

IDENTIFICACIÓN DE UNA POTENCIAL FEROMONA SEXUAL DE *Copitarsia corruda* POR CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ELECTROANTENOGRAFÍA, CON MIRAS AL MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS DEL ESPÁRRAGO

Giovana Espinoza¹, Joanna Gambetta¹, Rosario Rojas^{1*}

RESUMEN

Copitarsia corruda (Lepidoptera: Noctuidae) es una plaga que afecta al espárrago, causando graves pérdidas económicas a los agricultores. Con miras a su control por medio de feromonas sexuales, se estudió la composición de los compuestos volátiles de un extracto diclorometánico de las glándulas sexuales de insectos hembras, por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Este mismo extracto fue luego sometido a un análisis por cromatografía de gases acoplada a un electroantenodetector para evaluar la respuesta de las antenas de machos de *C. corruda* ante el estímulo de los compuestos contenidos en el extracto. Se pudo observar que los insectos machos de *C. corruda* reaccionan positivamente ante la presencia del compuesto (Z)-9-tetradecenil acetato. Este compuesto al parecer sería la principal feromona sexual presente en las glándulas sexuales de los insectos hembras. Estos hallazgos serán corroborados por experimentos en campo.

Palabras clave: *Copitarsia corruda*, electroantenografía, espárrago, feromona sexual

IDENTIFICATION OF A POTENTIAL SEXUAL PHEROMONE OF *Copitarsia corruda* BY GAS CHROMATOGRAPHY AND ELECTROANTENNOGRAPHY, FOR THE INTEGRATED ASPARAGUS PEST MANAGEMENT

ABSTRACT

Copitarsia corruda (Lepidoptera: Noctuidae) is a pest of asparagus, that causes serious economic losses to farmers. With the aim of controlling this insect by means of sex pheromones, the female sex glands volatiles were extracted with dichloromethane and analyzed by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry. This same extract was then subjected to an analysis by gas chromatography coupled to Electroantennography to evaluate the response of the male antennae of *C. corruda* to the stimulus of the compounds contained in the extract. It was observed that male insects of respond positively to (Z)-9-tetradecenyl acetate. This compound appears to be the main sexual pheromone in the sex glands of female insects. These findings will be confirmed by field experiments.

Key words: Asparagus, *Copitarsia corruda*, electroantennography, sexual pheromone

¹ Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorio de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú

* rosario.rojas @upch.pe

INTRODUCCIÓN

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.) es actualmente uno de los principales cultivos peruanos, alcanzando en el año 2011 las exportaciones de espárrago fresco un valor total de US\$ 291 078 625 (IPEH, 2012).¹ Una de las principales plagas que ataca al espárrago es el lepidóptero *Copitarsia corruda*. Este insecto, considerado hasta el momento como una plaga cuarentenaria en EEUU (principal mercado de destino de las exportaciones de espárrago) significa una barrera para su comercialización, ya que su presencia implica un fuerte tratamiento con bromuro de metilo en el puerto de destino, lo cual va en detrimento de su calidad y posterior valor de mercado.¹

El control de *C. corruda* se realiza principalmente a través del uso de pesticidas químicos (metomil, clorpirifós, benzoato de emamectina, lufenuron) cuyos efectos negativos sobre la salud del consumidor y el medio ambiente son ya conocidos.²⁻⁵ La utilización de pesticidas organofosforados y organoclorados se encuentra cada vez más restringida en países como EEUU y la comunidad europea, en donde se fomentan estrategias alternativas del control de plagas, como el uso de semioquímicos.

El uso de semioquímicos como las feromonas sexuales para el control de pestes agrícolas es una técnica que ha tenido un rol creciente en el manejo de plagas ya que aumenta la efectividad de los pesticidas utilizados y disminuye el impacto ambiental de los mismos.⁶ Esta técnica consiste en la atracción del insecto hacia trampas cebadas con el (los) compuesto(s) feromonal(es), previamente identificados y sintetizados.⁷

El aislamiento e identificación de feromonas presenta algunos problemas, como el hecho de que éstas se encuentran, por lo general, a nivel de trazas, acompañadas de grandes cantidades de compuestos sin actividad biológica. Dado que la mayor parte de las feromonas son térmicamente estables y se volatilizan a una temperatura inferior a 300 °C, la cromatografía de gases constituye la técnica de separación ideal gracias a su alta sensibilidad.⁸ La técnica para la identificación de feromonas sexuales de insectos se basa en que la antena del insecto macho, al ser estimulada por ciertos compuestos volátiles presentes en la glándula sexual del insecto hembra, produce un potencial eléctrico que puede ser registrado en un electroantenograma (EAG). El tamaño de dicho potencial eléctrico es proporcional a la concentración de la feromona potencial.^{6,9,10}

El objetivo del presente trabajo de investigación fue: primero determinar la composición de compuestos volátiles presentes en las glándulas sexuales de *Copitarsia corruda* hembras por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para posteriormente identificar las potenciales feromonas sexuales de dicha especie por medio de experimentos con cromatografía de gases acoplada a un electroantenodetector.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A* acoplado a detector FID y a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*. Electroantenodetector (Syntech).

Reactivos. Se utilizaron como estándares el (Z)-9-tetradecenil acetato y D-limoneno (Sigma). Los solventes diclorometano, éter de petróleo y etanol fueron de grado HPLC (Merck, Perú).

Crianza de insectos. Las larvas de *C. corruda* fueron colectadas en campos de cultivo de espárrago de Piura e Ica e identificadas por los biólogos del Instituto Peruano del Espárrago y Hortalizas (IPEH). Las larvas fueron alimentadas con dieta natural (espárrago) y cuando pasaron a estadio pupal fueron sexadas y colocadas en forma individual en vasos de plástico y mantenidas a 25 ± °C y fotoperiodo de 12:12 (L:O) h. Cuando emergieron los adultos fueron alimentados a base de una dieta consistente en polen, miel de abeja y agua en proporción 1:1:3,

embebido en una torunda de algodón. Las hembras adultas vírgenes fueron mantenidas en fotoperiodo invertido 12:12 (O:L). Para los experimentos de cromatografía de gases acoplada a un electroantodetector, se utilizaron insectos adultos machos y hembras vírgenes de dos a cinco días de edad.

Preparación de extracto glandular. Las bolsas eversibles de 100 hembras vírgenes de *C. corruda* se obtuvieron mediante disección. Luego, las glándulas sexuales fueron extraídas con 2 mL de diclorometano y agitación con ultrasonido por 30 min. Luego de la filtración, el solvente fue evaporado en corriente de nitrógeno hasta un volumen aproximado de 1,5 mL.

Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Para el análisis de la composición de los extractos se inyectó 1 μ L del extracto glandular en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se empleó una columna apolar DB5-MS (60 m, diámetro interno 250 μ m y espesor de película 0,25 μ m). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C y la inyección se realizó en modo splitless. El programa de temperaturas del horno fue como sigue: temperatura inicial de 50 °C, mantenida por 3 minutos; posteriormente se incrementó 5 °C/min hasta 240 °C, manteniendo la temperatura final por 5 min. Se utilizó helio como gas de arrastre a un flujo constante de 1 mL/min.

Los constituyentes del extracto glandular fueron identificados utilizando el software proporcionado por Agilent: MSD Chemstation (versión E02.00.493), por comparación de los espectros de masas de cada pico con los resultados de la librería de espectros de masa de la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, versión 2.0f, 2008), y de estar disponibles, por comparación con el espectro de masas y tiempo de retención de estándares (Sigma).

Análisis por cromatografía de gases con detector de ionización de llama acoplado a electroantodetector (GC-FID-EAD): Para el análisis por GC-FID-EAD se montó primero la antena en los electrodos del equipo. Para la amplificación de los potenciales EAG se utilizó un arreglo electrónico que consiste de un pre-amplificador, un amplificador principal, un filtro de frecuencia y un amplificador de ajuste. Tanto el pre-amplificador (impedancia de entrada de 100 M Ω) como el amplificador principal proporcionan una amplificación de un factor de 10, lo que resulta en una amplificación total de 100. La verificación de la viabilidad de las antenas se hizo por observación de la línea base en el programa EAG 2.0 (Syntech). La viabilidad de las antenas se verificó estimulando la antena por insuflación de aire limpio con una pipeta Pasteur. Además, se comprobó la respuesta de la antena al compuesto en estudio mediante su insuflación.

Se inyectó 1 μ L de extracto o de solución estándar diluida en el cromatógrafo de gases 7890 A acoplado al detector FID. Tanto la columna como las condiciones cromatográficas fueron las mismas detalladas anteriormente. El splitter (Agilent) colocado al final de la columna cromatográfica distribuyó (1:1) los compuestos eluidos tanto al detector FID como a la línea de transferencia del electroantodetector que incluía la antena del insecto macho. Los resultados obtenidos en el detector FID y el EAD se registraron simultáneamente en el monitor de la computadora usando el programa EAG 2.0 (Syntech).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según nuestros resultados, es necesario un mínimo de 100 hembras adultas vírgenes de 2 a 5 días de edad para poder obtener una concentración suficiente para el análisis por GC-MS y GC-FID-EAD. Se observó que las antenas eran viables solamente durante aproximadamente una hora luego de su escisión del insecto. La sensibilidad de las mismas disminuyó a lo largo del tiempo, por lo que se decidió efectuar como máximo, tres mediciones por antena.

En el análisis por GC-MS de los compuestos volátiles de las glándulas sexuales de *C. corruda* hembras se detectaron 33 compuestos, de los cuales los principales fueron miristato de colesterol (22,6%), D-limoneno (17,1%), 2-hexadecanol (14,5%) y *o* eimol (4,87%) (figura 1, tabla 1).

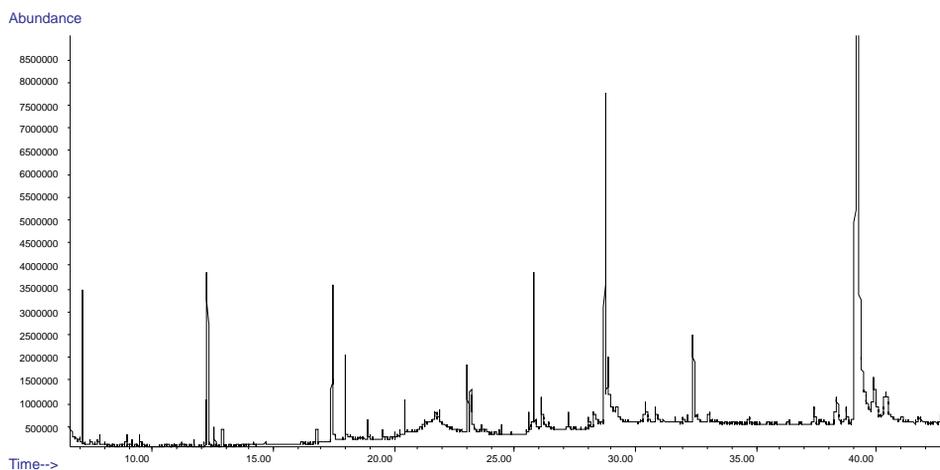


Figura 1. Cromatograma GC-MS de los compuestos volátiles de las glándulas sexuales de *Copitarsia corruda*

Al parecer, la mayor parte de los componentes encontrados fueron terpenos, que en total representan, aproximadamente, el 41% de la composición de la glándula y que se derivan del alimento (planta hospedera) consumido por el insecto, tal como indica Wadhams (1990) en su estudio sobre *Scolytus scolytus* ⁶.

Tabla 1 .Composición de compuestos volátiles de glándulas sexuales de insectos hembras de *Copitarsia corruda*

No.	Nombre científico del compuesto	t _R (min)	Área relativa (%)
1	3-Metil-2-butanona	7,48	0,45
2	Cloruro de metileno	7,79	0,50
3	(Z)-tetradecenal	10,38	0,55
4	â-Mirceno	11,72	0,51
5	1,4-Cineol	12,10	0,25
6	Acetato de 1-terpinen-4-ol	12,13	0,33
7	(Z)-Geraniol	12,16	0,07
8	<i>o</i> -Cimol	12,25	4,87
9	D-Limoneno	12,32	17,1

sigue ...

... viene

10	á-Terpineno	12,61	3,25
11	Terpinoleno	12,90	3,36
12	Indeterminado	12,94	0,49
13	1-Terpinen-4-ol	13,98	1,01
14	á-Terpineol	14,07	3,74
15	Indeterminado	14,12	0,47
16	Isovanillina	15,97	0,78
17	2-[(trimetilsilil)oxi]-1- [[[(trimetilsilil)oxi]metil]etil éster del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	16,19	0,56
18	4-Etoxi-, etil éster del ácido benzoico	16,95	0,20
19	4-Etoxibenzoato de etilo	16,98	0,96
20	4-(4-Hydroxyfenil)-2-butanona	17,18	2,17
21	d-Undecalactona	17,37	0,16
22	Ac. 9-hexadecenoico	18,02	0,86
23	(Z)-9-tetradecen-1-ol	18,94	0,33
24	(Z)-9-tetradecen-1-ol	19,88	0,50
25	(Z)-11-Hexadecen-1-ol	20,48	0,65
26	Indeterminado	21,32	2,20
27	Linolenato de metilo	21,37	3,97
28	12-Metil-, metil éster del ácido tetradecanoico	21,51	0,39
29	Heptacosano	25,81	2,23
30	Heneicosano	28,77	6,81
31	Indeterminado	32,45	3,35
32	2-Hexadecanol	35,33	14,5
33	Miristato de colesterol	39,32	22,6

Como se observa en las figuras 2 y 3, mediante el GC-FID se detectaron cuatro compuestos en la glándula sexual de *C. corruda* hembras, que generaron una respuesta positiva en las antenas de los machos (EAD). La estructura de los compuestos detectados en el GC-FID fueron identificadas en el GC-MS como: (Z)-9-tetradecenal, (Z)-9-tetradecen-1-ol, (Z)-9-tetradecenil acetato y (Z)-11-hexadecen-1-ol (t_R = 10,33; 18,94; 19,88 y 20,48 minutos, respectivamente). Según la clasificación publicada por Ando *et al.* (2004),¹¹ estos compuestos se encuentran dentro del grupo de las feromonas Tipo I de insectos de la familia Lepidóptera, que corresponden a alcoholes primarios y sus derivados (principalmente acetatos y aldehídos) de cadena larga (C_{10} - C_{18}), sin ramificaciones.

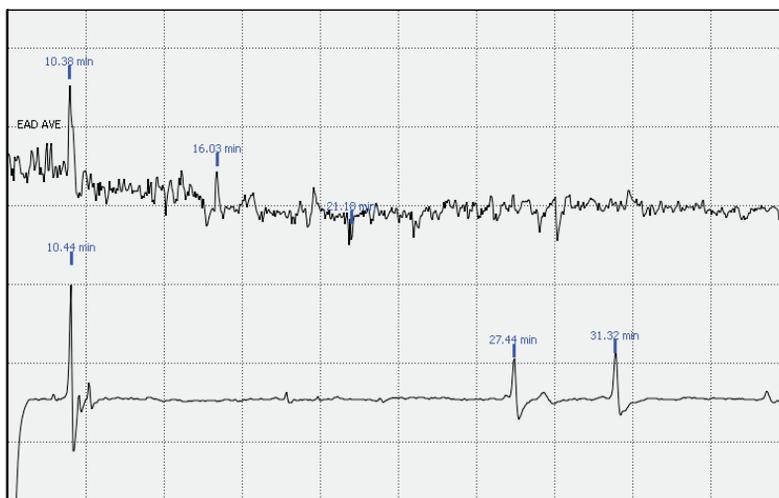


Figura 2. Cromatograma (1) GC-FID-EAD del extracto glandular de *C. corruda* (hembras)

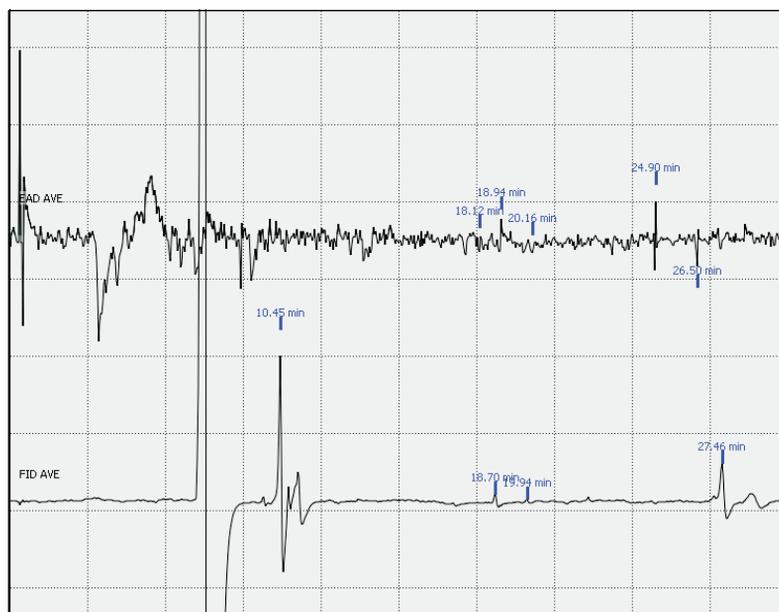


Figura 3. Cromatograma (2) GC-FID-EAD del extracto glandular de *C. corruda* (hembras)

De los compuestos identificados, tanto (Z)-9-tetradecenil acetato como (Z)-9-tetradecen-1-ol serían los mismos encontrados por Rojas *et al.* (2006) para *C. decolora*, y por otros autores en otras especies de noctuidos. Como ocurre para *C. incommoda* y *C. decolora*, esta última y *C. corruda* son dos especies relacionadas filogenéticamente y probablemente compartan las mismas feromonas, con una pequeña variación en la proporción de cada componente resultante de la especiación.^{10,12}

De los cuatro compuestos detectados como posibles feromonas sexuales de *C. corruda*, sólo se contaba con el estándar de (Z)-9-tetradecenil acetato. Mediante insuflación de dicho estándar se verificó si éste generaba alguna reacción por parte de las antenas de especímenes machos en el análisis GC-FID-EAD. Como se puede ver en la figura 4, al ser expuesto a este compuesto, las antenas muestran una clara reacción, emitiendo la señal correspondiente (t_R 19.97 min) en el EAD. La imposibilidad de conseguir los estándares químicos puros no nos permitieron llevar a cabo este mismo proceso de confirmación para el (Z)-9-tetradecenal, (Z)-9-tetradecen-1-ol y (Z)-11-hexadecen-1-ol.

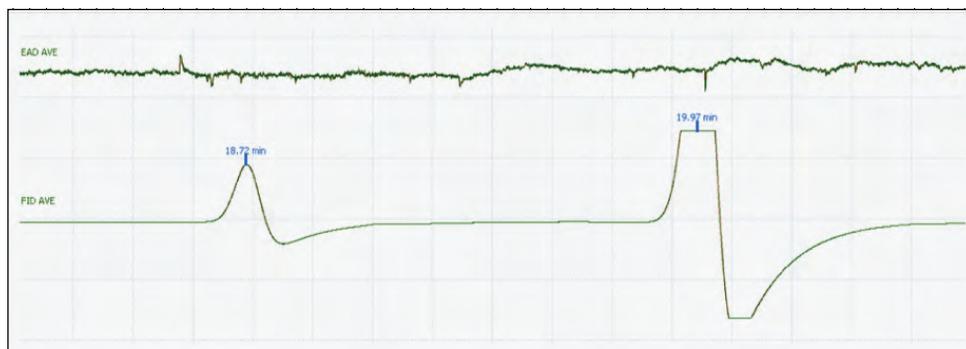


Figura 4. Cromatograma GC-FID-EAD de la inyección del estándar (Z)-9-tetradecenil acetato

Dado que el compuesto D-limoneno era uno de los componentes principales de las glándulas sexuales de los insectos hembras (tabla 1), se procedió a verificar la respuesta de las antenas ante dicho compuesto. Como esperábamos, no se observó en el electroantenograma respectivo (figura 5) ninguna respuesta por parte de las antenas de los insectos machos, descartándose entonces que el D-limoneno sea una feromona potencial de *C. corruda*. Este compuesto, al igual que muchos de los terpenos detectados en el presente trabajo, procede de la planta hospedera. Según Wadham (1990),⁶ pese a que las antenas poseen entre 2 y 3000 sensillas olfatorias; los compuestos procedentes de la planta hospedera, como el D-limoneno, sólo son percibidos por unas cuantas células, y en consecuencia, generan una respuesta débil que no es detectada por la técnica GC-EAD.



Figura 5. Cromatograma GC-FID-EAD de la inyección del estándar D-Limoneno

CONCLUSIONES

La GC-EAD es una técnica extremadamente útil para la determinación de feromonas en insectos. De los resultados de este trabajo hemos identificado cuatro compuestos que producen respuesta electrofisiológicas positivas en las antenas de machos de *C. corruda*, los cuales son: (Z)-9-tetradecenal, (Z)-9-tetradecen-1-ol, (Z)-9-tetradecenil acetato y (Z)-11-hexadecen-1-ol. El análisis por GC-FID-EAD del estándar (Z)-9-tetradecenil acetato nos permite afirmar que este compuesto sería una feromona potencial del insecto *C. corruda*. Estos hallazgos deben ser corroborados con experimentos a nivel de campo para comprobar su eficacia en el combate de esta plaga.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Julio Rojas de ECOSUR (El Colegio de la Frontera Sur, México) por el entrenamiento de uno de los coautores (G.E.) en técnicas de crianza de insectos y de Cromatografía de gases acoplada a Electroantenodetección. El presente trabajo de investigación fue financiado por el Fondo de Investigación y Desarrollo para la Competitividad-FIDECOM (Contrato No. 84-FINCyT-FIDECOM-PIPEA-2010).

BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Peruano del Espárrago (IPEH). 10 de Setiembre 2012. Comunicación personal.
2. Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) e Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET). 2010. Plaguicidas de Centroamérica: Metomil. <http://www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/389-metomil>. Consulta realizada el 16 de septiembre de 2012.
3. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España (PRTR). Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes: Clorpirifós. <http://www.prtr-es.es/Clorpirifos,15619,11,2007.html> Consulta realizada el 16 de septiembre de 2012.
4. Instituto Nacional de Ecología de Méjico (INE). Benzoato de emamectina. http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/benzoato_de_emamectina.pdf. Consulta realizada el 16 de septiembre de 2012.
5. Syngenta Agro. 2,5-dicloro-4(1,1,2,3,3,3-hexafluoro-propoxi) . www.syngenta.com.ar/.../cultivos/viewimage.aspx?id=666 .Consulta realizada el 16 de septiembre de 2012.
6. Wadhams, L.J. The use of coupled gas chromatography: electrophysiological techniques in the identification of insect pheromones. En: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*. Ed. McCaffery & Wilson, I.D. Plenum Press, New York. **1990**; 289-298 pp.
7. Barrera, J.F. ,Montoya, P. ,Rojas, J. *Bases para la aplicación de sistemas de trampas y atrayentes en manejo integrado de plagas*. En: *Simposio de trampas y atrayentes en detección, monitoreo y control de Plagas de importancia económica*. Barrera JF y Montoya P (Eds.) Sociedad Mejicana de Entomología y el Colegio de la Frontera Sur. Manzanillo, Colima, México. **2006**; 1-16 pp.
8. Jones, G., Oldham, N. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *J. Chrom. A.* **1999**; 843, 199–236.
9. Schneider, D.Z. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*. *Vergl. Physiol.* **1957**; 40: 8-41.
10. Rojas, J.C. ,Cruz-López, L. ,Malo, E.A. ,Díaz-Gómez, O. ,Calyecac, G. ,Cibrian-Tovar, J. Identification of the sex pheromone of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* **2006**; 99: 797-802.
11. Ando, T., Inomata, S., Yamamoto, M. Lepidopteran Sex Pheromones. *Top. Curr. Chem.* **2004**; 259: 51-96.
12. Muñiz-Reyes, E., Cibrián-Tóvar, J., Rojas-León, J., Díaz-Gómez, O., Valdés-Carrasco, J., Bautista-Martínez, N. Capturas de *Copitarsia decolora* (Lepidóptera: Noctuidae) en trampas cebadas con diferentes proporciones de feromona sexual. *Agrociencia.* **2007**; 41: 575-581