecen-1-ol	AL	42,26	1440	nd	nd	0,19	0,12	0,08	0,09	nd	nd
37	(E,E)-α-Farneseno (K/EAG+)	SQ	43,70	1502	0,79	2,47	0,59	19,91	0,07	3,35	0,02	0,13
38	2-hexil-1-octanol	AL	44,77	1560	nd	0,65	nd	nd	nd	nd	nd	nd
39	3,7,11-trimetil-1-dodecanol	AL	45,01	1564	nd	0,24	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40	Éster isobutílico del ácido 2,2,4-trimetil-3-carboxiisopropilpentanoico	ES	45,47	1586	2,53	10,42	nd	nd	0,12	nd	nd	nd
41	(Z)-7-hexadeceno	HC	45,61	1590	nd	nd	nd	nd	nd	0,10	nd	nd

Cuadro 4.3. Continuación.

42	Hexadecano	HC	45,76	1600	0,60	1,63	nd	nd	nd	nd	nd	nd
43	Éster del ácido alil octil oxálico	ES	46,99	1660	0,72	5,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd
44	ciclotetradecano	HC	47,26	1673	nd	0,43	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45	Éster bis(2-metilpropílico) del ácido hexanodioico	ES	47,35	1663	nd	nd	0,07	nd	0,08	0,04	nd	nd
46	Éster ciclohexilmetil isobutílico del ácido sulfuroso	ES	47,59	1694	2,59	3,61	1,88	1,73	2,49	2,52	1,52	1,94
47	Éster del ácido alil nonil oxálico	ES	47,74	1701	0,81	6,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
48	2-hexilo-1-decanol	AL	48,87	1764	0,32	2,21	nd	nd	nd	nd	nd	nd
49	Éster del ácido isobutil nonil oxálico	ES	49,02	1772	nd	0,66	nd	nd	nd	nd	nd	nd
50	Octadecano	HC	49,55	1801	0,87	0,96	0,06	nd	nd	nd	nd	nd
51	Miristato de isopropilo	ES	49,94	1823	nd	2,38	nd	nd	nd	nd	nd	nd
52	Éster del ácido alil decil oxálico	ES	50,28	1840	nd	1,26	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área relativa total					91,36	83,62	96,84	97,02	92,48	99,87	94,63	92,79
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado
Frecuencia de Kairomonas (K)					2	2	2	2	2	2	2	2
Proporción de Kairomonas					1,17	2,93	0,75	20,23	0,54	3,58	0,29	0,89
Frecuencia de compuestos EAG+					8	7	6	6	6	6	6	7
Proporción de compuestos EAG+					17,28	9,79	16,15	23,10	7,52	14,13	23,54	24,13

Grupos químicos, TI: Tiol, HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; N: Norisoprenoide; CT: Cetona, SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantenográfica en hembras de carpocapsa.

Cuadro 4.4: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares									
			Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147			
			NE	E	NE	E	NE	E	NE	E		
1	2-metil-pentano	HC	1,50	556	nd	0,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	Etanotiol	TI	1,72	559	0,11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	Hexano	HC	1,95	607	40,27	82,46	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	Benceno	AR	2,33	660	nd	5,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	(E)-2-pental	AH	3,61	756	nd	nd	nd	nd	nd	0,11	nd	nd
6	Tolueno	AR	3,66	756	0,32	0,61	9,36	4,63	7,95	4,76	3,82	6,83
7	3-metil-2-butenal	AH	4,22	791	nd	nd	0,19	0,12	0,19	0,18	0,07	0,1
8	Hexanal	AH	4,34	795	0,29	nd	3,49	3,07	3,91	3,18	2,34	2,01
9	Ciclofencheno	MT	5,30	823	nd	nd	nd	0,01	nd	1,19	nd	nd
10	Éster metílico del ácido 3-metil-2-butenico	ES	6,09	844	nd	nd	0,18	0,11	0,15	0,19	0,17	0,10
11	(Z)-3-Hexenol (EAG+)	AL	6,12	844	7,21	nd	0,18	0,12	0,15	0,19	0,17	0,10
12	2-Hexenal (EAG+)	AH	6,36	851	nd	nd	4,20	3,41	6,46	10,63	6,45	3,25
13	Hexanol	AL	6,71	859	1,52	0,36	0,57	0,35	0,51	0,52	0,45	0,34
14	m-Xileno	AR	7,10	869	nd	nd	3,35	2,33	3,10	2,64	2,21	2,41
15	Éster 2-metilpropílico del ácido 2-propenoico	ES	7,96	890	0,26	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
16	p-Xileno	AR	8,19	898	nd	nd	1,09	0,69	0,98	0,90	0,72	0,81
17	Heptanal	AL	8,68	913	nd	nd	0,47	0,38	0,51	0,43	0,40	0,35

Cuadro 4.4. *Continuación.*

18	(E,E)-2,4-Hexadienal	AL	9,12	909	nd	nd	0,08	0,05	0,05	0,11	0,04	0,05
19	Anisol	AR	9,50	914	nd	nd	0,28	0,20	0,23	0,20	0,20	0,23
20	Cumeno	AR	10,01	919	nd	nd	0,15	0,05	0,06	0,07	0,08	0,12
21	α -Tujeno	MT	10,28	920	nd	nd	0,80	0,44	0,66	0,81	0,53	0,58
22	α -Pineno	MT	10,66	927	nd	nd	1,99	1,36	1,63	2,50	1,45	1,53
23	Canfeno	MT	11,59	938	nd	nd	0,54	0,32	0,39	0,86	0,35	0,40
24	Benzaldehído (EAG+)	AH	12,21	945	0,09	0,08	10,33	41,65	10,48	12,89	7,06	6,37
25	β-Pineno (EAG+)	MT	13,66	961	0,02	0,03	3,16	2,21	3,21	3,61	2,63	2,55
26	2-metil propil 2-metil 2-butenato	ES	14,27	967	nd	nd	0,10	0,07	0,07	0,09	0,11	0,10
27	6-Metil-5-Hepten-2-ona (EAG+)	CT	14,73	973	nd	nd	0,44	0,36	0,44	0,40	0,35	0,46
28	β-Mirceno (EAG+)	MT	15,19	978	0,12	0,13	5,49	3,83	6,00	5,35	7,41	5,50
29	3-metil-nonano	HC	15,30	980	0,12	0,13	nd	nd	nd	nd	nd	nd
30	Acetato de (Z)-3-Hexenol (EAG+)	ES	15,67	984	36,89	0,37	0,31	0,17	0,25	0,18	0,04	0,07
31	Octanal (EAG+)	AL	16,06	989	nd	nd	0,84	0,52	0,72	0,53	0,94	0,78
32	α -Terpineno	MT	17,19	1002	nd	nd	1,49	0,83	1,27	1,06	1,77	1,55
33	Limoneno (K/EAG+)	MT	17,51	1017	0,30	0,26	34,16	22,55	38,86	34,70	40,18	30,08
34	2-etil-1-hexanol	AL	18,77	1018	0,19	nd	0,32	0,64	0,18	0,19	0,37	0,30
35	o-Cimeno	MT	17,89	1020	nd	nd	6,41	4,18	5,79	5,20	6,30	5,62
36	Ácido (E)-2-hexenoico	AC	19,139	1022	nd	nd	0,07	0,03	0,09	0,05	0,04	nd
37	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,53	1035	0,18	0,01	0,56	0,32	0,44	0,46	0,90	0,69
38	2-hexenoato de etilo	ES	20,21	1036	nd	nd	0,12	0,06	0,13	0,07	0,08	0,06
39	3,7-dimetil-1,3,7-Octatrieno	HC	20,60	1040	nd	nd	0,18	0,09	0,09	0,13	0,41	0,30
40	γ -Terpineno	MT	21,40	1050	nd	nd	1,98	1,11	1,51	1,52	3,15	2,36

Cuadro 4.4. *Continuación.*

41	p-menta-1,4(8)-dieno	HC	24,50	1085	nd	nd	0,31	0,13	0,22	0,19	0,39	0,32
42	2,4-dimetil-Decano	HC	24,99	1086	0,38	0,24	nd	nd	nd	nd	nd	nd
43	Undecano	HC	25,46	1090	0,16	0,11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
44	(E)-Tujona	MT	26,222	1104	nd	nd	0,13	0,07	0,05	0,05	0,13	nd
45	Nonanal (EAG+)	AH	26,65	1109	nd	nd	0,40	0,24	0,36	0,15	0,82	0,72
46	Isomentona	MT	31,66	1167	nd	nd	2,84	2,12	1,35	1,44	5,55	5,12
47	Butanoato de (Z)-4-hexen-1-ilo	ES	33,72	1176	0,10	nd						
48	1-dodeceno	HC	34,10	1193	0,14	0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd
49	5-etil-5-metil-Decano	HC	34,57	1198	0,17	0,11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
50	Decanal (EAG+)	AH	34,73	1204	nd	nd	0,01	nd	0,04	0,00	0,07	0,19
51	Pulegona	MT	36,46	1248	nd	nd	0,16	0,14	0,03	0,04	0,48	0,74
52	Tridecano	HC	38,44	1300	0,07	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	0,06
53	(Z)-3-Tetradeceno	HC	41,07	1391	0,30	0,26	nd	nd	nd	nd	nd	nd
54	6-etil-2-metil-decano	HC	41,81	1418	nd	0,08						
55	(E,E)-α-Farneseno (K/EAG+)	SQ	43,70	1502	0,35	0,03	0,05	0,01	0,01	nd	0,01	nd
56	Tridecan-1-ol	AL	45,61	1596	0,07	nd						

Cuadro 4.4. *Continuación.*

57	Éster bis(2-metilpropílico) del ácido Hexanodioico	ES	47,36	1660	nd	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd
58	Éster ciclohexilmetil isobutílico del ácido sulfuroso	ES	47,59	1694	1,68	2,66	nd	nd	nd	nd	nd	nd
59	Octadecano	HC	49,55	1801	nd	nd	nd	0,17	nd	nd	nd	nd
60	Éster del ácido mono(2-etilhexil) Hexanodioico	ES	50,33	1845	nd	nd	nd	nd	0,15	0,00	nd	nd
Área relativa total					91,31	93,44	96,76	98,97	98,68	97,78	98,65	83,38
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					NE	E	NE	E	NE	E	NE	E
Frecuencia de Kairomonas (K)					2	2	2	1	2	1	2	2
Proporción de Kairomonas					0,65	0,29	34,22	22,56	38,86	34,70	40,18	30,08
Frecuencia de compuestos EAG+					7	6	12	11	12	11	12	11
Proporción de compuestos EAG+					44,98	0,90	59,56	75,07	66,98	68,64	66,14	50,06

Grupos químicos, TI: Tiol, HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; N: Norisoprenoide; CT: Cetona, SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantagráfica en hembras de carpocapsa. Hojas no expuestas: NE y expuestas E.

4.3.1.2. Perfil general de volátiles en etapa de Maduración

De las muestras de frutos sanos e infestados de todos los cultivares recolectados en etapa de maduración, se observó que la mayor proporción de compuestos volátiles, corresponden al grupo de ésteres y de hidrocarburos (Cuadro 4.5). En el grupo de ésteres se identificaron once compuestos diferentes, presentándose en proporciones de 7,18% y 29,59%. La proporción de ésteres fue mayor en los frutos infestados de todos los cultivares. Del grupo de hidrocarburos se presentaron cuatro compuestos diferentes, con proporciones de 18,02% y 28,40%. La proporción de hidrocarburos fue mayor en frutos infestados de los cultivares Champion e INTA 37. El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 86,12% hasta un 96,13%.

Cuadro 4.5: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos vs. infestados de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		S	I	S	I	S	I	S	I
Ésteres	11	9,66	29,59	7,18	9,82	19,25	24,22	22,46	22,74
Hidrocarburos	4	18,02	27,27	14,52	21,84	28,40	19,13	24,33	21,34
Monoterpenos	4	9,50	9,84	28,83	22,79	8,55	15,42	4,36	8,16
Norisoprenoides	2	14,14	1,99	0,54	0,80	20,44	20,53	33,75	28,34
Sesquiterpenos	3	24,99	2,16	17,89	5,17	4,73	2,42	0,72	1,73
Aldehídos	5	3,31	11,11	12,78	5,92	7,29	6,53	4,84	5,49
Alcoholes	4	5,43	8,13	12,16	8,59	4,74	6,02	4,22	6,45
Aromático	2	1,06	1,65	0,97	1,45	1,43	0,90	0,98	0,85
Tioles	1	-	-	-	17,07	0,52	-	0,47	-
%Área total identificada		86,12	91,75	94,86	93,45	95,34	95,17	96,13	95,11

S: Frutos sanos. I: Infestados. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

En el caso de las muestras de hojas sin exposición y con exposición a carpocapsa la mayor proporción de compuestos corresponden a los monoterpenos y alcoholes (Cuadro 4.6). Se identificaron once monoterpenos entre todos los cultivares y estados, con proporciones de 45,09% y 73,42%. La proporción de monoterpenos fue menor en las

hojas que estuvieron expuestas a la plaga. Del grupo de alcoholes se presentaron seis compuestos diferentes con proporciones de 19,15% y 41%. La proporción de alcoholes aumentó en las hojas expuestas en todos los cultivares. El área total identificada entre todos los cultivares varió desde un 98,29% hasta un 99,35%.

Cuadro 4.6: Principales grupos químicos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en crecimiento. Determinado por HS-SPME y GC/MS. La abundancia corresponde a la suma de todos los compuestos según su grupo químico.

Grupos químicos	N° de compuestos	Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
		NE	E	NE	E	NE	E	NE	E
Monoterpenos	11	61,37	57,61	73,42	64,11	66,40	45,09	54,07	51,10
Alcoholes	6	26,21	28,42	19,15	23,99	24,24	41,00	35,23	37,15
Aldehídos	7	2,50	3,17	2,21	2,60	3,06	6,33	3,82	5,62
Hidrocarburos	4	0,04	0,05	0,98	3,59	1,73	1,72	2,01	1,62
Aromáticos	2	0,66	0,72	0,40	1,08	1,10	1,23	0,91	0,95
Cetonas	1	0,10	0,10	0,15	0,12	0,11	0,13	0,11	0,12
Ésteres	4	0,36	0,28	0,76	0,39	0,38	0,33	0,23	0,39
Tioles	1	8,10	8,94	1,19	3,02	1,66	2,59	2,89	1,98
Sesquiterpenos	1	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	-	0,01
%Área total identificada		99,35	99,29	98,29	98,90	98,70	98,44	99,27	98,93

NE: Hojas no expuestas. E: Expuestas. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

El análisis de componentes principales en base a la relación entre los grupos químicos y frutos sanos e infestados explicó el 79% de la variabilidad total (Figura 4.5). En el primer componente del análisis, los monoterpenos y alcoholes son mayoritarios en frutos sanos e infestados del cultivar INTA 37. En correlación opuesta, los norisoprenoides fueron mayoritarios en los frutos sanos e infestados del cultivar INTA 147. En el segundo componente, los compuestos aromáticos fueron mayoritarios en frutos infestados del cultivar Champion. Los frutos infestados del cultivar INTA 117 e INTA 147 son más similares entre sí en relación con sus grupos químicos. Los frutos sanos del cultivar INTA

37 e INTA 147 son los más disímiles entre sí, teniendo en cuenta la composición por grupo químico.

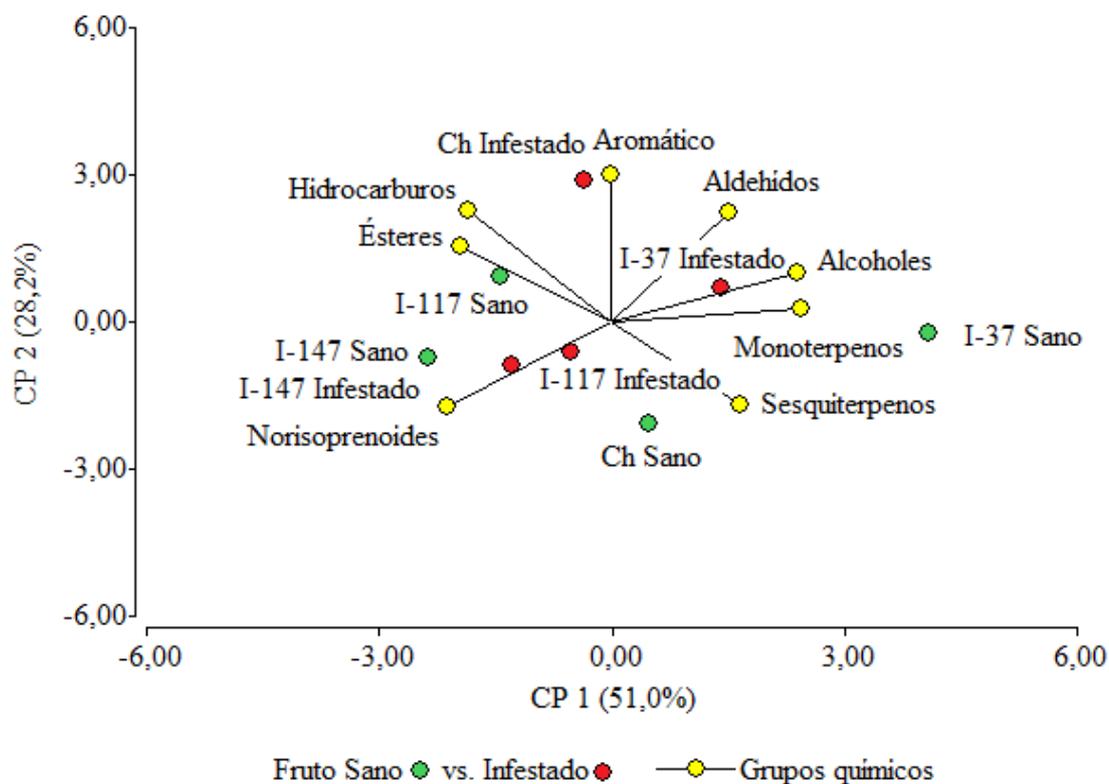


Figura 4.5. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en frutos sanos e infestados de cuatro cultivares de *C. oblonga* en maduración. En verde se representa lo sano, en rojo lo infestado y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

El análisis de componentes principales en base a la relación entre los grupos químicos y hojas no expuestas y expuestas explicó el 80% de la variabilidad total (Figura 4.6). En el primer componente del análisis, los monoterpenos, ésteres y sesquiterpenos fueron mayoritarios en las hojas no expuestas del cultivar INTA 37. Los alcoholes fueron mayoritarios en hojas expuestas de los cultivares INTA 117 e INTA 147. En el segundo componente, los tioles fueron mayoritarios en las hojas no expuestas y expuestas, del cultivar Champion. Hay mayor similitud de composición química en las hojas no expuestas y expuestas del cultivar Champion. Hubo una menor similitud de grupos químicos entre las hojas no expuestas del cultivar INTA 37 y las hojas expuestas del cultivar INTA 117.

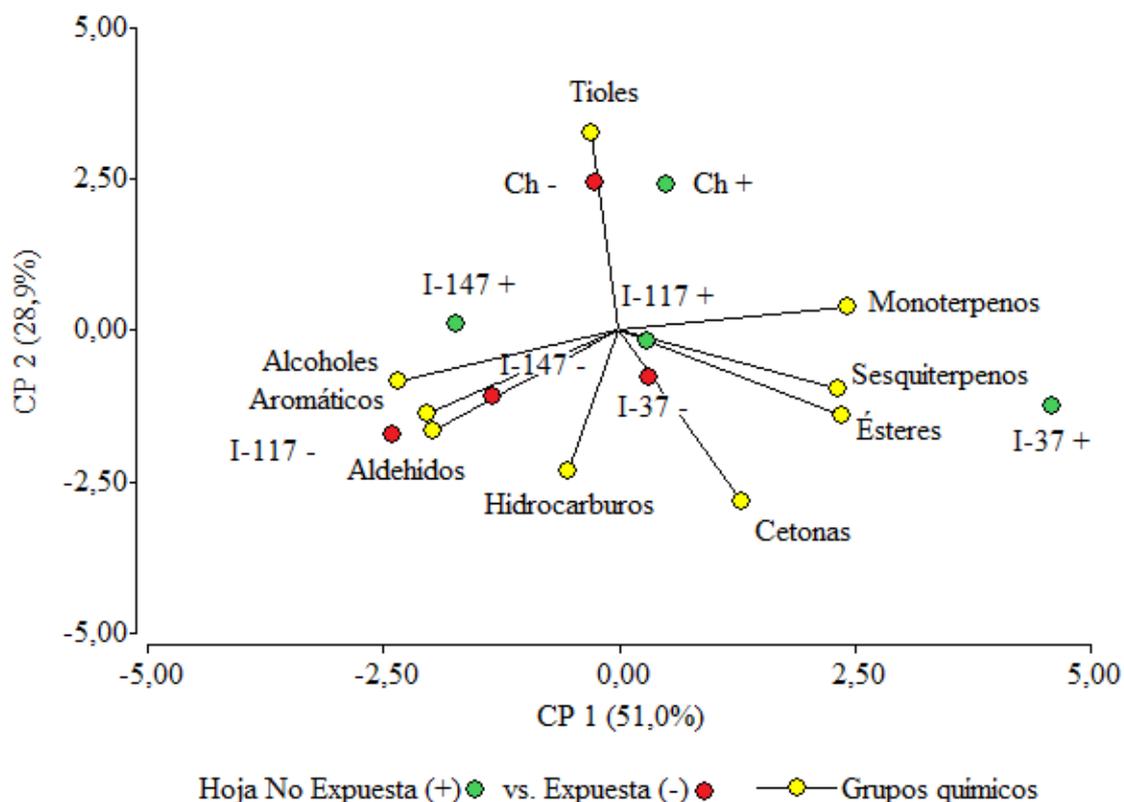


Figura 4.6. Análisis de Componentes Principales de los grupos químicos de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas de cuatro cultivares de *C. oblonga* en maduración. En verde se representa lo no expuesto, en rojo lo expuesto y en amarillo los grupos químicos. El análisis se realizó con el software Infostat (V. 2020p).

Análisis del perfil de volátiles por cultivares

Los frutos sanos e infestados de todos los cultivares, presentaron perfiles similares con una cantidad de veintinueve a treinta y dos volátiles diferentes (Cuadro 4.7). En las hojas no expuestas y expuestas de todos los cultivares, el perfil se presentó con una cantidad de treinta a treinta y cinco volátiles diferentes (Cuadro 4.8). El grupo de kairomonas tuvo una mayor proporción en frutos sanos de los cultivares Champion e INTA 37 y mayor en los frutos infestados de los cultivares INTA 117 e INTA 147. El (E,E)- α -Farneseno, solo aumentó en frutos infestados del cultivar INTA 147. El cultivar Champion presentó la mayor proporción de este compuesto en frutos sanos, con un 24,97%. Respecto al Limoneno, la proporción aumentó en frutos infestados de los cultivares INTA 117 e INTA

147 (Cuadro 4.7). En el cultivar INTA 117, las hojas expuestas presentaron una predominancia del (Z)-3-Hexenol con un 34,95% (Cuadro 4.8).

Análisis del perfil de volátiles del membrillo expuesto a carpocapsa

Con el fin de analizar el cambio en el perfil de volátiles del cultivo del membrillo expuesto a carpocapsa, se usó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar.

Para analizar cambios en el perfil de frutos sanos e infestados, se logró una identificación de treinta y seis compuestos volátiles diferentes entre todos los cultivares (Cuadro 4.7). El (E,E)- α -Farneseno se presentó sin cambios significativos, en mayor proporción en frutos sanos de todos los cultivares. Respecto al Limoneno tampoco tuvo un cambio significativo entre perfiles de frutos sanos e infestados. De los compuestos con actividad electroantagónica para hembras, se presentaron el (Z)-3-Hexenol, Benzaldehído, Acetato de Hexilo, (E)- β -Ocimeno, Decanal y Germacreno, pero sin cambios significativos entre frutos sanos e infestados. Solamente el (E)- β -Ocimeno fue significativamente mayor en frutos infestados (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.7).

En el perfil de hojas no expuestas y expuestas se logró una identificación de treinta y siete compuestos volátiles entre todos los cultivares (Cuadro 4.8). Del grupo de aldehídos el Hexanal se expresó significativamente en mayor proporción en las hojas expuestas (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.7). En cambio, el (E,Z)-2,6-Nonadienal disminuyó significativamente en las hojas expuestas (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.7). Del grupo de kairomonas, el Limoneno tuvo un cambio consistente en todos los cultivares, disminuyendo significativamente la proporción en las hojas expuestas (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura

4.7). En las hojas no expuestas del cultivar INTA 37 se presentó en mayor proporción con un 70,63%. Se presentaron compuestos con actividad electroantenográfica como el (Z)-3-Hexenol, Benzaldehído, 6-Metil-5-Hepten-2-ona, β -Mirceno y Decanal. De estos compuestos solo el (Z)-3-Hexenol aumentó significativamente en hojas expuestas de todos los cultivares (Prueba de Friedman $T_2 = 1E+30$, $p < 0,0001$) (Figura 4.7).

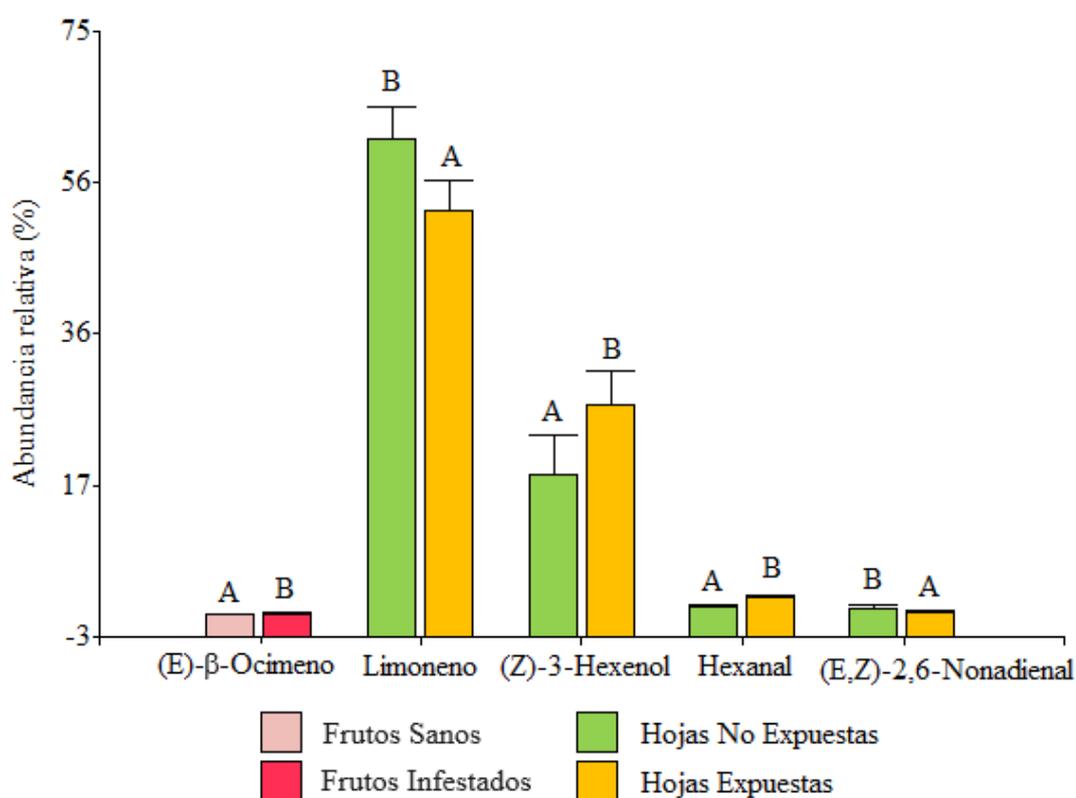


Figura 4.7. Abundancia relativa porcentual de (E)- β -Ocimeno en frutos sanos e infestados y de Limoneno, (Z)-3-Hexenol, Hexanal y (E,Z)-2,6-Nonadienal en hojas no expuestas y expuestas. Se usó como réplica la abundancia relativa cuantificada en cada cultivar, en etapa de maduración. Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; análisis de varianza de Friedman).

Cuadro 4.7: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en frutos sanos e infestados por carpocapsa, de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares								
				Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147		
				Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado	
1	Etanotiol	TI	1,79	530	nd	nd	nd	17,07	0,52	nd	0,47	nd
2	Hexano	HC	1,94	601	17,20	26,87	14,24	21,45	27,99	18,75	23,66	20,73
3	2-metil-2-butenal	AH	3,09	742	0,08	2,14	0,14	0,03	1,50	0,57	1,01	0,77
4	Tolueno	AR	3,65	756	nd	0,94	0,53	0,52	0,91	0,37	0,73	0,50
5	hexanal	AH	4,31	795	2,91	8,78	12,51	5,68	5,65	5,50	3,71	4,63
6	Éster etílico del ácido 2-metil butanoico	ES	5,86	837	2,49	14,74	1,00	3,67	4,57	7,32	4,59	4,83
7	(Z)-3-Hexenol (EAG+)	AL	6,19	846	nd	nd	2,73	nd	nd	nd	nd	nd
8	1-Hexanol	AL	6,69	859	1,28	3,23	6,51	2,79	1,84	3,05	1,84	2,66
9	Acetato de metilbutilo	ES	7,10	869	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,09	nd
10	Tiglato de etilo	ES	10,47	921	0,25	1,53	0,29	0,34	0,70	0,56	0,43	0,66
11	Canfeno	MT	11,06	943	0,22	0,75	0,64	0,34	0,38	0,39	0,27	0,45
12	Benzaldehído (EAG+)	AH	11,95	942	nd	nd	nd	0,10	nd	0,32	nd	nd
13	Hexanoato de etilo	ES	15,14	978	2,46	8,53	3,58	2,94	9,71	12,09	11,42	11,25
14	Acetato de Hexilo (EAG+)	ES	16,51	991	0,18	0,19	0,17	0,25	0,17	0,29	0,18	0,12
15	Limoneno (K/EAG+)	MT	17,50	1005	8,89	8,32	27,84	21,84	7,88	14,61	3,81	7,26
16	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,40	1034	0,10	0,29	0,09	0,09	0,07	0,19	0,08	0,17
17	Heptanoato de etilo	ES	25,19	1092	0,45	1,52	0,42	0,43	0,84	1,24	1,13	1,58
18	β-Citronelal	MT	29,62	1133	0,29	0,48	0,27	0,52	0,21	0,24	0,20	0,28
19	(Z)-2-nonenol	AL	32,34	1174	3,92	4,91	2,87	5,72	2,90	2,98	2,38	3,79

Cuadro 4.7. Continuación.

20	(E)-1-(metoximetoxi)-2-octeno	HC	32,76	1175	0,22	0,22	0,16	0,20	0,25	0,29	0,58	0,36
21	(Z)-4-octenoato de etilo	ES	33,85	1190	0,25	0,18	0,10	0,15	0,19	0,18	0,34	0,26
22	Octanoato de etilo	ES	34,34	1196	1,61	1,35	0,89	0,74	2,26	1,75	2,05	2,33
23	Decanal (EAG+)	AH	34,76	1200	0,07	0,12	0,06	nd	0,05	0,06	0,06	0,09
24	Teaspirano Z o E	N	38,06	1291	9,16	0,99	0,20	0,32	11,90	10,98	18,35	15,97
25	Teaspirano Z o E	N	38,69	1307	4,99	1,01	0,34	0,47	8,54	9,55	15,40	12,37
26	Éster isobutílico del ácido 2,2,4-trimetil-3-isopropilcarboxipentanoico	ES	39,72	1331	0,59	0,20	0,15	0,12	0,11	0,10	0,21	0,34
27	Éster del ácido 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil)propil 2-metil-propanoico	ES	40,39	1368	0,20	0,29	0,22	0,19	0,20	0,16	0,35	0,57
28	(Z)-3-Tetradeceno	HC	41,02	1391	0,19	0,10	0,12	0,19	0,16	0,08	0,09	0,25
29	Dodecanal	AH	41,46	1402	0,25	0,07	0,07	0,11	0,08	0,08	0,05	nd
30	Dihidro- β -ionona	SQ	42,01	1428	0,02	nd	nd	nd	0,16	0,17	0,15	0,20
31	D-Germacreno (EAG+)	SQ	43,24	1482	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,25	0,29
32	2-(2-etilhexil)-tiofeno	AR	43,35	1489	1,06	0,71	0,44	0,93	0,52	0,53	0,26	0,35
33	(E,E)-α-Farneseno (K/EAG+)	SQ	43,67	1503	24,97	2,16	17,89	5,17	4,57	2,25	0,32	1,24
34	3,7,11-trimetil-1-dodecanol	AL	45,09	1565	0,23	nd	0,04	0,08	nd	nd	nd	nd
35	Éster ciclohexilmetil isobutílico del ácido sulfuroso	ES	47,52	1691	1,17	1,06	0,36	0,99	0,51	0,53	0,68	0,81
36	2,6-dimetil-heptadecano	HC	48,49	1760	0,41	0,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área relativa total					86,12	91,75	94,86	93,45	95,34	95,17	96,13	95,11
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado	Sano	Infestado
Frecuencia de Kairomonas (K)					2	2	2	2	2	2	2	2
Proporción de Kairomonas					33,86	10,48	45,73	27,01	12,46	16,86	4,13	8,50
Frecuencia de compuestos EAG+					5	5	6	5	5	6	6	6
Proporción de compuestos EAG+					34,20	11,08	46,05	27,35	12,75	17,40	4,45	8,88

Grupos químicos, TI: Tiol, HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; N: Norisoprenoide; CT: Cetona, SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantenográfica en hembras de carpocapsa.

Cuadro 4.8: Principales compuestos del perfil de volátiles presentes en hojas no expuestas y expuestas a carpocapsa, de cuatro cultivares de *C. oblonga* en la etapa de fruto en maduración. Determinado por HS-SPME y GC/MS en una muestra compuesta de ocho plantas por cultivar. La abundancia de cada compuesto se encuentra en proporción relativa al total. nd: compuesto no detectado. Se consideró traza a compuestos con una abundancia relativa menor al 0,05%.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Índice de Retención	Cultivares									
			Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147			
			NE	E	NE	E	NE	E	NE	E		
1	Etanotiol	TI	1,80	530	8,10	8,94	1,19	3,02	1,66	2,59	2,89	1,98
2	Hexano	HC	1,94	601	nd	nd	0,79	3,49	1,65	1,61	1,93	1,55
3	1-Penten-3-ol	AL	2,47	679	nd	nd	0,29	1,27	1,06	1,72	1,34	1,44
4	(E)-2-pentenal	AH	3,41	747	0,15	0,16	0,05	0,12	0,05	0,27	0,29	0,27
5	Tolueno	AR	3,65	756	0,60	0,66	0,27	0,99	1,04	1,14	0,86	0,89
6	Hexanal	AH	4,31	795	1,63	2,15	0,47	1,15	0,56	2,63	1,43	2,73
7	2-Hexin-1-ol	AL	5,81	836	nd	nd	nd	nd	nd	0,18	nd	nd
8	(Z)-3-Hexen-1-ol (EAG+)	AL	6,19	846	21,24	24,22	13,40	16,44	7,18	34,95	30,33	32,62
9	Ciclohexanol	AL	6,66	857	1,93	2,01	nd	nd	nd	2,44	1,53	1,74
10	1-Hexanol	AL	6,69	859	2,86	2,00	5,02	5,98	15,76	1,34	1,84	1,10
11	(E,E)-2,4-Hexadienal	AH	8,75	904	0,23	0,31	0,48	0,34	0,19	0,72	0,66	0,70
12	α -Tujeno	MT	9,61	915	0,02	nd	nd	0,04	0,09	nd	0,03	nd
13	α -Pino	MT	10,05	919	0,30	0,35	0,34	0,42	0,36	0,46	0,42	0,45
14	Canfeno	MT	11,06	943	0,19	0,22	0,24	0,29	0,27	0,35	0,28	0,33
15	Benzaldehído (EAG+)	AH	11,93	942	0,16	0,10	0,27	0,33	0,21	1,65	0,79	1,22
16	Sabineno	MT	12,79	950	0,06	0,08	0,09	0,09	0,10	0,12	0,12	0,13
17	6-Metil-5-Hepten-2-ona (EAG+)	CT	13,93	963	0,10	0,10	0,15	0,12	0,11	0,13	0,11	0,12
18	β-Mirceno (EAG+)	MT	14,32	969	1,47	1,51	1,91	1,84	1,58	1,30	1,47	1,49
19	Hexanoato de etilo	ES	15,14	978	0,28	0,18	0,11	0,14	0,16	0,13	0,09	0,15
20	4-etil-2-hexinal	AH	16,42	992	0,15	0,35	0,12	0,23	0,14	0,26	0,26	0,31
21	p-Cimeno	MT	17,18	1002	0,03	0,02	0,03	0,07	0,09	0,06	0,05	0,04

Cuadro 4.8. Continuación.

22	Limoneno (K/EAG+)	MT	17,50	1005	59,17	55,32	70,63	61,19	63,71	42,62	51,56	48,54
23	(E)-β-Ocimeno (EAG+)	MT	19,40	1034	0,05	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02
24	α -Felandreno	MT	20,52	1040	0,03	0,03	0,04	0,05	0,06	0,05	0,04	0,03
25	o-Cimeno	MT	23,29	1050	0,03	0,03	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05
26	(E,Z)-2,6-nonadienal	AH	26,89	1111	0,17	0,10	0,79	0,40	1,90	0,72	0,37	0,35
27	β -Citronelal	MT	29,62	1133	0,02	0,02	0,03	0,02	0,04	0,04	0,02	0,02
28	(Z)-2-nonen-1-ol	AL	32,34	1174	0,18	0,19	0,43	0,30	0,24	0,37	0,20	0,26
29	(E)-1-(metoximetoxi)-2-octeno	HC	32,76	1175	0,01	0,01	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,01
30	Decanal (EAG+)	AH	34,76	1200	0,01	nd	0,03	0,03	0,01	0,07	0,02	0,03
31	Éster isobutílico del ácido 2,2,4-trimetil-3-isopropilcarboxipentanoico	ES	39,72	1331	nd	nd	0,11	0,03	nd	nd	nd	nd
32	(E)-7-Tetradeceno	HC	39,99	1359	0,03	0,04	0,10	0,06	0,06	0,09	0,05	0,05
33	Ácido propanoico, 2-metil-, 2,2-dimetil-1-(2-hidroxi-1-metiletil) propil éster	ES	40,39	1368	0,02	0,03	0,25	0,09	0,06	0,05	0,04	0,11
34	Tetradecano	HC	41,30	1399	nd	nd	0,06	0,02	nd	nd	0,01	nd
35	2-(2-etilhexil)-tiofeno	AR	43,35	1489	0,06	0,06	0,13	0,09	0,06	0,09	0,05	0,06
36	(E, E)- α -Farneseno	SQ	43,67	1503	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01
37	Éster ciclohexilmetil isobutílico del ácido sulfuroso	ES	47,52	1691	0,06	0,07	0,29	0,13	0,16	0,14	0,10	0,13
Área relativa total					99,35	99,29	98,29	98,90	98,70	98,44	99,28	98,93
					Champion		INTA 37		INTA 117		INTA 147	
					NE	E	NE	E	NE	E	NE	E
Frecuencia de Kairomonas (K)					1	1	1	1	1	1	1	1
Proporción de Kairomonas					59,17	55,32	70,63	61,19	63,71	42,62	51,56	48,54
Frecuencia de compuestos EAG+					7	6	7	7	7	7	7	7
Proporción de compuestos EAG+					82,19	81,29	86,42	79,98	72,85	80,76	84,30	84,02

Grupos químicos, TI: Tiol, HC: Hidrocarburos; AR: Aromático; AC: Ácido orgánico; AL: Alcoholes; ES: Ésteres; AH: Aldehídos; MT: Monoterpenos; N: Norisoprenoide; CT: Cetona, SQ: Sesquiterpenos. Se marcaron en negrita, los compuestos considerados principales en abundancia relativa, presentes en casi todas las muestras. K: compuestos con actividad de Kairomona y EAG+: compuestos con actividad electroantenográfica en hembras de carpocapsa. Hojas no expuestas: NE y expuestas E.

4.3.2. Oviposición frente a frutos sanos e infestados

Respecto al número de huevos puestos por las hembras de carpocapsa, se observó que fue significativamente mayor en los frutos infestados (Prueba de Friedman, $T^2 = 55$, $P < 0,0001$) (Figura 4.8).

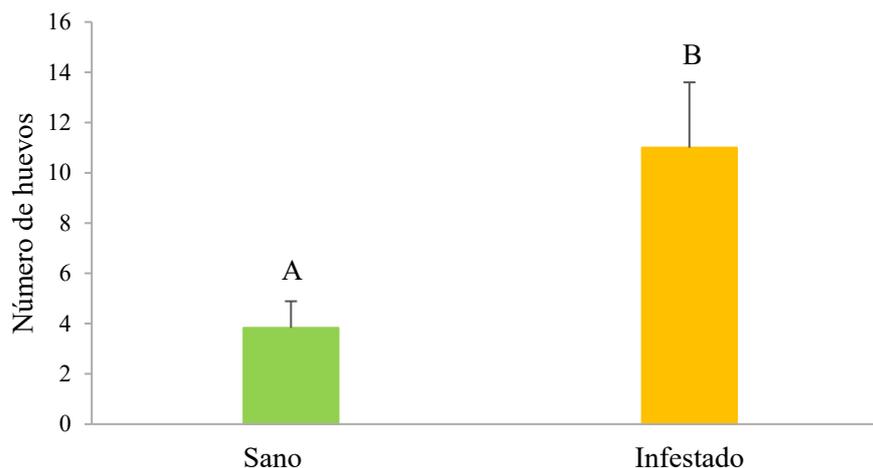


Figura 4.8. Número medio huevos sobre frutos sanos e infestados por carpocapsa en el cultivar Champion. N= 12 repeticiones. El número de huevos por estado del fruto difiere significativamente ($T^2 = 55$, $P < 0,0001$, con la prueba no paramétrica de Friedman). Cada barra negra representa el error estándar de la media. Letras diferentes sobre barras indican diferencia significativa ($p < 0,05$). El análisis se realizó mediante el software Infostat (V. 2020p).

4.3.3. Elección de larvas neonatas entre frutos sanos e infestados

De un total de 45 larvas un total de 5 y 8 larvas fueron las que eligieron frutos sanos e infestados, respectivamente, pero sin diferencias significativas. En cambio, hubo un comportamiento significativamente mayor del merodeo por la fruta infestada en comparación del merodeo por la fruta sana (prueba Chi Cuadrado $G^2 = 6,06$; $p = 0,0138$) (Cuadro 4.9).

Cuadro 4.9: Comportamiento de merodeo de las larvas neonatas entre los frutos sanos e infestados.

Comportamientos	Total	G²	gl	p
Merodeo Fruto Sano	5 23,81%	6,06	1	0,0138
Merodeo Fruto Infestado	16 73,19%			

Distintos comportamientos por combinación de un N= 45 larvas. Chi cuadrado MV-G2.

El tiempo que tardaron en realizar la elección por un fruto sano frente a uno infestado, no arrojó diferencias significativas (prueba de Wilcoxon: $W= 30,5$; $p= 0,5455$) (Cuadro 4.10). En este ensayo las larvas tardaron en promedio unos 473,57 segundos en elegir definitivamente un estado de fruto.

Cuadro 4.10: Tiempo de elección de las larvas neonatas entre frutos sanos e infestados.

Elección	n	Tiempo (seg.)	W	p
Fruto sano	5	485,75	30,5	0,5455
Fruto infestado	8	461,4		

Tiempo total 600 seg. W: Prueba de Wilcoxon

Entre los comportamientos registrados en el ensayo de elección existen diferencias significativas entre frutos sanos e infestados (prueba de Chi cuadrado $G^2= 15,06$; $p= 0,0018$) (Cuadro 4.11). La elección por frutos sanos e infestados fue menor, con un valor del 29% en comparación con la frecuencia de larvas que tuvieron un comportamiento de merodeo sin elección definitiva (47%).

Cuadro 4.11: Frecuencia de larvas neonatas que realizaron los distintos comportamientos

Comportamientos	Total	G²	gl	p
Fruto sano o infestado	13 29%	15,06	3	0,0018
Merodeo hacia fruto sano o infestado	21 47%			
Centro	4 9%			
Merodeo	7 15%			

Distintos comportamientos por combinación de un N= 45 larvas. Chi cuadrado MV-G2.

4.4. Discusión

Los insectos al alimentarse de las plantas pueden inducir por herbivoría cambios en la proporción y composición de los volátiles (Dicke & A van Loon 2000, Dudareva et al. 2013, Bruce 2015). En etapa de crecimiento hubo un aumento del (E,E)- α -Farneseno en frutos de membrillo debido a la infestación de carpocapsa. Las proporciones de Limoneno, Nonanal y Octanal fueron menores en las hojas expuestas. En maduración el (E)- β -Ocimeno se presentó en mayor proporción en los frutos infestados. El Limoneno y (E,Z)-2,6-Nonadienal disminuyeron en las hojas expuestas. El (Z)-3-Hexenol y Hexanal tuvieron una mayor proporción en las hojas expuestas a la plaga. López et al. (2022), también encontraron un aumento del (E,E)- α -Farneseno en frutos de membrillo infestados por carpocapsa. El incremento del (E,E)- α -Farneseno en respuesta a la infestación de la carpocapsa ha sido corroborado en diversos estudios. Buttery et al. (2000) observaron este fenómeno en nogales, mientras que Landolt et al. (2000) y Hern & Dorn (2002) lo confirmaron en manzanos. Por otro lado, Giacomuzzi et al. (2016), encontraron un aumento del (Z)-3-Hexenol en hojas de manzano expuestas a herbivoría por *Pandemis heparana*, otra plaga de la familia Tortricidae. En este trabajo también se observó el aumento del (E)- β -Ocimeno frente a la herbivoría en hojas. Hern & Dorn (2002), también demostraron una emisión significativa del (E)- β -Ocimeno en manzanas infestadas por carpocapsa. Los resultados concuerdan parcialmente con lo hallado en nogal por Buttery et al. (2000). En particular, se observó un incremento en la concentración de Hexanal, mientras que la de Nonanal experimentó una disminución frente a la exposición a la plaga. Además, se registró un aumento en los niveles de Limoneno en presencia de daño por carpocapsa. El aumento inducido por infestación del (E,E)- α -Farneseno no se observó en los frutos de membrillo en maduración. Hern & Dorn (2002) no pudieron encontrar diferencias inducidas del (E,E)- α -Farneseno por infestación de carpocapsa.

Las diferencias halladas entre los diferentes trabajos pueden deberse a las metodologías empleadas para la extracción y análisis de volátiles (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002, Khoubnasabjafari & Jouyban 2011). También bajo el análisis de hospederos de carpocapsa, se tratan especies y cultivares diferentes. Por otro lado, existe una demora entre que ocurre el daño por herbivoría y la liberación de volátiles, ya que la inducción y biosíntesis de estos metabolitos secundarios requiere tiempo y energía para la planta (Dudareva et al. 2006, 2013). También puede deberse a que la emisión puede variar en proporción según el tiempo transcurrido entre la infestación y el análisis de volátiles. Hern & Dorn (2001, 2002) encontraron que la emisión del (E,E)- α -Farneseno, aumentaba en proporción a los pocos días de la infestación de carpocapsa, coincidiendo con el primer estadio de las larvas neonatas. Hay una relación clara entre la emisión del (E,E)- α -Farneseno inducida por infestación de carpocapsa que se diferencia de cualquier otro tipo de daño, ya sea artificial o mecánico (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002).

Se destaca que los cambios de emisión de volátiles en hojas de membrillo no fueron causados por el daño directo de herbivoría, sino por la infestación del fruto. Además, la emisión de volátiles inducida no se restringe únicamente al lugar del daño, sino que también puede manifestarse de manera sistémica en otras partes de la planta (Dicke & A van Loon 2000).

El (E,E)- α -Farneseno es la kairomona más importante de carpocapsa, y el aumento inducido por infestación, ha quedado demostrado en este trabajo. Estos resultados reúnen evidencias en favor de la Hipótesis: “El perfil de volátiles en los frutos infestados por carpocapsa es distinto en comparación con los frutos sanos”.

El comportamiento de oviposición y elección de larvas neonatas, solo se registró en frutos del cultivar Champion en etapa de maduración. Respecto al comportamiento de oviposición, las hembras de carpocapsa prefirieron colocar más huevos en los frutos

infestados. Si tenemos en cuenta el comportamiento de las larvas neonatas, estas eligieron los frutos infestados y merodearon cerca de ellos. De alguna manera las larvas que merodearon los frutos infestados se quedaron quietas sin proseguir, en un comportamiento de “arresto”. El cultivar Champion presentó la menor proporción de kairomonas y compuestos electroantenográficos en los frutos infestados. Sin embargo, los frutos infestados registraron la mayor oviposición y elección de larvas neonatas, lo que indicaría la presencia de volátiles en dosis atractivas y no repelentes. Ante proporciones similares del Limoneno y baja presencia del (E,E)- α -Farneseno, puede que los frutos infestados hayan sido atractivos por el (E)- β -Ocimeno y Decanal. También es posible que una mezcla entre todos estos compuestos haya generado tal preferencia en la oviposición y elección de larvas por los frutos infestados. En este caso se corrobora la atracción de hembras de carpocapsa por emisiones volátiles inducidas por la infestación de la misma especie (Hern & Dorn 2002, Reed & Landolt 2002, Giacomuzzi et al. 2016, El-Sayed et al. 2016). Landolt et al. (2000), encontraron que las larvas neonatas se sentían más atraídas por las manzanas infestadas. Witzgall et al. (2012) en un ensayo de características experimentales similares al de esta tesis, obtuvieron una mayor oviposición de hembras de carpocapsa en frutos de manzano infestados por larvas de la misma especie. Puede que en este trabajo el (E,E)- α -Farneseno haya sido emitido en dosis atractivas y que a la vez haya estimulado la oviposición en los frutos infestados de membrillo. Hern & Dorn (1999), demostraron mediante olfatometría que las hembras se sentían atraídas por bajas dosis y repelidas por altas dosis del (E,E)- α -Farneseno. Probablemente no solo hay estimulación de oviposición por emisiones atractivas del (E,E)- α -Farneseno de manera individual. Witzgall et al. (2012), encontraron un aumento en la oviposición de carpocapsa, relacionado a volátiles adicionales de levaduras del género *Metschnikowia*, un microorganismo asociado simbióticamente. Esta relación entre

carpocapsa y *Metschnikowia* no es reciente. La levadura forma parte de la dieta de las larvas, coexiste en las galerías de la fruta y promueve la supervivencia de las larvas al reducir la incidencia de infestaciones (Pelliccia et al. 2011). Se desconoce si existe la presencia y relación simbiótica del género *Metschnikowia* o microorganismos similares en la interacción membrillo-carpocapsa. Ante lo expuesto, se reunieron evidencias en favor de las Hipótesis: “Los frutos infestados por carpocapsa son más atractivos para la oviposición” y “Los frutos infestados por carpocapsa resultan más atractivos para la elección de larvas neonatas”.

La elección por fruta infestada presenta un panorama poco exitoso para carpocapsa al enfrentarse a la competencia de un individuo de su misma especie. Se ha planteado que los frutos sanos al emitir bajas proporciones de (E,E)- α -Farneseno quizás puedan ser detectados por las larvas neonatas o hembras de carpocapsa, en cortas distancias. Contrariamente, los frutos infestados serían atractivos a largas distancias (Dicke & A van Loon 2000, Landolt et al. 2000). Una proporción del (E,E)- α -Farneseno inducida por infestación, quizás solo estimule la oviposición de carpocapsa, en contra de indicar que el fruto se encuentra ocupado. La emisión de volátiles de frutos infestados debería estar indicando la calidad alimenticia para el éxito en el desarrollo de la progenie de carpocapsa. Por ello, seguramente otros estímulos volátiles y no volátiles se encuentran en juego (Lombarkia & Derridj 2008, Derridj et al. 2012, Wearing 2016). Por otro lado, la emisión de volátiles inducidos por infestación no solo afecta a carpocapsa, sino que participan en interacciones multitróficas atrayendo a insectos depredadores (Hern & Dorn 2002, Hare 2011, Dudareva et al. 2013, Bruce 2015).

4.5. Conclusión

En este capítulo se demuestra que la infestación de carpocapsa generó cambios en el perfil de volátiles del membrillo, especialmente la inducción del (E,E)- α -Farneseno, su kairomona principal. Las hembras y larvas de carpocapsa fueron atraídas por los frutos infestados de membrillo, corroborando el comportamiento estudiado en manzano. El hallazgo de volátiles inducidos por infestación contribuye al comportamiento de búsqueda de hospederos en carpocapsa.

5.1. Discusión General

El presente trabajo aborda la interacción de carpocapsa como plaga de un hospedero poco estudiado, mediada por los compuestos volátiles del membrillo. Para ello se plantearon una serie de objetivos para determinar el perfil de compuestos volátiles de cultivares de membrillo en etapas fenológicas y evaluar el comportamiento de individuos de carpocapsa frente a ellos.

Se observó que el perfil de volátiles del membrillo fue cambiando a medida que avanzaba el desarrollo fenológico. En floración, predominaron los ésteres y sesquiterpenos. En etapa de frutos en poscujaje a fruto inmaduro, predominaron los ésteres y se registraron menos compuestos volátiles en comparación con la etapa de floración. En etapa de crecimiento predominaron los alcoholes y se identificó la mayor diversidad de compuestos volátiles, en comparación con la etapa de floración, poscujaje y maduración. En maduración predominaron los monoterpenos y se identificó una cantidad menor de volátiles en comparación con la etapa de crecimiento del membrillo. Generalmente, en manzanos la evolución en el perfil de volátiles cambia durante el desarrollo. Al principio está representado por aldehídos que se reducen a alcoholes, que luego se esterifican y finalmente predominan los ésteres (Mattheis et al. 1991, Espino-Díaz et al. 2016). Se observó una progresión natural de monoterpenos y sesquiterpenos a medida que avanzaba el desarrollo fenológico del membrillo, ya que ambos grupos se encuentran conectados biosintéticamente entre sí (Dudareva et al. 2013, Muhlemann et al. 2014). La emisión de compuestos volátiles puede tener variaciones temporales dependiendo del estado general, el crecimiento y de las etapas fenológicas del árbol frutal (Rapparini et al. 2001, Yang et al. 2021, Li et al. 2021). La emisión de volátiles también puede variar según los ritmos circadianos (Dudareva & Pichersky 2000, Raguso 2008).

Se ha encontrado una emisión diferente entre el día y el anochecer de algunos compuestos volátiles en frutales de pepita y nogal (Casado et al. 2006, 2008). Por este motivo, en este trabajo se propuso que el muestreo en todas las etapas fenológicas y cultivares se realizara en el mismo horario. Este se realizó entre las 17:00 y 18:00 horas.

El perfil de volátiles no solo cambió entre etapas fenológicas, sino también en composición y proporción en los órganos analizados, flores, hojas y frutos. Esto también se reflejó en una oferta de kairomonas y compuestos electroantenográficos distinta entre etapas fenológicas. Se observó el comportamiento de oviposición y elección de larvas, siguiendo cómo la biología de carpocapsa se desarrolla en generaciones en el campo. El número de huevos y de larvas que eligieron algún cultivar, aumentó desde poscuaaje a frutos inmaduros. En estas etapas el perfil de volátiles del membrillo se caracterizó con ocho compuestos de actividad electroantenográfica (según literatura) y solo el Limoneno como kairomona (Landolt & Guédot 2008). La kairomona principal de carpocapsa, el (E,E)- α -Farneseno, no estuvo presente en estas etapas. En etapa de crecimiento se identificaron dos kairomonas, el Limoneno y el (E,E)- α -Farneseno y trece compuestos con actividad electroantenográfica. El número de huevos puestos y de larvas que eligieron algún cultivar fue mayor en comparación con las etapas anteriores. Al finalizar el ciclo del cultivo, en maduración, el número de huevos y de larvas que eligieron algún cultivar, disminuyó en comparación con la etapa de crecimiento. En esta etapa el perfil de volátiles poseía solo dos kairomonas, el Limoneno y (E,E)- α -Farneseno y ocho compuestos con actividad electroantenográfica.

La oferta de kairomonas y posiblemente los compuestos electroantenográficos fueron las señales que determinaron que la respuesta de oviposición de las hembras de carpocapsa sea diferente entre cultivares y las etapas fenológicas del membrillo. Una alta proporción de kairomonas y compuestos electroantenográficos indicó que el cultivar

INTA 147 y Champion sean los más elegidos. En estos cultivares se mantuvo una mayor oviposición en todas las etapas. La predisposición del membrillo a ser atacado por carpocapsa fue diferente entre cultivares y determinada por la oferta de kairomonas y compuestos electroantenográficos. En electroantenografía, cuando un compuesto tiene respuesta antenal, no significa que será atractivo (Casado et al. 2006, Knight et al. 2018). Las señales emitidas por el membrillo, en una mezcla compuesta o en un *bouquet* específico, son percibidas por la hembra que es la que debe elegir el sitio para oviposición (Piñero & Dorn 2009, Tasin et al. 2011, Lu et al. 2014).

El sitio preferido para la oviposición de las hembras resultó ser en las hojas, predominando un mayor número de huevos en la cara adaxial, elección que se mantuvo en todas las etapas fenológicas. En crecimiento, se observaron pocas oviposiciones en las ramas del membrillo. Solo en maduración se registró una proporción menor en los frutos en zonas sin pubescencia. Este comportamiento coincide con la preferencia de las hembras de oviponer sobre superficies lisas, evitando las pubescentes (Martí Martí 2000, Al Bitar et al. 2010, Wearing 2016). Este hallazgo resulta útil para el monitoreo durante el ciclo fenológico en el membrillo.

Las larvas neonatas no siguieron las mismas preferencias marcadas por las hembras fecundadas. Las larvas neonatas no tuvieron una respuesta de elección diferente entre cultivares, en la mayoría de las etapas fenológicas. Esto puede deberse a la emisión competitiva de volátiles entre los cultivares. En poscuaje, el comportamiento de arresto fue mayor en comparación con otras etapas. En cierta medida además de atracción, la presencia o aplicación de kairomonas en otras proporciones puede generar un arresto de las larvas neonatas. En ese estado de arresto se extiende el tiempo de exposición a condiciones desfavorables, aumentando la mortalidad de larvas y a la vez disminuyendo el riesgo de infestación (Knight & Light 2001, Hughes et al. 2003, Light & Beck 2012,

Davis et al. 2013). Solo en etapa de frutos inmaduros la elección fue diferente, prefiriendo el cultivar INTA 147. La falta de preferencia de las larvas neonatas por diferentes cultivares u hospederos puede ser una estrategia de supervivencia. Según Piskorski et al. (2010), las larvas pueden sintetizar sus propios carbohidratos, independientemente del hospedero del que se alimenten. Por lo tanto, la elección del hospedero entre los cultivares de membrillo se limita a las preferencias de las hembras de carpocapsa.

La respuesta de oviposición de hembras fecundadas y elección de larvas neonatas de carpocapsa fue aumentando desde poscuaje hasta el crecimiento para después disminuir en etapa de maduración. En etapa de crecimiento coincidió la mayor respuesta de oviposición y la elección por parte de las larvas neonatas, con un perfil de volátiles más diversificado y con mayor cantidad de compuestos electroantenográficos. Este comportamiento respondería a una posible sincronización de la plaga, frente al *bouquet* de volátiles de la oferta fenológica.

Luego se observó que el perfil de volátiles de frutos de membrillos se alteró con la infestación de carpocapsa. Se evidencia particularmente con el aumento inducido de su principal kairomona, el (E,E)- α -Farneseno y el (E)- β -Ocimeno. La emisión inducida por herbivoría se ha demostrado en nogal (Buttery et al. 2000), en manzano (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002) y recientemente en membrillo (López et al. 2022). Frente a este cambio, los frutos de membrillo infestados por carpocapsa, fueron más atractivos para la oviposición de hembras y elección de larvas de la misma especie (Landolt et al. 2000, Hern & Dorn 2002, Reed & Landolt 2002, Witzgall et al. 2012).

La respuesta de oviposición de hembras y elección de larvas neonatas de carpocapsa, fue determinada por el *bouquet* de kairomonas y compuestos electroantenográficos. Además, se destaca que el Limoneno sería un compuesto con un rol de kairomona

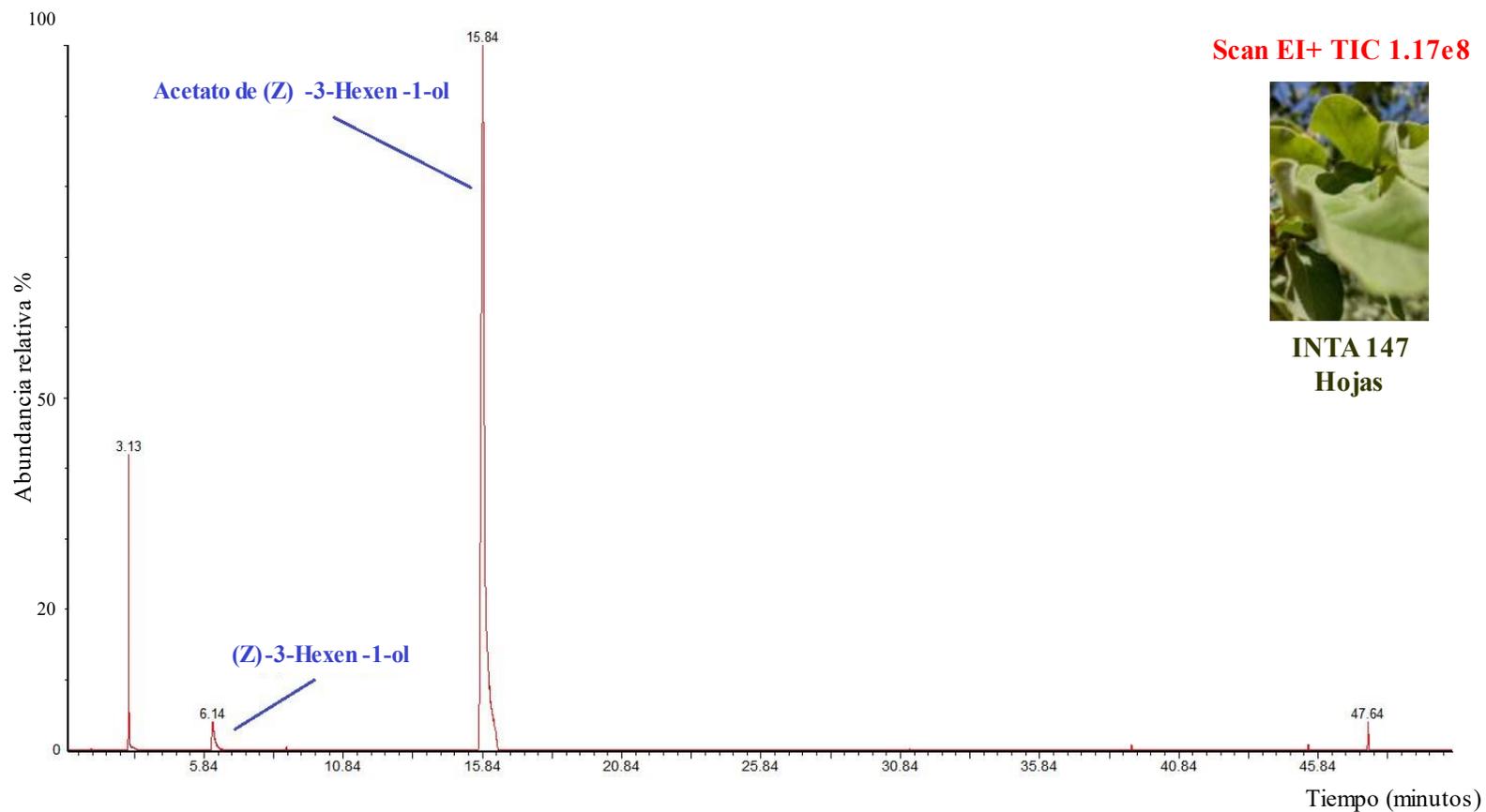
importante en el cultivo del membrillo, ya que en este trabajo estuvo presente en todos los órganos y etapas fenológicas analizadas. Vallat & Dorn (2005) demostraron mediante olfatometría la atracción de hembras fecundadas por el Limoneno. Además, se ha demostrado que añadiendo Limoneno a la Codlemona aumentó la proporción de machos en localizar la fuente de feromona en túnel de vuelo (Schmera & Guerin 2012).

5.2. Investigaciones futuras

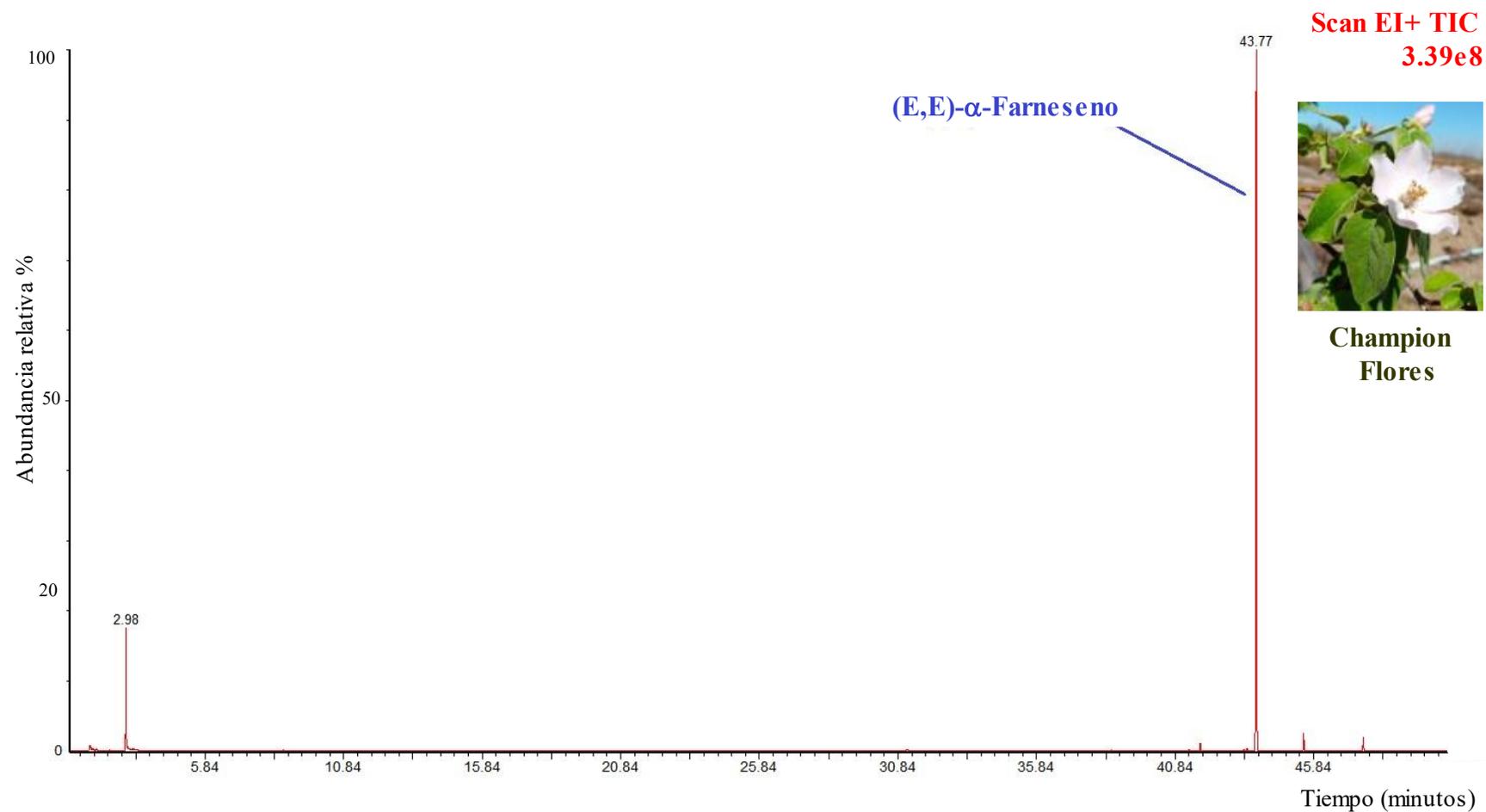
- Sería interesante realizar análisis de actividad electroantenográfica de hembras de carpocapsa, frente al perfil de volátiles del membrillo. Siguiendo la actividad de los adultos para llamado, cópula y oviposición, se recomienda que las muestras vegetales se extraigan en horarios crepusculares. Según lo hallado en este trabajo, se podrían realizar en las etapas de poscuaje y crecimiento, en donde hubo menor y mayor respuesta de la plaga, respectivamente. También investigar en profundidad qué volátiles o mezclas de lo encontrado en etapa de poscuaje, pueden generar arresto en larvas como uso estratégico en control. Se deberían enfocar los análisis electroantenográficos en el cultivar INTA 147, ya que fue el más preferido por hembras de carpocapsa.
- Probar en ensayos de campo en cultivos de membrillo y laboratorio al Limoneno como kairomona de atracción, ya sea en trampeo de machos y hembras como en oviposición y atracción de larvas neonatas.
- Tomando en cuenta el desarrollo de la larva, antes de entrar en diapausa, sería interesante identificar si hay estímulos volátiles en corteza de los hospederos que las guíen a sitios de refugio.

5.3. Conclusiones

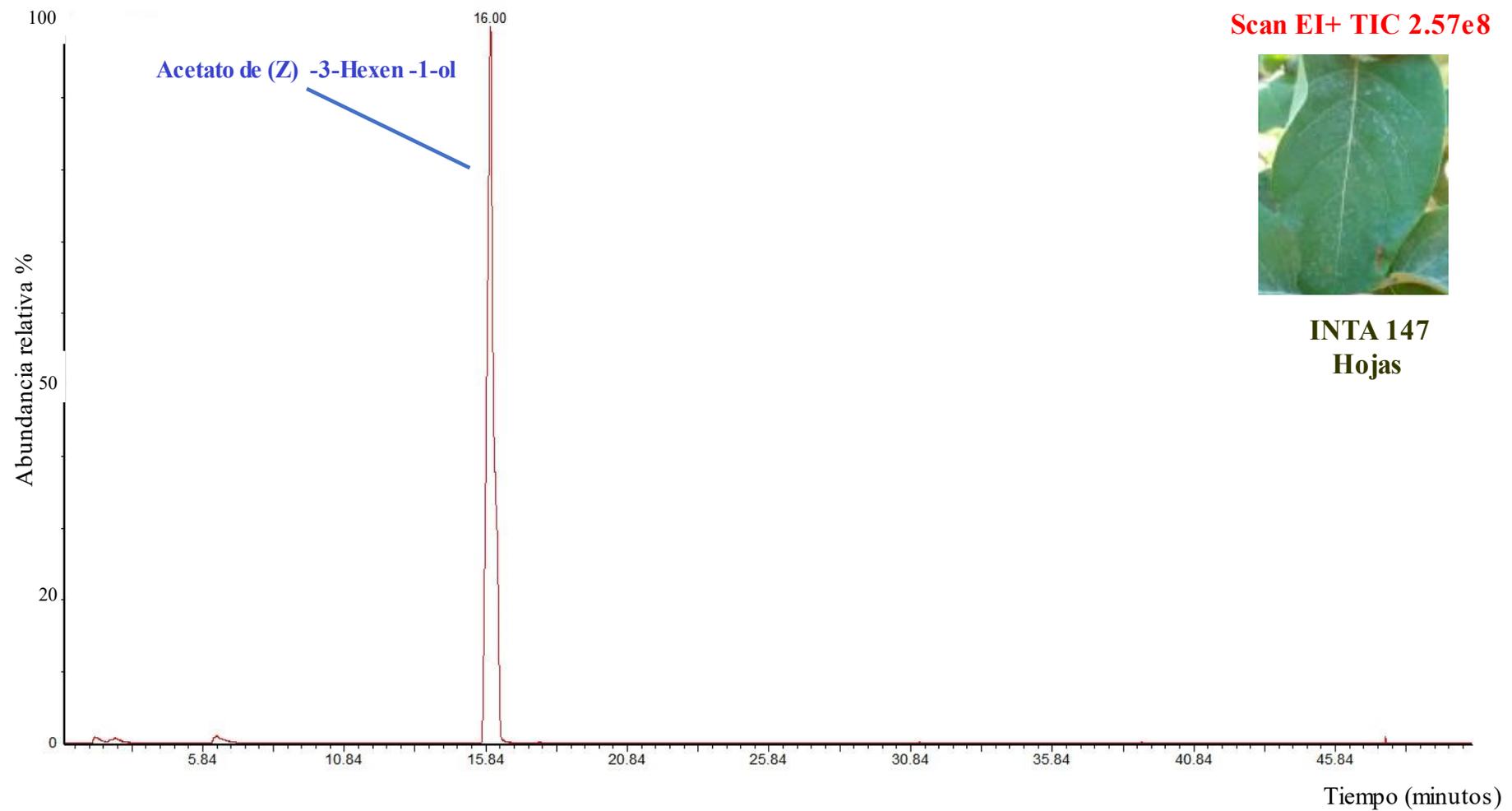
Los resultados expuestos en este trabajo reúnen evidencias en favor de las hipótesis planteadas. El perfil de compuestos volátiles fue cambiando en proporción y diversidad durante la fenología del membrillo. Se plantea que preferencias por los cultivares INTA 147 y Champion, podrían estar indicando una posible susceptibilidad a la infestación por carpocapsa. De esto surge una alternativa interesante, al identificar en el membrillo posibles volátiles con actividad electroantenográfica o kairomonas, que tengan aplicación sobre otros hospederos. La predominancia de oviposición en hojas sugiere que este órgano debería ser de mayor interés de observación, al momento del monitoreo de la plaga en el cultivo de membrillo. El comportamiento de oviposición y el de elección de larvas neonatas indican que carpocapsa podría estar sincronizada con el ciclo y la disponibilidad del cultivo de membrillo. Sería interesante investigar en profundidad qué volátiles o mezclas de lo encontrado en etapa de poscuaje, pueden generar arresto en larvas como uso estratégico en control. La infestación de carpocapsa generó cambios en el perfil de volátiles del membrillo, especialmente la inducción del (E,E)- α -Farneseno, su kairomona principal. Las hembras y larvas de carpocapsa fueron atraídas por los frutos infestados de membrillo, corroborando el comportamiento estudiado en manzano. Los hallazgos de este trabajo sobre la identificación del perfil de volátiles del membrillo, oviposición de hembras y elección de larvas neonatas, contribuyen al conocimiento sobre el comportamiento de localización de hospederos de carpocapsa. Estos resultados pueden ayudar al desarrollo de semioquímicos amigables con el medioambiente para el monitoreo y control de carpocapsa. Este trabajo representa el primer aporte científico de la evaluación de compuestos volátiles en membrillo en distintas etapas fenológicas y su interacción con *Cydia pomonella*.



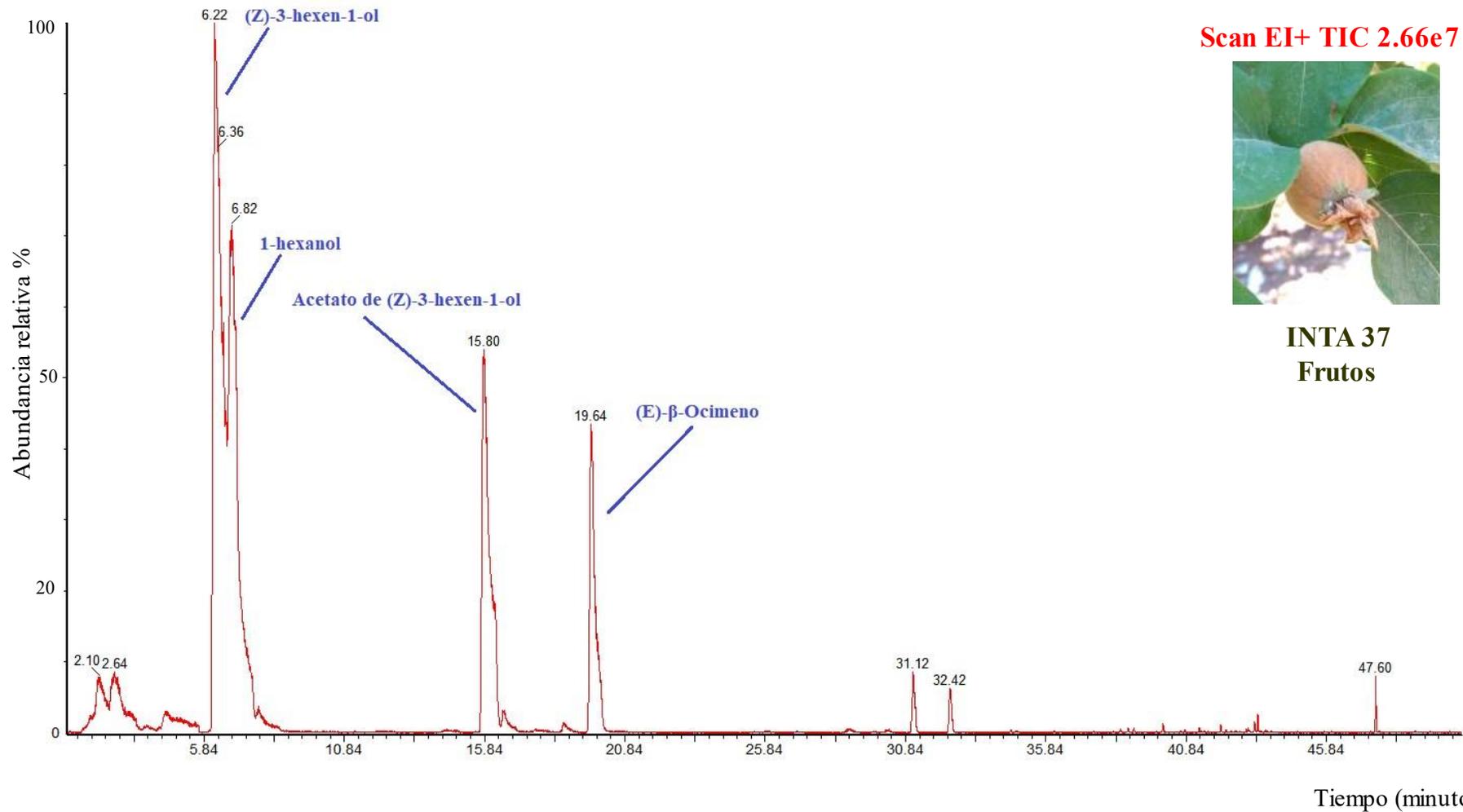
Apéndice Figura 1. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de Floración. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



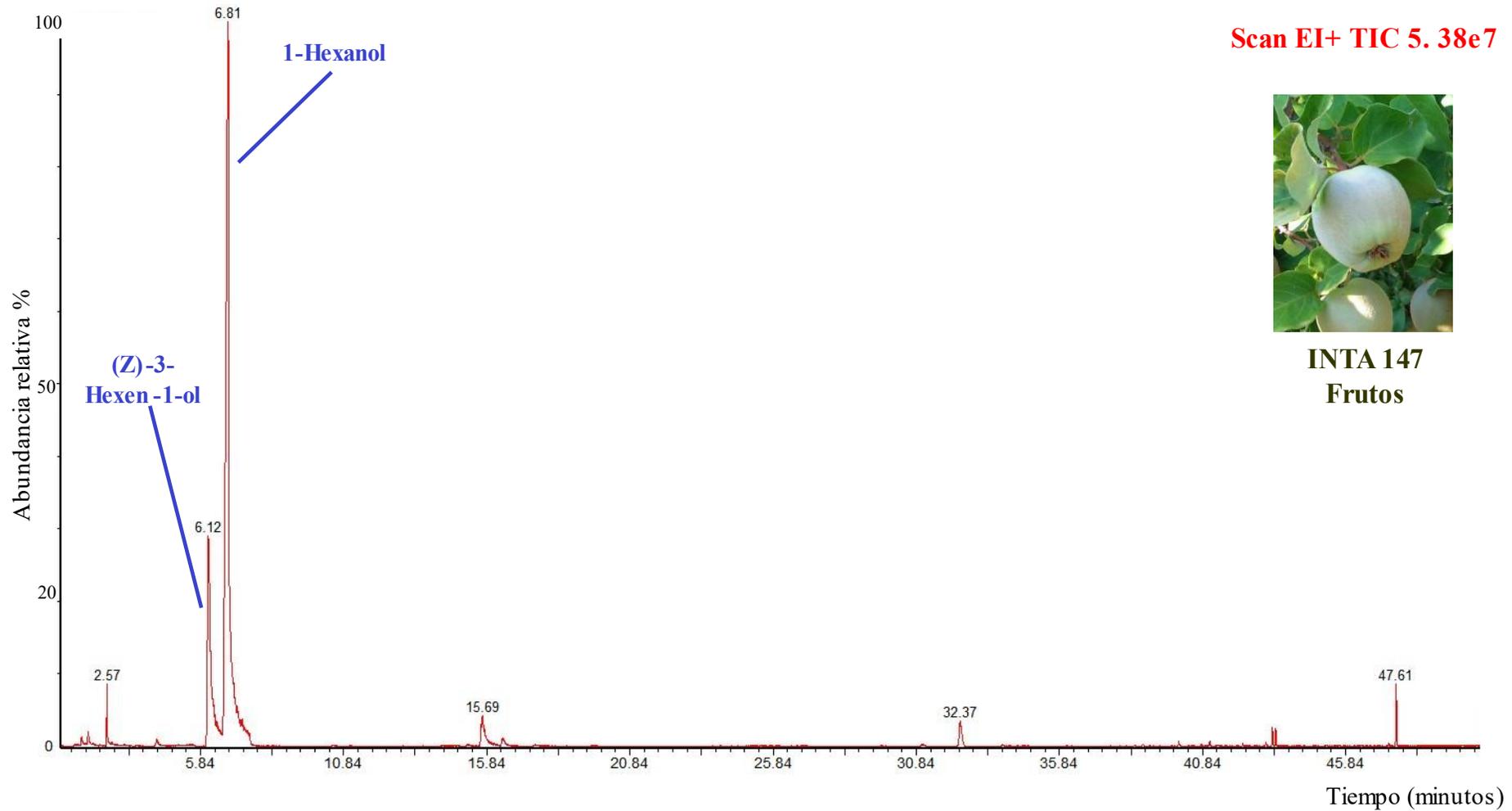
Apéndice Figura 2. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de flores del cultivar Champion. Etapa de floración. Eje “Y” representa la abundancia relativa (%) y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



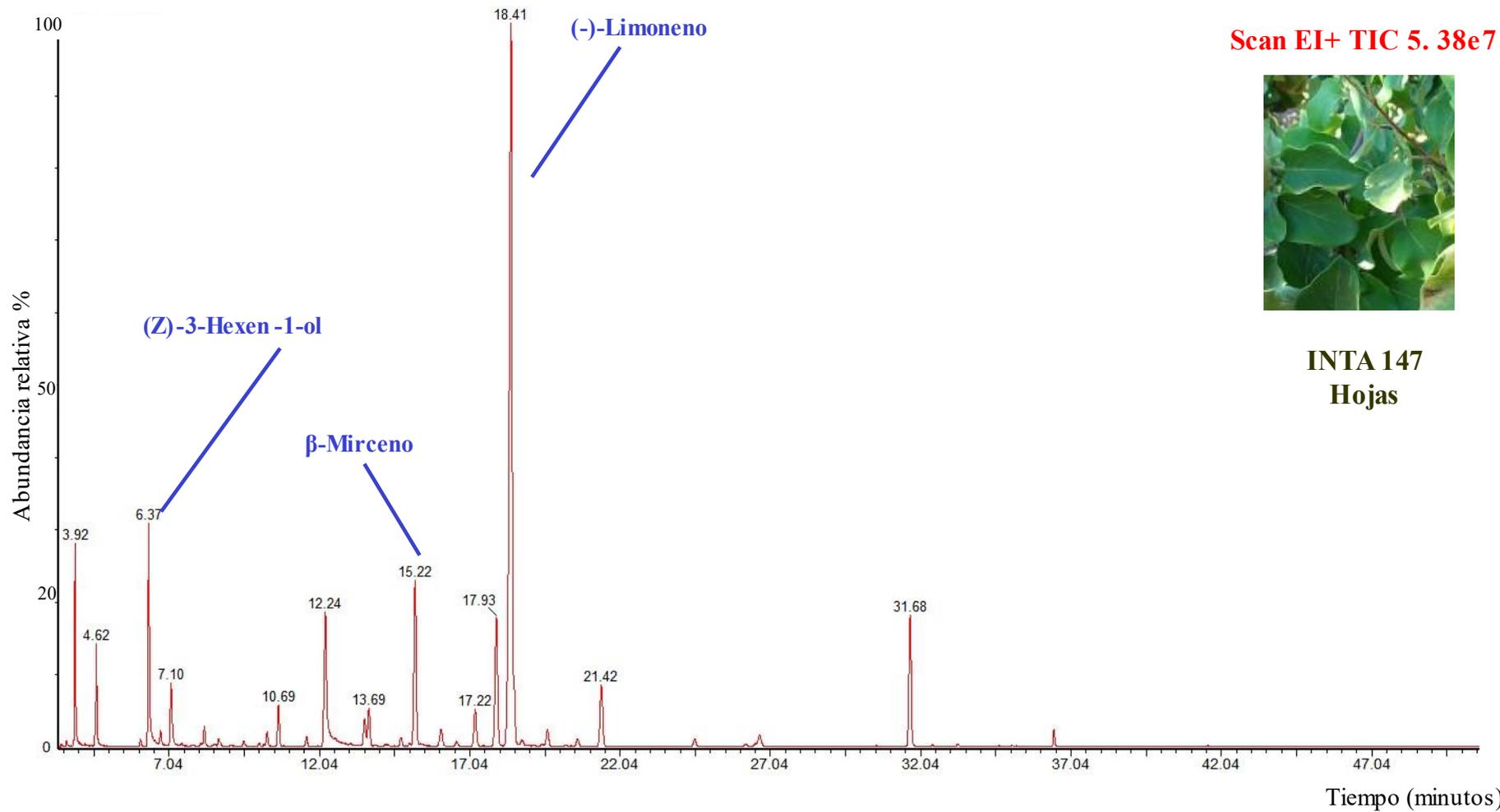
Apéndice Figura 3. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de poscuaaje a fruto inmaduro. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



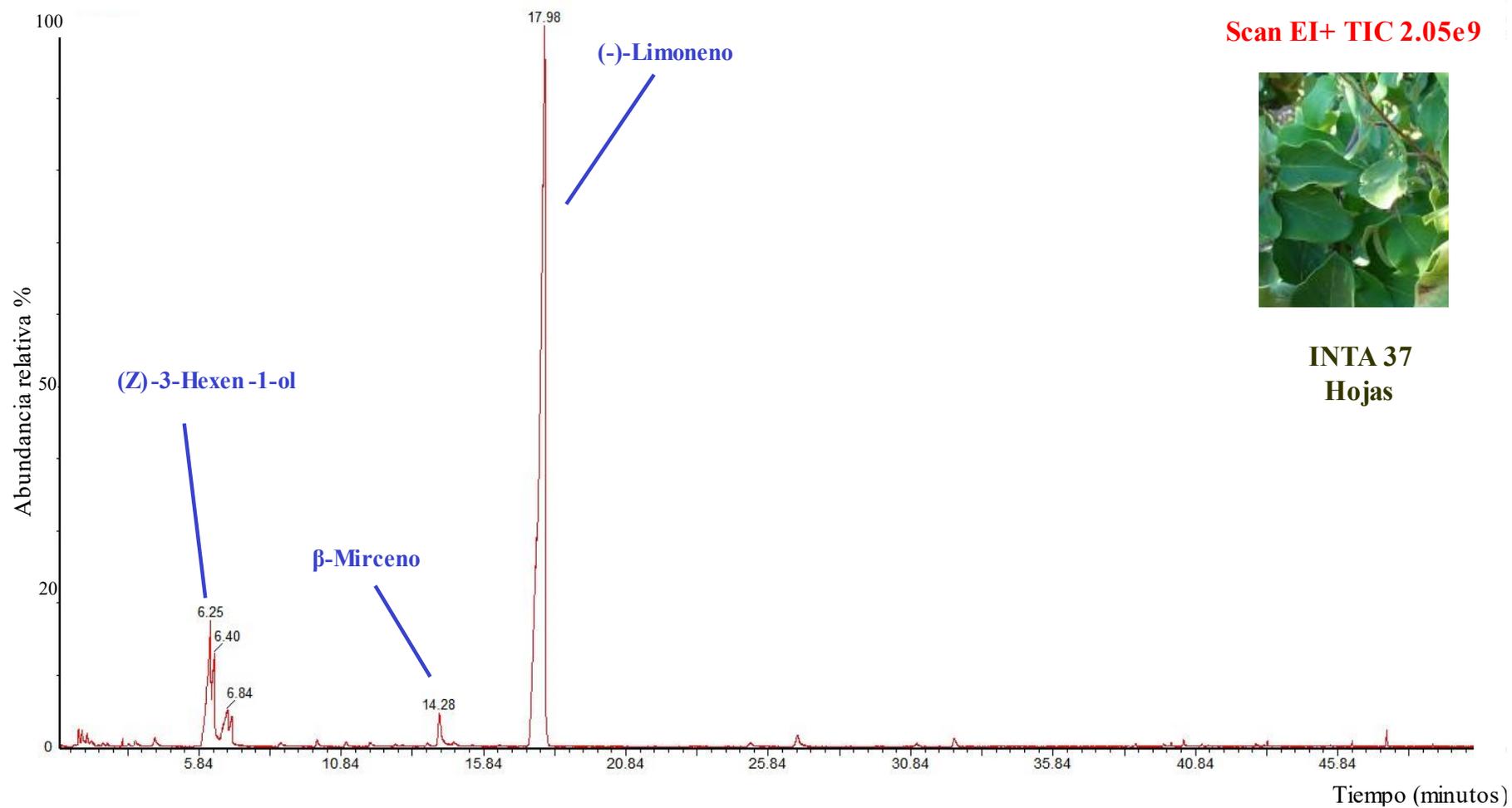
Apéndice Figura 4. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de frutos del cultivar INTA 37. Etapa de poscujaje a fruto inmaduro. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



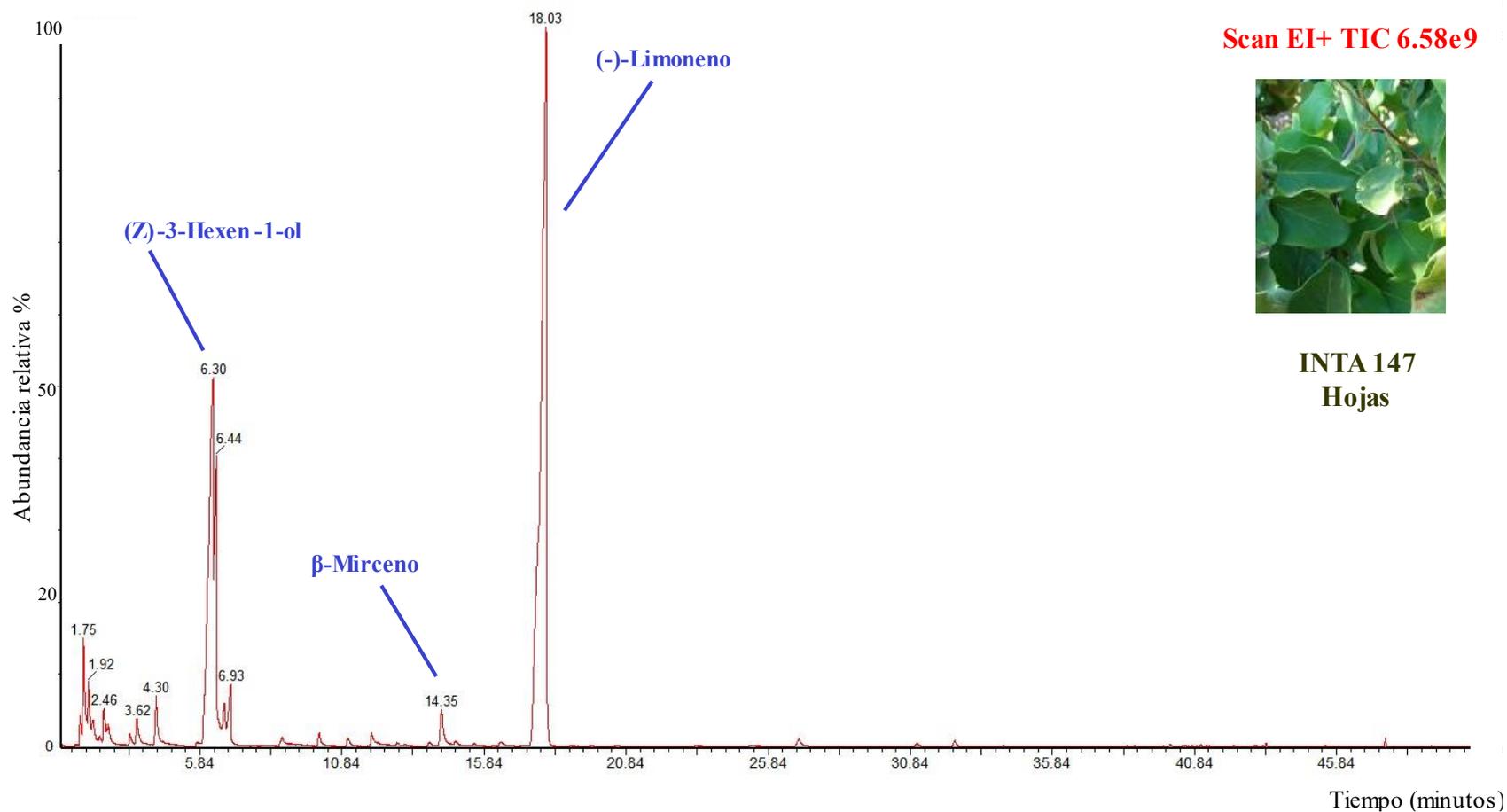
Apéndice Figura 5. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de frutos del cultivar INTA 147. Etapa de crecimiento. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



Apéndice Figura 6. Cromatograma del análisis del perfil volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de crecimiento. Eje “Y” representa la abundancia relativa y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



Apéndice Figura 7. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 37. Etapa de maduración. Eje “Y” representa la abundancia relativa (%) y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.



Apéndice Figura 8. Cromatograma del análisis del perfil de volátiles en la muestra de hojas del cultivar INTA 147. Etapa de maduración. Eje “Y” representa la abundancia relativa (%) y el Eje “X” muestra el tiempo de retención (en minutos), en el que fueron apareciendo los compuestos.

Bibliografia

- Acikgoz, C. 2011. Extraction and Characterization of Pectin Obtained from Quince Fruits (*Cydonia vulgaris* pers) Grown in Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 23: 149–152.
- Adams, R. P. 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing, USA
- Al Bitar, L., Gorb, S. N., Zebitz, C. P. W., & Voigt, D. 2012. Egg adhesion of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) to various substrates: I. Leaf surfaces of different apple cultivars. *Arthropod-Plant Interactions*, 6: 471–488.
- Al Bitar, L., Gorb, S. N., Zebitz, C. P. W., & Voigt, D. 2014. Egg adhesion of the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) to various substrates: II. Fruit surfaces of different apple cultivars. *Arthropod-Plant Interactions*, 8: 57–77.
- Al Bitar, L., Voigt, D., Zebitz, C. P. W., & Gorb, S. N. 2010. Attachment ability of the codling moth *Cydia pomonella* L. to rough substrates. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1966–1972.
- de Almeida Lopes, M. M., Guimarães Sanches, A., de Souza, K. O., & de Oliveira Silva, E. 2018. Quince: *Cydonia oblonga*. Pp. 363–368 in S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, and E. Sousa de Brito, editors. Exotic Fruits Reference Guide. Academic Press Inc., USA
- Alvarenga, Â. A., Abrahão, E., Pio, R., Aparecida Assis, F., & Caetano de Oliveira, N. 2008. Comparação entre doces produzidos a partir de frutos de diferentes espécies e cultivares de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Miller e *Chaenomeles sinensis* Koehne). *Ciência e Agrotecnologia*, 32: 302–307.
- AMDIS v. 2012. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System
- Andreadis, S. S., Knight, A. L., & Witzgall, P. 2014. Behavioral responses of *Cydia pomonella* and *Spodoptera littoralis* larvae to yeast volatiles. Entomological Society of America
- Ansebo, L., Coracini, M., Bengtsson, M., Liblikas, I., Ramirez, M., Borg-Karlson, A.-K., Tasin, M., & Witzgall, P. 2004. Antennal and behavioural response of codling moth *Cydia pomonella* to plant volatiles. *Journal of Applied Entomology*, 128: 488–493.
- Bäckman, A.-C., Bengtsson, M., Borg-Karlsson, A.-K., Liblikas, I., & Witzgall, P. 2001. Volatiles from Apple (*Malus domestica*) Eliciting Antennal Responses in Female Codling Moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of Plant Injury and Sampling Technique. *Zeitschrift für Naturforschung*, 56: 262–268.
- Bakthavatsalam, N. 2016. Semiochemicals. Pp. 563–611 Ecofriendly Pest Management for Food Security. Elsevier Inc., USA

- Baraldi, R., Rapparini, F., Rossi, F., Latella, A., & Cicciooli, P. 1999. Volatile organic compound emissions from flowers of the most occurring and economically important species of fruit trees. *Physics and Chemistry of the Earth*, 24: 729–732.
- Benedek, P., Szabó, T., & Nyéki, J. 2001. New results on the bee pollination of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Acta Horticulturae*, 561: 243–248.
- Bengtsson, M., Bäckman, A. C., Liblikas, I., Ramirez, M. I., Borg-Karlson, A. K., Ansebo, L., Anderson, P., Löfqvist, J., & Witzgall, P. 2001. Plant odor analysis of apple: Antennal response of codling moth females to apple volatiles during phenological development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3736–3741.
- Bisrat, D., & Jung, C. 2022. Roles of flower scent in bee–flower mediations: a review. *Journal of Ecology and Environment*, 46: 1–13.
- Blomefield, T. L., & Giliomee, J. H. 2011. Effect of Temperature on the Oviposition, Longevity and Mating of Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *African Entomology*, 19: 42–60.
- Blomefield, T. L., Pringle, K. L., & Sadie, A. 1997. Field observations on oviposition of codling moth, *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Olethreutidae), in an unsprayed apple orchard in South Africa. *African Entomology*, 5: 319–336.
- Brown, V. A., Lozano, J. E., & Genovese, D. B. 2014. Pectin extraction from quince (*Cydonia oblonga*) pomace applying alternative methods: Effect of process variables and preliminary optimization. *Food Science and Technology International*, 20: 83–98.
- Bruce, T. J. A. 2015. Interplay between insects and plants: Dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. *Journal of Experimental Botany*, 66: 455–465.
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. 2005. Insect host location: A volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10: 269–274.
- Buchbauer, G., Jirovetz, L., Wasicky, M., & Nikiforov, A. 1993. Headspace and Essential Oil Analysis of Apple Flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41: 116–118.
- Buttery, R. G., Light, D. M., Nam, Y., Merrill, G. B., & Roitman, J. N. 2000. Volatile components of green walnut husks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2858–2861.
- Cannon, R. J., & Ho, C. T. 2018. Volatile sulfur compounds in tropical fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26: 445–468.
- Carrasco, D., Larsson, M. C., & Anderson, P. 2015. Insect host plant selection in complex environments. *Current Opinion in Insect Science*, 8: 1–7.
- Casado, D. 2007. *Cydia pomonella* (L.) behavior and responses to host volatiles.

- Casado, D., Gemeno, C., Avilla, J., & Riba, M. 2006. Day-Night and Phenological Variation of Apple Tree Volatiles and Electroantennogram Responses in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 35: 258–267.
- Casado, D., Gemeno, C., Avilla, J., & Riba, M. 2008. Diurnal variation of walnut tree volatiles and electrophysiological responses in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Management Science*, 64: 736–747.
- Cavill, W. K., & Coggiola, I. M. 1971. Photosensitized oxygenation of α -farnesene. *Australian Journal of Chemistry*, 24: 136–142.
- Choi, J. Y., Lee, S. M., Lee, H. J., & Kim, Y. S. 2018. Characterization of aroma-active compounds in Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid) by aroma dilution analyses. *Food Research International*, 105: 828–835.
- Cichón, L., Garrido, S., Lago, J., & Fernández, D. 2015. *Cydia pomonella* Linnaeus (Gusano de la pera y la manzana o carpocapsa). Pp. 74–107 en M. Rossini, D. M. Dummel, and J. P. Agostini, editors. Plagas cuarentenarias de frutales de la República Argentina: Avances en los resultados. Ediciones INTA, Río Negro. Argentina.
- Cichón, L. I. 2004. Control de poblaciones de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) mediante la técnica de la confusión sexual en el Alto Valle del Río Negro y Neuquén. Universidad de Buenos Aires.
- Cinkmanis, I., Muizniece-Brasava, S., Viluma, I., Vucane, S., Aboltins, A., & Keke, A. 2020. Extraction of pectin from apple pomace. *Engineering for Rural Development*, 19: 1934–1939.
- Cólica, J. J. 2017. El cultivo del membrillero: una alternativa productiva para la agricultura familiar. Ediciones INTA, Catamarca-La Rioja. Argentina.
- Coracini, M., Bengtsson, M., Liblikas, L., & Witzgall, P. 2004. Attraction of codling moth males to apple volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 110: 1–10.
- Davis, T. S., Garczynski, S. F., Stevens-Rumann, C., & Landolt, P. J. 2013. A test of fruit varieties on entry rate and development by neonate larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148: 259–266.
- De Vega, C., Herrera, C. M., & Dötterl, S. 2014. Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16: 32–42.
- Departamento de Hidráulica. 2007. Relevamiento agrícola en la provincia de San Juan. Ciclo 2006-2007. Pp. 1–40. Departamento de Hidráulica de la Provincia de San Juan, San Juan. Argentina.
- Derridj, S., Lombarkia, N., Garrec, J. P., Galy, H., & Ferré, E. 2012. Sugars on leaf surfaces used as signals by the insect and the plant: Implications in orchard protection against *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). Pp. 1–38 en L. Cauterruccio, editor. Moths: types, ecological significance, and control methods. Nova Science Publishers, Inc., USA.

- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Tigchelaar, M., Battisti, D. S., Merrill, S. C., Huey, R. B., & Naylor, R. L. 2018. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science*, 361: 1–4.
- Díaz Duarte, A. D. 2018. Preferencias de variedades de *Cydonia oblonga* Mill. por adultos y larvas de *Cydia pomonella* a partir de sus perfiles semioquímicos
- Dicke, M., & A van Loon, J. J. 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 97: 237–249.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198: 16–32.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25: 417–440.
- Dudareva, N., & Pichersky, E. 2000. Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. *Plant Physiology*, 122: 627–633.
- Duron, M., Decourtye, L., & Druart, P. 1989. Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). Pp. 42–58 en M. Duron, L. Decourtye, and P. Druart, editors. Trees II. Springer- Verlag, Germany
- Dyck, V. A. 2010. Rearing codling moth for SIT.
- Ebel, R., Mattheis, J., & Buchanan, D. 1995. Drought stress of apple trees alters leaf emissions of volatile compounds. *Physiologia Plantarum*, 93: 709–712.
- El Hadi, M. A. M., Zhang, F. J., Wu, F. F., Zhou, C. H., & Tao, J. 2013. Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, 18: 8200–8229.
- El-Sayed, A. M., Cole, L., Revell, J., Manning, L. A., Twidle, A., Knight, A. L., Bus, V. G. M., & Suckling, D. M. 2013. Apple Volatiles Synergize the Response of Codling Moth to Pear Ester. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 643–652.
- El-Sayed, A. M., Knight, A. L., Byers, J. A., Judd, G. J. R., & Suckling, D. M. 2016. Caterpillar-induced plant volatiles attract conspecific adults in nature. *Scientific Reports*, 6: 1–14.
- Erb, M., & Reymond, P. 2019. Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 70: 1–31.
- Erdoğan, T., Gönenç, T., Hortoğlu, Z. S., Demirci, B., Başer, K. H. C., & Kivçak, B. 2012. Chemical Composition of the Essential Oil of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Leaves. *Medicinal & Aromatic Plants*, 1: 1–3.
- Espino-Díaz, M., Sepúlveda, D. R., González-Aguilar, G., & Olivas, G. 2016. Biochemistry of Apple Aroma: A Review. *Food Technology & Biotechnology*, 54: 375–394.

- FAO. 2021. FAOSTAT. Crops and livestock products Statistics. Quince production quantity. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (Accedido 17/11/2023)
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., & Cabras, P. 2007. Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenols extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 963–969.
- Fellman, J. K., Miller, T. W., Mattinson, D. S., & Mattheis, J. P. 2000. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience*, 35: 1026–1033.
- Fernández, D. E. 2012. *Cydia pomonella* (L.) LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE). Aspectos de su taxonomía, comportamiento y monitoreo aplicados a programas de control en grandes áreas
- Ferreira, L., Perestrelo, R., Caldeira, M., & Câmara, J. S. 2009. Characterization of volatile substances in apples from Rosaceae family by headspace solid-phase microextraction followed by GC-qMS. *Journal of Separation Science*, 32: 1875–1888.
- Finch, S., & Collier, R. H. 2008. Host Plant Selection by Insects. Pp. 1863–1873 in J. L. Capinera, editor. *Encyclopedia of Entomology*. Springer, USA
- Fraternal, D., Flamini, G., Ricci, D., & Giomaro, G. 2014. Flowers volatile profile of a rare red apple tree from marche region (Italy). *Journal of Oleo Science*, 63: 1195–1201.
- Geier, P. W. 1963. The Life History Of Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), In The Australian Capital Territory. *Australian Journal of Zoology*, 11: 323–367.
- Giacomuzzi, V., Cappellin, L., Khomenko, I., Biasioli, F., Schütz, S., Tasin, M., Knight, A. L., & Angeli, S. 2016. Emission of Volatile Compounds from Apple Plants Infested with *Pandemis heparana* Larvae, Antennal Response of Conspecific Adults, and Preliminary Field Trial. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 1265–1280.
- Giacomuzzi, V., Cappellin, L., Nones, S., Khomenko, I., Biasioli, F., Knight, A. L., & Angeli, S. 2017. Diel rhythms in the volatile emission of apple and grape foliage. *Phytochemistry*, 138: 104–115.
- Gómez, M. P., Barud, F. J., Díaz, A., & López, M. L. 2023. Oviposition and olfactometry response of codling moth (*Cydia pomonella*) to quince (*Cydonia oblonga*) cultivars. *Journal of Applied Entomology*, 147: 307–312.
- Griñán, I., Galindo, A., Rodríguez, P., Morales, D., Corell, M., Centeno, A., Collado-González, J., Torrecillas, A., Carbonell-Barrachina, A. A., & Hernández, F. 2019. Volatile composition and sensory and quality attributes of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) fruits as affected by water stress. *Scientia Horticulturae*, 244: 68–74.

- Gunes, N. T. 2008. Ripening regulation during storage in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) fruit. *Acta Horticulturae*, 796: 191–196.
- Gut, L. J. 1980. Oviposition of the codling moth, *Laspeyresia pomonella* (L.), on several varieties of apples and pears.
- Hamauzu, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C., & Omanyuda, M. 2005. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 928–934.
- Hare, J. D. 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 56: 161–180.
- He, Z., Wang, X., Ling, Z., Zhao, J., Guo, H., Shao, M., & Wang, Z. 2019. Contributions of different anthropogenic volatile organic compound sources to ozone formation at a receptor site in the Pearl River Delta region and its policy implications. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 19: 8801–8816.
- Heard, T. A. 1999. Concepts in Insect Host-Plant Selection Behavior and Their Application to Host Specificity Testing. Pp. 1–10 Host Specificity Testing of Exotic Arthropod Biological Control Agents: The Biological Basis for Improvement in Safety
- Heil, M. 2014. Herbivore-induced plant volatiles: Targets, perception and unanswered questions. *New Phytologist*, 204: 297–306.
- Hern, A., & Dorn, S. 1999. Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to alpha-farnesene. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92: 63–72.
- Hern, A., & Dorn, S. 2001. Induced emissions of apple fruit volatiles by the codling moth: changing patterns with different time periods after infestation and different larval instars. *Phytochemistry*, 57: 409–416.
- Hern, A., & Dorn, S. 2002. Induction of volatile emissions from ripening apple fruits infested with *Cydia pomonella* and the attraction of adult females. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102: 145–151.
- Hern, A., & Dorn, S. 2003. Monitoring seasonal variation in apple fruit volatile emissions in situ using solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis*, 14: 232–240.
- Hern, A., & Dorn, S. 2004. A female-specific attractant for the codling moth, *Cydia pomonella*, from apple fruit volatiles. *Naturwissenschaften*, 91: 77–80.
- Hernández, C. M. 2015. Estudios biológicos sobre los parasitoides, *Mastrus ridens* Horstman y *Ascogaster quadridentata* Wesmael, para evaluar su potencial como agentes de control biológico de *Cydia pomonella* (L.) plaga clave del manzano"
- Herrera, M. E., Dagatti, C. V., & Becerra, V. C. 2016. Método práctico de cría masiva de *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae) en condiciones de laboratorio. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 75: 160–164.

- Hogmire, H. W., & Miller, S. S. 2005. Relative Susceptibility of New Apple Cultivars to Arthropod Pests. *Hortscience*, 40: 2071–2075.
- Hughes, W. O. H., Gailey, D., & Knapp, J. J. 2003. Host location by adult and larval codling moth and the potential for its disruption by the application of kairomones. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 106: 147–153.
- Hummer, K. E., & Janick, J. 2009. Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics. Pp. 1–17 in K. M. Folta and S. E. Gardiner, editors. Genetics and Genomics of Rosaceae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Springer Science & Business Media, USA
- INDEC. 2021. Instituto Nacional de Estadística y Censos (Argentina). Censo Nacional Agropecuario 2018: resultados definitivos
- Jackson, D. M. 1979. Codling Moth Egg Distribution on Unmanaged Apple Trees. *Entomological Society of America*, 72: 361–368.
- Jamieson, M. A., Burkle, L. A., Manson, J. S., Runyon, J. B., Trowbridge, A. M., & Zientek, J. 2017. Global change effects on plant–insect interactions: the role of phytochemistry. *Current Opinion in Insect Science*, 23: 70–80.
- Joshi, N. K., Rajotte, E. G., Myers, C. T., Krawczyk, G., & Hull, L. A. 2015. Development of a susceptibility index of apple cultivars for codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) oviposition. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1–13.
- Khoubnasabjafari, M., & Jouyban, A. 2011. A review of phytochemistry and bioactivity of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3577–3594.
- Klatt, B. K., Burmeister, C., Westphal, C., Tschardtke, T., & von Fragstein, M. 2013. Flower Volatiles, Crop Varieties and Bee Responses. *PLoS ONE*, 8: 1–7.
- Knight, A. L., & Light, D. M. 2001. Attractants from Bartlett pear for codling moth, *Cydia pomonella* (L.), larvae. *Naturwissenschaften*, 88: 339–342.
- Knight, A. L., Light, D. M., Judd, G. J. R., & Witzgall, P. 2018. Pear Ester-From Discovery to Delivery for Improved Codling Moth Management. Pp. 83–113 in J. Beck, S. Duke, and C. Rering, editors. Roles of Natural Products for Biorational Pesticides in Agriculture. American Chemical Society
- Landolt, P. J., Brumley, J. A., Smithhisler, C. L., Biddick, L. L., & Hofstetter, R. W. 2000. Apple fruit infested with codling moth are more attractive to neonate codling moth larvae and possess increased amounts of (E,E)- α -Farnesene. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 1685–1699.
- Landolt, P. J., & Guédot, C. 2008. Field attraction of codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) to apple and pear fruit, and quantitation of Kairomones from attractive fruit. *Annals of the Entomological Society of America*, 101: 675–681.
- Landolt, P. J., Hofstetter, R. W., & Biddick, L. L. 1999. Plant Essential Oils as Arrestants and Repellents for Neonate Larvae of the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 28: 954–960.

- Landolt, P. J., Hofstetter, R. W., & Chapman, P. S. 1998. Neonate codling moth larvae (Lepidoptera: Tortricidae) orient anemotactically to odor of immature apple fruit. *Pan-Pacific Entomologist*, 74: 140–149.
- Lanvín, A., & Matsuya, K. 2004. Frutales: Especies con potencial en el secano interior. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 120, Chillán, Chile
- Lara, I., Ortiz, A., Echeverría, G., López, M. L., & Graell, J. 2008. Development of aroma-synthesising capacity throughout fruit maturation of “Mondial Gala” apples. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83: 253–259.
- Lee, J., Vázquez-Araújo, L., Adhikari, K., Warmund, M., & Elmore, J. 2011. Volatile Compounds in Light, Medium, and Dark Black Walnut and Their Influence on the Sensory Aromatic Profile. *Journal of Food Science*, 76: 199–204.
- Leonel, M., Leonel, S., Tecchio, M. A., Mischan, M. M., Moura, M. F., & Xavier, D. 2016. Characteristics of quince fruits cultivars’ (*Cydonia oblonga* Mill.) grown in Brazil. *Australian Journal of Crop Science*, 10: 711–716.
- Li, S., Yuan, X., Xu, Y., Li, Z., Feng, Z., Yue, X., & Paoletti, E. 2021. Biogenic volatile organic compound emissions from leaves and fruits of apple and peach trees during fruit development. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 108: 152–163.
- Light, D. M., & Beck, J. J. 2010. Characterization of Microencapsulated Pear Ester, (2E,4Z)-Ethyl-2,4- decadienoate, a Kairomonal Spray Adjuvant Against Neonate Codling Moth Larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7838–7845.
- Light, D. M., & Beck, J. J. 2012. Behavior of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) neonate larvae on surfaces treated with microencapsulated pear ester. *Environmental Entomology*, 41: 603–611.
- Light, D. M., & Knight, A. 2005. Specificity of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) for the host plant kairomone, ethyl (2E,4Z)-2,4-decadienoate: Field bioassays with pome fruit volatiles, analogue, and isomeric compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4046–4053.
- Light, D. M., Knight, A. L., Henrick, C. A., Rajapaska, D., Lingren, B., Dickens, J. C., Reynolds, K. M., Buttery, R. G., Merrill, G., Roitman, J., & Campbell, B. C. 2001. A pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Naturwissenschaften*, 88: 333–338.
- Lombarkia, N., & Derridj, S. 2002. Incidence of apple fruit and leaf surface metabolites on *Cydia pomonella* oviposition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104: 79–87.
- Lombarkia, N., & Derridj, S. 2008. Resistance of apple trees to *Cydia pomonella* egg-laying due to leaf surface metabolites. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128: 57–65.

- López, M. L., Gómez, M. P., Díaz, A., Jofré Barud, F., Camina, J. L., & Dambolena, J. S. 2022. Changes in the volatile profile of four cultivars of quince (*Cydonia oblonga*) produced by codling moth (*Cydia pomonella*) infestation. *Phytochemistry Letters*, 49: 187–191.
- Lu, P. F., Huang, L. Q., & Wang, C. Z. 2012. Identification and field evaluation of pear fruit volatiles attractive to the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 1003–1016.
- Lu, P. F., Qiao, H. L., Xu, Z. C., Cheng, J., Zong, S. X., & Luo, Y. Q. 2014. Comparative analysis of peach and pear fruit volatiles attractive to the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Journal of Plant Interactions*, 9: 388–395.
- Martí Martí, S. 2000. Host Selection. Reproductive Biology, Host-specific Development and Mortality of the Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), in Apple
- Martínez-Valero, R., Melgarejo, P., Salazar, D. M., Martínez, R., Martínez, J. J., & Hernández, F. C. A. 2001. Phenological stages of the quince tree (*Cydonia oblonga*). *Annals of Applied Biology*, 139: 189–192.
- Mattheis, J. P., Fellman, J. K., Chen, P. M., & Pattersonl, M. E. 1991. Changes in Headspace Volatiles during Physiological Development of Bisbee Delicious Apple Fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 39: 1902–1906.
- Mihara, S., Tateba, H., Nishimura, O., Machii, Y., & Kishino, K. 1987. Volatile Components of Chinese Quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid). *J. Agric. Food Chem*, 35: 532–537.
- Miller, R. L., Bills, D. D., & Buttery, R. G. 1989. Volatile Components from Bartlett and Bradford Pear Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 1476–1479.
- Mir, S. A., Wani, S. M., Ahmad, M., Wani, T. A., Gani, A., Mir, S. A., & Masoodi, F. A. 2015. Effect of packaging and storage on the physicochemical and antioxidant properties of quince candy. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 7313–7320.
- Mithöfer, A., & Boland, W. 2012. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 431–450.
- Mpelasoka, B. S., & Behboudian, M. H. 2002. Production of aroma volatiles in response to deficit irrigation and to crop load in relation to fruit maturity for “Braeburn” apple. *Postharvest Biology and Technology*, 24: 1–11.
- Muhlemann, J. K., Klempien, A., & Dudareva, N. 2014. Floral volatiles: From biosynthesis to function. *Plant, Cell and Environment*, 37: 1936–1949.
- Najar-Rodriguez, A., Orschel, B., & Dorn, S. 2013. Season-Long Volatile Emissions from Peach and Pear Trees In Situ, Overlapping Profiles, and Olfactory Attraction of

- an Oligophagous Fruit Moth in the Laboratory. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 418–429.
- NIST v. 2009. The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. The National Institute of Standards and Technology (NIST)
- Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., & Silva, B. M. 2007. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7926–7930.
- Omata, A., Yomogida, K., Nakamura, S., Hashimoto, S., Koba, S., Furukawa, K., & Noro, S. 1990. Volatile Components of Apple Flowers. *Flavour and Fragrance Journal*, 5: 19–22.
- Pasqualini, E., Villa, M., Civolani, S., Espinha, I., Ioriatti, C., Schmidt, S., Molinari, F., De Cristofaro, A., Sauphanor, B., & Ladurner, E. 2005. The pear ester ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate as a potential tool for the control of *Cydia pomonella* larvae: preliminary investigation. *Bulletin of Insectology*, 58: 65–69.
- Pelliccia, C., Antonielli, L., Corte, L., Bagnetti, A., Fatichenti, F., & Cardinali, G. 2011. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. *Annals of Microbiology*, 61: 965–972.
- Piñero, J. C., & Dorn, S. 2009. Response of female oriental fruit moth to volatiles from apple and peach trees at three phenological stages. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131: 67–74.
- Pio, R., Chagas, E. A., Barbosa, W., Signorini, G., Alvarenga, Â. A., Abrahão, E., Cazetta, J. O., & Entelmann, F. A. 2007. Emergência e desenvolvimento de plântulas de cultivares de marmeleiro para uso como porta-enxertos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29: 133–136.
- Piskorski, R., Trematerra, P., & Dorn, S. 2010. Cuticular hydrocarbon profiles of codling moth larvae, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), reflect those of their host plant species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 376–384.
- Poitout, S., Bues, R., & Le Rumeur, C. 1972. Élevage sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton *Earias insulana* et *Spodoptera littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 15: 341–350.
- Postman, J. 2009. The Unappreciated Quince. *Arnoldia*, 67: 2–9.
- Postman, J. D. 2012. Quince (*Cydonia oblonga* mill.) center of origin provides sources of disease resistance. *Acta Horticulturae*, 948: 229–234.
- Preti, M., Knight, A. L., Mujica, M. V., Basoalto, E., Larsson Herrera, S., Tasin, M., & Angeli, S. 2021. Development of multi-component non-sex pheromone blends to monitor both sexes of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Applied Entomology*, 145: 822–830.
- PROCAL, P. de G. de calidad y diferenciación de los alimentos. 2016. Contrucción colectiva de la denominación de origen del dulce de membrillo de la provincia de San Juan. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, San Juan. Argentina

- Quintana, G., & Cólica, J. J. 2011. Carpocapsa, plaga clave en nogal. Ediciones INTA, Catamarca. Argentina
- Raguso, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: The ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 549–569.
- Rapparini, F., Baraldi, R., & Facini, O. 2001. Seasonal variation of monoterpene emission from *Malus domestica* and *Prunus avium*. *Phytochemistry*, 57: 681–687.
- Reed, H. C., & Landolt, P. J. 2002. Attraction of mated female codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) to apples and apple odor in a flight tunnel. *Florida Entomologist*, 85: 324–329.
- Rodríguez-Guisado, I., Hernández, F., Melgarejo, P., Legua, P., Martínez, R., & Martínez, J. J. 2009. Chemical, morphological and organoleptical characterisation of five Spanish quince tree clones (*Cydonia oblonga* Miller). *Scientia Horticulturae*, 122: 491–496.
- Sabir, S., Qureshi, R., Arshad, M., Amjad, M. S., Fatima, S., Masood, M., Saboon, & Chaudhari, S. K. 2015. Pharmacognostic and clinical aspects of *Cydonia oblonga*: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5: 850–855.
- SAGyP. 2018. Dulce de Membrillo Rubio de San Juan. Secretaria de Agricultura Ganadería y Pesca
- Schmera, D., & Guerin, P. M. 2012. Plant volatile compounds shorten reaction time and enhance attraction of the codling moth (*Cydia pomonella*) to codlemone. *Pest Management Science*, 68: 454–461.
- Schoonhoven, L. M., van Loon, J. J. A., & Dicke, M. 2005. Insect-Plant Biology. Oxford University Press, New York, USA
- Schreyen, al L., Dirinck, P., Sandra, P., & Schamp, N. 1979. Flavor Analysis of Quince. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 872–876.
- Schuch, M. W., Cellini, A., Masia, A., & Marino, G. 2010. Aluminium-induced effects on growth, morphogenesis and oxidative stress reactions in in vitro cultures of quince. *Scientia Horticulturae*, 125: 151–158.
- Shimizu, S., & Yoshihara, S. 1977. The constituents of the essential oil from japanese quince fruit, *Cydonia oblonga* miller. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41: 1525–1527.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Martins, R. C., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. 2006. Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam. *Food Chemistry*, 94: 504–512.
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4705–4712.

- Su, W., Ma, W., Zhang, Q., Hu, X., Ding, G., Jiang, Y., & Huang, J. 2022. Honey Bee Foraging Decisions Influenced by Pear Volatiles. *Agriculture (Switzerland)*, 12: 1–13.
- Suckling, D. M. 2015. Sex pheromones and semiochemicals offer an elegant future for pest management and biosecurity. *Acta Horticulturae*, 1105: 275–282.
- Sutherland, O. R. W., & Hutchins, R. F. N. 1972. α -Farnesene, a Natural Attractant for Codling Moth Larvae. *Nature*, 239: 1–1.
- Tasin, M., Lucchi, A., Ioriatti, C., Mraih, M., cristofaro, A. D., Boger, Z., & Anfora, G. 2011. Oviposition response of the moth *Lobesia botrana* to sensory cues from a host plant. *Chemical Senses*, 36: 633–639.
- Tateo, F., & Bononi, M. 2010. Headspace-SPME analysis of volatiles from quince whole fruits. *Journal of Essential Oil Research*, 22: 416–418.
- Taylor, R., Herms, D., Cardina, J., & Moore, R. 2018. Climate Change and Pest Management: Unanticipated Consequences of Trophic Dislocation. *Agronomy*, 8: 1–23.
- Tsuneza, T., Ishihara, M., Shiota, H., & Shiga, M. 1983. Volatile components of quince fruit (*Cydonia oblonga* mill.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 47: 2495–2502.
- Umamo, K., Shoji, A., Hagi, Y., & Shibamoto, T. 1986. Volatile constituents of peel of quince. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 593–596.
- Urretabizkaya, N., Vasicek, A., & Saini, E. 2010. Insectos perjudiciales de importancia Agronómica. 1. Lepidópteros. Ediciones INTA, Buenos Aires. Argentina
- USDA. 2023. Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. Germplasm Resources Information Network (GRIN Taxonomy). <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=12779> (Accedido 18/09/2023)
- Vacas Gonzáles, S. 2011. Uso de semioquímicos en el control de plagas. Estudios básicos y de aplicación
- Vallat, A., & Dorn, S. 2005. Changes in volatile emissions from apple trees and associated response of adult female codling moths over the fruit-growing season. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4083–4090.
- Veličković, D. T., Ristić, M. S., Milosavljević, N. P., Davidović, D. N., Milenović, D. M., & Veličković, A. S. 2016. Volatiles of quince fruit and leaf (*Cydonia oblonga* Mill.) from Serbia. *Biologica Nyssana*, 7: 145–149.
- Villatoro, C., Altisent, R., Echeverría, G., Graell, J., López, M. L., & Lara, I. 2008. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of “Pink Lady®” apples. *Postharvest Biology and Technology*, 47: 286–295.

- Walker, W. B., Gonzalez, F., Garczynski, S. F., & Witzgall, P. 2016. The chemosensory receptors of codling moth *Cydia pomonella*-expression in larvae and adults. *Scientific Reports*, 6: 1–15.
- Wearing, C. H. 2016. Distribution Characteristics of Eggs and Neonate Larvae of Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *International Journal of Insect Science*, 8: 33–53.
- Wearing, C. H., Hansen, J. D., Whyte, C., Miller, C. E., & Brown, J. 2001. The potential for spread of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) via commercial sweet cherry fruit: A critical review and risk assessment. *Crop Protection*, 20: 465–488.
- Wearing, C. H., & Hutchins, R. F. N. 1973. α -Farnesene, a naturally occurring oviposition stimulant for the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Journal of Insect Physiology*, 9: 1251–1256.
- Wei, J., Xu, J., & Zhang, R. 2015. Oviposition Site Selection of the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) and its Consequences for Egg and Neonate Performance. *Journal of Economic Entomology*, 108: 1915–1922.
- Wertheim, S. J. 2002. Rootstocks for European Pear: a Review. *Acta horticulturae*, 596: 299–309.
- Witzgall, P., Ansebo, L., Yang, Z., Angeli, G., Sauphanor, B., & Bengtsson, M. 2005. Plant volatiles affect oviposition by codling moths. *Chemoecology*, 15: 77–83.
- Witzgall, P., Proffit, M., Rozpedowska, E., Becher, P. G., Andreadis, S., Coracini, M., Lindblom, T. U. T., Ream, L. J., Hagman, A., Bengtsson, M., Kurtzman, C. P., Piskur, J., & Knight, A. 2012. “This is not an apple”-yeast mutualism in codling moth. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 949–957.
- Witzgall, P., Stelinski, L., Gut, L., & Thomson, D. 2008. Codling moth management and chemical ecology. *Annual Review of Entomology*, 53: 503–522.
- Yan, F., Bengtsson, M., & Witzgall, P. 1999. Behavioral response of female codling moths, *Cydia pomonella*, to apple volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 1343–1351.
- Yang, S., Meng, Z., Li, Y., Chen, R., Yang, Y., & Zhao, Z. 2021. Evaluation of physiological characteristics, soluble sugars, organic acids and volatile compounds in ‘orin’ apples (*Malus domestica*) at different ripening stages. *Molecules*, 26: 1–11.