



Laboratorio de
Ecología Química



**Estudio analítico de los volátiles emitidos
in vivo por plantas de soja (*Glycine max*)
y su relación con su principal plaga en el
Uruguay: *Piezodorus guildinii* (Hemiptera:
Pentatomidae)**

Bach. Qca. Manuel Minteguiaga Carbajal

Tutor: Prof. Dr. (PhD) Andrés González Ritzel

Tesina de Licenciatura en Química

Junio 2010

Estudio financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) en modalidad de Beca de Iniciación Científica.

Dedicado a mi familia y a la memoria de mi padre.
Y a los que siempre están, estuvieron y estarán; los auténticos amigos, la
familia del corazón.

“El modo de dar una vez en el clavo es dar cien veces en la herradura.”

Miguel de Unamuno (1864-1936).

INDICE:

DEDICATORIA: 2

INDICE: 3

1- OBJETIVOS

1.1- Generales: **5**

1.2- Específicos: **5**

2- ETAPAS DEL ESTUDIO----- 5

3- RESUMEN----- 6

4- INTRODUCCION

4.1- *Glycine max*, la soja: **6**

4.2- Expansión del cultivo de soja. Situación en Uruguay: **8**

4.3- *Piezodorus guildinii*, la chinche de las leguminosas: **9**

4.4- Comunicación química: los insectos y su relación con el medio: **10**

4.5- Los VOCs, moléculas señal en la naturaleza: **11**

4.6- Originalidad del trabajo: **13**

5- MATERIALES Y METODOS

5.1- Puesta a punto del adsorbente

5.1.1- Limpieza de carbón activado (CA): **13**

5.1.2- Pruebas de adsorción de CA con aceites esenciales (AE): **14**

5.1.3- Prueba de adsorción de CA con plantas a laboratorio: **14**

5.1.4- Limpieza de Super Q[®] **14**

5.1.5- Pruebas de adsorción de Super Q[®] con AE **15**

5.2- Colecta de VOCs a campo **15**

5.3- Extracción y análisis químico de los VOCs

5.3.1- Extracción de los VOCs: **16**

5.3.2- Análisis por cromatografía gaseosa (GC): **16**

5.3.3- Análisis por GC acoplada a espectrometría de masas
(GC-MS): **17**

5.4- Respuesta comportamental de insectos a los VOCs

5.4.1- Cría de insectos: **17**

5.4.2- Bioensayos. Olfatómetro en "Y": **18**

5.5- Análisis preliminar de los VOCs por GC-EAD: **19**

6- RESULTADOS

6.1- Puesta a punto del adsorbente

6.1.1- Limpieza de CA y Super Q®:	20
6.1.2- Pruebas de adsorción con aceites esenciales (AE):	20
6.1.3- Prueba de adsorción de plantas in vivo a laboratorio:	24
6.2- Análisis químico de los VOCs de soja	
6.2.1- Muestreo 1 (V ₄ -V ₅):	24
6.2.2- Muestreo 2 (V ₈ -V ₉):	25
6.2.3- Muestreo 3 (R ₂):	29
6.2.4- Muestreo 4 (R ₅):	31
6.2.5- Muestreo 5 (R ₈):	33
6.2.6- Evolución cuantitativa de los compuestos comunes a los distintos muestreos:	35
6.3- Respuesta comportamental de insectos a los VOCs	
6.3.1- Muestreo 4, R ₅ :	38
6.3.2- Muestreo 5, R ₈ :	39
6.3.3- Tratamiento estadístico e interpretación:	40
6.4- Análisis de los VOCs por GC-EAD:	41
7- DISCUSION	
7.1- Optimización del adsorbente:	41
7.2- Perfil químico de VOCs:	42
7.3- Estudios comportamentales:	44
8- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS-----	44
9- AGRADECIMIENTOS-----	45
10- BIBLIOGRAFIA-----	46

1- OBJETIVOS:

1.1- Generales:

Estudiar aspectos básicos de comunicación química entre *Piezodorus guildinii* y *Glycine max* a través de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) emitidos por las plantas *in vivo*.

1.2- Específicos:

- *Caracterizar los perfiles de VOCs emitidos por la soja en sus diversos estadios de desarrollo fenológico.
- *Evaluar el comportamiento de *P. guildinii* frente a los extractos de plantas de soja en sus estadios de desarrollo reproductivo.
- *Determinar que compuesto/s utiliza *P. guildinii* como kairomona para encontrar su fuente alimenticia.

2 - ETAPAS DEL ESTUDIO

- *Optimización del material adsorbente de los VOCs (purificación, realización de pruebas de adsorción a laboratorio).
- *Colecta de volátiles a campo en cinco estadios de desarrollo fenológico de la soja.
- *Extracción y análisis de los VOCs mediante GC y GC-MS; caracterización química de los VOCs.
- *Respuesta comportamental de los insectos a los VOCs en olfatómetro en Y.
- *Análisis de los VOCs por GC-EAD; determinación de compuesto(s) utilizados por la plaga como kairomonas.

3- RESUMEN:

En éste trabajo se realizó la colecta de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de soja a campo, y el análisis de los mismos en el laboratorio para determinar los perfiles de emisión en los diferentes estadios de desarrollo fenológico. Además se realizó una evaluación de los mismos frente a individuos de *P. guildinii* (principal plaga de la soja en Uruguay) por ensayos comportamentales y estudios electrofisiológicos (GC-EAD) en la búsqueda de posibles kairomonas utilizadas por los insectos para ubicación de su fuente alimenticia.

Para poder realizar la adsorción de VOCs fue necesario optimizar un adsorbente que suministrara eficiencia y eficacia en dicho proceso. Para ello se ensayaron dos adsorbentes: carbón activado en bruto (reportado cómo clásico adsorbente en la literatura) y Super Q[®], un adsorbente comercial a base de una matriz polimérica de divinilbenceno y etilvinilbenceno.

4- INTRODUCCIÓN:

4.1- *Glycine max*, la soja.

La soja, *Glycine max* (L.) Merrill es una planta anual erecta de 50-90 cm. de altura perteneciente a la familia Fabaceae, subfamilia Faboideae. Sus hojas son compuestas trifoliadas, salvo las basales que son unifoliadas y se caen antes de que la planta llegue a su estado de madurez fisiológica. Sus flores son pequeñas de alrededor de 8 mm de longitud de corola blanca o violácea y los frutos son legumbres o vainas péndulas ⁽¹⁾ (figura 1).



Figura 1: *Glycine max*; planta en estadio reproductivo y semillas.

La soja es originaria de Asia Oriental, donde es cultivada desde la antigüedad, y desde allí se difundió a los países occidentales basado en su gran potencial alimenticio. Sus semillas son ricas en proteínas y aceites, lo que la hace sustituta de muchos productos de origen animal como la carne. También es de gran utilidad para la producción de biocombustibles y plásticos. Presenta un importante contenido de isoflavonoides que previenen el cáncer de mama, entre otros.

Existen varios cientos de variedades de soja que difieren por el color y las formas de las semillas, así como por las características morfológicas de las plantas. Se caracteriza por ser una especie muy sensible a las variaciones microclimáticas, por lo cual requiere un cuidadoso trabajo de selección de variedades antes de encontrar la de mayor rendimiento para una región dada ⁽¹⁾. Como todas las leguminosas, es una excelente especie para utilización en esquemas de rotación de cultivos, debido a la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias simbióticas del género *Rhizobium* que habitan sus nódulos radicales ⁽²⁾.

Existe un convención entre especialistas para la descripción de los estadios de desarrollo fenológico de la soja donde los estadios vegetativo y reproductivo son descritos separadamente ⁽³⁾. Los estadios vegetativos son determinados por conteo del número de nudos del tallo principal, comenzando por el nudo unifoliado. Los estados reproductivos R₁ y R₂ corresponden a la floración, R₃ y R₄ al desarrollo de las vainas (llenado), R₅ y R₆ responden al desarrollo de las semillas, y, R₇ y R₈ a la madurez fisiológica (ver figura 2). Este sistema es aplicado tanto para plantas aisladas como para cultivos ⁽³⁾. La cantidad de estadios vegetativos varía según la variedad de soja que se esté considerando y las condiciones ambientales reinantes. Por ejemplo Fehr ⁽³⁾ observó el comienzo de la floración desde los 4 hasta 18 nudos en el tallo principal. Para éste sistema descriptivo se consideran los estadios reproductivos basados en el desarrollo de la porción superior del tallo, independizando del genotipo y ambiente de la planta. Así R₁ designa la existencia de una flor en algún nudo (generalmente el superior) y R₂ designa la presencia de floración en el nudo inmediatamente por debajo del superior ⁽³⁾.

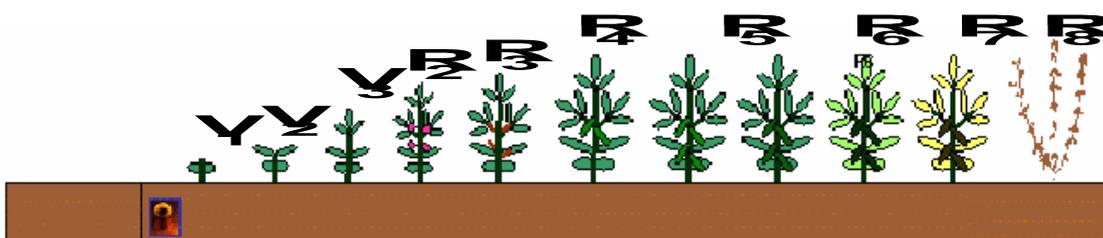


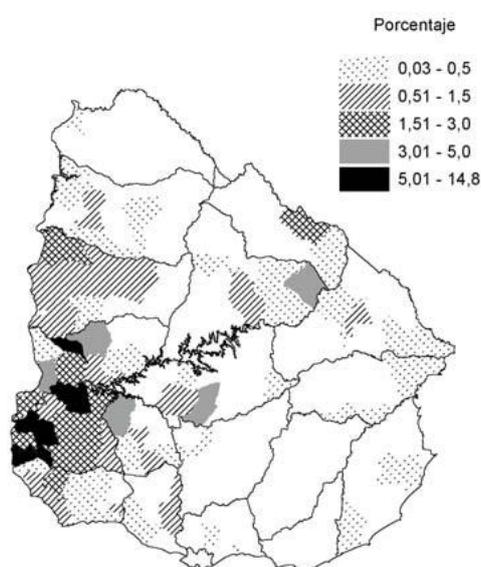
Figura 2: Estadios de desarrollo fenológico de la soja, según Fehr et. al.

Nota: en el diagrama no se presentan estados vegetativos superiores a V₃, pero su existencia depende en gran medida de la variedad de soja plantada y las condiciones ambientales (ver texto).

4.2- Expansión del cultivo de soja. Situación en Uruguay.

La expansión masiva de la soja se dio a principios de la década del setenta, sobre todo en el Medio Oeste estadounidense, y a partir de los noventa alcanzó gran auge en el Cono Sur. Hoy en día, Brasil y Argentina se han convertido en el segundo y tercer productor mundial respectivamente (luego de EEUU). Uruguay no ha escapado a ésta realidad, y, actualmente la soja es el cultivo con la mayor superficie implantada en el país. La misma evolucionó desde las 9.000 hectáreas en la temporada 1998/1999 a 400.000 hectáreas en la temporada 2007/2008 (habiendo predicciones de llegar a las 600.000 has en la zafra venidera) con una evolución concomitante en las exportaciones ⁽⁴⁾. La soja se cultiva principalmente en el litoral oeste del país (Fuente MGAP, ver figura 3) y la producción anual alcanza las 800.000 toneladas ⁽⁴⁾.

En las últimas décadas se ha producido, a través de técnicas de Ingeniería Genética, soja resistente a glifosato (herbicida), lo cual ha aumentado la producción al disminuir la incidencia negativa de las malezas. Ello ha provocado controversia sobre los efectos de dicho cultivo en el ambiente y sus efectos en la salud pública. En el país la introducción de dicha variedad fue a partir de la segunda mitad de los noventa, y en la actualidad, casi la totalidad de la de soja plantada es transgénica (Soja RR; Round-up Ready, con la incorporación de un gen de *Agrobacterium sp.*).



Fuente: MGAP-DIEA, Encuesta Agrícola "Primavera 2004"
(Intención de siembra, zafra 2004/05).

Figura 3: Superficie sembrada de soja en la temporada 2004-2005.

Los impactos ambientales más fuertes constatados se relacionan con la masiva aplicación de agroquímicos al cultivo. El empleo de aquellos ha aumentado un 400 % en los últimos 5 años ⁽⁴⁾. El paquete tecnológico de la soja transgénica, incluye además del glifosato, funguicidas e insecticidas altamente contaminantes, tales como el endosulfán, clorpirifos, y cipermetrina entre otros. Los mismos han demostrado ser muy nocivos para la vida terrestre y acuática, con un alto potencial de bioacumulación ⁽⁴⁾. Su persistencia en el ambiente hace que aumenten sus impactos negativos, tanto en la salud humana como en la flora y fauna, provocando desequilibrios en los ecosistemas. En éste sentido se ha constatado grave afectación a los enemigos naturales y resurgencia de plagas. En el caso del endosulfán (organoclorado), existe una campaña a nivel mundial para su eliminación y con respecto al clorpirifos, su uso ya está estrictamente restringido en algunos países de América Latina ⁽⁴⁾.

4.3- *Piezodorus guildinii*, la chinche de las leguminosas.

Los insecticidas son empleados para el combate de plagas, siendo las principales que afectan al cultivo las orugas (lepidópteros) y chinches (hemípteros). Los lepidópteros de mayor significación económica son principalmente dos: *Epinotia aporema* y *Anticarsia gemattalis*; mientras que la chinche más importante es *Piezodorus guildinii* (figura 4) ⁽⁴⁾.

P. guildinii posee, como todos los hemípteros, un aparato bucal pico-suctor que le permite penetrar los tejidos vegetales para alimentarse (daños primarios), posibilitando la introducción de bacterias, virus y hongos que pueden causar enfermedades a la planta (daños secundarios). Se ha reportado adicionalmente un daño conocido como “soja loca”, que consiste en la retención foliar de la planta al alcanzar la madurez, lo que dificulta la recolección mecánica de las semillas ⁽⁵⁾. Esta especie se encuentra en los sistemas de producción durante todo el año, oscilando entre el cultivo de soja y las leguminosas forrajeras ⁽⁵⁾. Debido a su alto nivel poblacional generalmente presente en los agro-ecosistemas y su ataque directo a las semillas; afecta el rendimiento y la calidad de las mismas. El ataque se da en estados de desarrollo avanzado, momento en que la planta no está en condiciones de compensar los efectos de dicho ataque, convirtiéndola en la plaga más importante del cultivo ⁽⁵⁾.

Al poner en peligro el éxito económico del negocio obliga a un estricto control en base a la utilización de insecticidas no selectivos, en general endosulfán. Este insecticida se aplica tanto puro como en mezclas con thiametoxán, cipermetrina u otros piretroides equivalentes, con el objetivo de potenciar su efecto ⁽⁴⁾. Se debe resaltar que hasta el momento no existen insecticidas selectivos para el control de ésta plaga, que puedan officiar como alternativa al uso de endosulfán. Según Castiglioni ⁽⁶⁾ *P. guildinii* ha

comenzado a desarrollar importantes niveles de resistencia a algunos de los productos utilizados para su control, entre ellos endosulfán.

Las aplicaciones de pesticidas en general son más frecuentes a partir de la floración y se intensifica hasta alcanzar la madurez, período en el cuál es más probable y dañino el ataque de la chinche ⁽⁴⁾.

El control de plagas alternativo, por rotación de cultivos-pasturas o por enemigos naturales no es empleado en la actualidad ⁽⁴⁾.



Figura 4: Piezodorus guildinii; adulto y ninfas de cuarto estadio, ambas consideradas plagas importantes del cultivo de soja.

Todos los inconvenientes numerados permiten visualizar la no sostenibilidad de los agro-ecosistemas sojeros a largo plazo. Por ello son necesarias nuevas alternativas de manejo agronómico, y dentro de ellas medidas de control de plagas más amigables con el medio ambiente.

4.4- Comunicación química: los insectos y su relación con el medio.

Entre los animales, los insectos constituyen el taxón que más frecuentemente utiliza sustancias químicas (semioquímicos) en procesos de comunicación y percepción del medio. Los semioquímicos involucrados en comunicación intraespecífica se conocen como feromonas, mientras que los que median comunicación interespecífica son conocidos como aleloquímicos. Éstos suelen dividirse para su estudio en alomonas y kairomonas: las primeras denotan señales químicas adaptativamente favorables para el emisor de la señal, mientras que las segundas benefician al receptor de la señal. En las relaciones planta-insecto, las kairomonas más conocidas son aquellas que contribuyen a la localización por parte de los insectos fitófagos de sus plantas alimenticias ⁽⁷⁾.

Dado los progresos alcanzados en los últimos años en la comprensión de los mecanismos de comunicación química entre plantas, y cómo las plantas se defienden de sus agresores herbívoros o patógenos; el uso de semioquímicos como herramienta en manejo integrado de plagas (MIP) está llamado a ser una alternativa viable al empleo convencional de pesticidas de síntesis. Resultados alentadores se han obtenido de la manipulación comportamental de insectos en estrategias de push-pull, a través del uso de feromonas para monitoreo poblacional o confusión sexual, y a través del empleo de elicitores químicos que incrementen el nivel de defensas directas e indirectas de la planta ⁽⁸⁾.

4.5- Los VOCs, moléculas señal en la naturaleza.

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son compuestos químicos liberados a la atmósfera (alta presión de vapor) por fuentes biogénicas o no biogénicas ⁽⁹⁾. Se caracterizan por ser compuestos de bajo peso molecular (menor a 500 dalton), en su mayor parte lipofílicos, que responden a una gran diversidad de grupos químicos ⁽⁹⁾. En el caso de las fuentes biogénicas, especialmente en plantas, son característicos los derivados isoprenoides (hemiterpenos, monoterpenos y sesquiterpenos), alcanos, alquenos, cetonas, aldehídos, ésteres, éteres, ácidos e hidrocarburos aromáticos. Los terpenos son los compuestos más prominentes en la mayoría de los casos. La emisión de VOCs en plantas no es homogénea y varía apreciablemente tanto en cantidad como identidad de los compuestos. Ello depende de factores propios del organismo como el estado de desarrollo y genotipo, y de factores ambientales que provocan stress tales como la contaminación, la presencia de organismos detrimentales (fitófagos, patógenos), la duración del fotoperíodo y la temperatura ⁽⁹⁾. La antedicha dependencia es característica en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

El entendimiento del rol de los VOCs en las interacciones planta-insecto es menor que para los compuestos no volátiles debido a la dificultad en su aislamiento, identificación y cuantificación (se encuentran en proporción de ppm o ppb respecto al peso de la planta) y por su naturaleza disipativa. Ello influye en última instancia en el entendimiento del metabolismo y la fisiología vegetal ^(9,10). Varios métodos han sido empleados para aislar VOCs, entre ellos destilación por arrastre con vapor, destilación a vacío, extracción con solventes, condensación en frío y trampas de adsorbentes ⁽¹⁰⁾. Esta última opción es la más adecuada y representativa de las condiciones de emisión *in vivo*, minimizando contaminantes ⁽¹⁰⁾, y fue la elegida para este trabajo.

Los VOCs de plantas han sido reportados como atrayentes de insectos a sus plantas alimenticias (cumpliendo la función de kairomonas) pero quizá su rol más importante sea como repelentes y deterrentes de fitófagos que hagan a una planta no alimenticia

(alomonas) ⁽¹⁰⁾. El comportamiento de los insectos es influido tanto por diferencias cualitativas como cuantitativas en la pluma de volátiles ⁽⁷⁾.

Liu ⁽¹⁰⁾ ha demostrado que las distintas variedades de soja emiten diferentes perfiles de volátiles que pueden influir en la aceptabilidad por parte de un insecto fitófago. Las especies cultivadas parecen ser más apetecibles a los mismos que las especies silvestres.

En la bibliografía se hace una distinción entre los VOCs emitidos por la planta en condiciones normales y los VOCs emitidos bajo herbivoría. Éstos últimos son conocidos como HIPVs (herbivore-induced plant volátiles, en inglés) los que generalmente tienen un rol relevante en interacciones tritróficas en la atracción de depredadores o parasitoides del herbívoro (incluso en el caso de volátiles inducidos por pentatómidos) ⁽⁸⁾. A la atracción de dichos enemigos naturales por parte de volátiles de la planta se le llama defensa indirecta, y las plantas suelen recurrir a ellas cuando es bajo el nivel de defensas directas (constitutivas o inducidas por la misma planta) ⁽¹¹⁾. Los compuestos que generalmente median la liberación de defensas inducidas son salicilato de metilo (MeSA) y ácido jasmónico. Los mismos son liberados por la planta luego de una cascada de señalización iniciada tras el inicio de la alimentación u oviposición. La sola presencia de dichos compuestos activa los mecanismos de defensa de la planta y la atracción de los parasitoides, no necesitándose la presencia del insecto perjudicial ⁽⁸⁾.

El MeSA también está involucrado en interacciones tritróficas en la naturaleza. Zhu ⁽¹²⁾ demostró que las plantas de soja altamente atacadas por *Aphis glyicine* (Homoptera:Aphidae) emiten en alta proporción MeSA, lo que provoca una respuesta en GC-EAD de su principal depredador, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera:Coccinellidae).

Está bien caracterizada la emisión por parte de las plantas de volátiles de hoja verde (green leaf volatiles, GLV, en inglés), los cuales son alcoholes, cetonas, aldehídos y ésteres alifáticos de hasta 10 átomos de carbono, emitidos por todas las plantas en condiciones *in vivo*. Muchos de ellos han demostrado tener funciones importantes en la naturaleza; Gardner ⁽¹³⁾ reporta la inhibición de germinación de semillas y del crecimiento de plántulas de soja por parte del hexanal, *E*-2-hexenal y *E*-2-nonenal.

4.6 - Originalidad del trabajo:

La originalidad de éste trabajo consiste en la búsqueda de VOCs que emita *G. max in vivo* que puedan ser atractivas a las plagas (kairomonas), no al estudio de los HIPVs, compuestos emitidos por la soja como respuesta al daño infligido por el herbívoro. A

diferencia de los estudios precedentes, en el presente se realiza una evaluación de los VOCs a lo largo de todo el desarrollo del cultivo en condiciones de campo (los restantes estudios se han realizado en laboratorio bajo condiciones controladas). Éste punto tiene dificultades inherentes, como la variabilidad en factores bióticos y abióticos del agro-ecosistema. Dentro de los primeros se pueden mencionar la incidencia de otras plagas, patógenos, malezas y fauna autóctona; y los segundos involucran humedad, temperatura, fotoperíodo, etc.

5- MATERIALES Y METODOS:

5.1- Puesta a punto del adsorbente:

5.1.1- Limpieza de carbón activado (CA):

Se partió de una muestra comercial de carbón activado grueso, la cual fue pulverizada mediante mortero de ágata hasta lograr un tamaño de partícula uniforme y pequeño. A continuación se realizó una limpieza del carbón activado molido mediante dispositivo de Soxhlet por 210 minutos, con 600 ml de diclorometano. Posteriormente se lo secó en estufa a 200 °C toda la noche bajo corriente de N₂.

Luego se realizó una elución con 2 ml de n-hexano (95 % de pureza, Mallinckrodt Chemicals) de una porción de 0.4 g de carbón activado empacado en columna tipo pipeta Pasteur. Al eluido se lo concentró mediante corriente de N₂ hasta 100 µl y se lo inyectó en un GC Hewlett-Packard 5890 serie II; condiciones: gas carrier: H₂; T inyector: 220 °C; T detector (FID): 250 °C; método: 40 °C (4 min)- 10 °C/min- 240 °C (5 min). Inyección Splitless, Columna Elite 5; (5% difenil- 95% dimetil polisiloxano; 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm).

Dado que la limpieza anterior no fue efectiva, se procedió a realizar otra purificación por aparato de Soxhlet con n- hexano (600 ml) por 360 minutos. Posteriormente se volvió a secar en estufa a 200 °C toda la noche bajo corriente de N₂.

El procedimiento de elución que siguió a continuación, fue el mismo que el mencionado anteriormente. Al demostrarse (por inyección en GC del eluido concentrado) que en éste caso la limpieza fue satisfactoria, se procedió a realizar pruebas de adsorción.

5.1.2- Pruebas de adsorción de CA con aceites esenciales (AE).

Primeramente se realizó una prueba con aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, colocando una gota del mismo sobre papel de filtro dentro de una bolsa de poliestireno (Embale Bem, 27 x 41 cm). La atmósfera circundante fue aspirada mediante una bomba de muestreo ambiental (Apex 1.04; Casella Cel) durante 20 horas a 1.60 L/min. El objetivo fue adsorber los compuestos del aceite esencial en un lecho de carbón

activado (0.6 g) empacado en una columna adherida al extremo de la bolsa. Mediante un dispositivo de conexiones en forma de “T”, se realizó sincrónicamente un blanco. A continuación, se eluyeron ambos tubos de carbón activado con n-hexano (tal cual fue referido anteriormente). El análisis por GC fue llevado a cabo bajo las condiciones anteriormente detalladas (salvo que la inyección debió realizarse en modo Split debido a saturación del detector).

Dado que los resultados en la adsorción no fueron los esperados en virtud de la alta proporción de 1.8-cineol, se procedió a realizar una nueva prueba. Esta vez se realizó con aceite esencial de *Eupatorium buniifolium* (el cuál presenta un perfil químico cuantitativo con compuestos no excesivamente mayoritarios ⁽¹⁴⁾) en condiciones similares a las anteriormente descritas para el AE de Eucalipto.

5.1.3- Prueba de adsorción de CA con plantas *in vivo* a laboratorio.

Para realizar una prueba más representativa de las condiciones *in vivo*, se realizó una prueba de adsorción sobre plantas de *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae) a laboratorio, con el mismo equipamiento de vacío y el mismo programa de adsorción. En ésta oportunidad se embolsaron las plantas de manera de evitar la adsorción de volátiles procedentes de la tierra y/o maceta.

Cómo se referirá posteriormente, los resultados obligaron a continuar los estudios con otro adsorbente. En éste caso fue el adsorbente comercial Super Q[®].

5.1.4- Limpieza de Super Q[®]:

A partir de una porción previamente empleada de Super Q[®] (divinilbenceno-etilvinilbenceno; Alltech 80/100 mesh), se procedió a la elución del mismo, empacado en una columna, mediante el agregado sucesivo de 15 ml de diclorometano, metanol y n-hexano destilados. Para verificar la eficiencia del proceso se eluyeron las columnas empacadas con 2 ml de n-hexano (95% pureza, Mallinckrodt Chemicals). Dichos eluidos fueron concentrados bajo corriente de N₂ a 100 µl e inyectados (1 µl) en un cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones experimentales anteriormente mencionadas.

5.1.5- Pruebas de adsorción de Super Q[®] con AE.

En ésta instancia se procedió a la adsorción y posterior análisis del adsorbato de aceite esencial de *Eupatorium buniifolium* de la misma manera que se describió para el caso del carbón activado.

En éste caso las pruebas fueron satisfactorias, por lo que se decidió emplear Super Q[®] para las adsorciones a campo.

5.2- Colecta de VOCs a campo:

Ésta parte del trabajo se realizó en el período enero-abril de 2009, en un campo de soja en la Estación Experimental “Mario Cassinoni” (EEMAC) de Facultad de Agronomía (UdelaR), Paysandú.

Para ello se muestreó en cinco estadios de desarrollo fenológico del cultivo de soja: vegetativo (V_4 - V_5 y V_8 - V_9), floración (R_2), llenado de vaina (R_5) y madurez fisiológica (R_8). En todos los casos la colecta se realizó de manera semejante. El dispositivo empleado para la colecta a campo se muestra en la figura 5.

La idea básica fue captar los volátiles (VOCs) *in vivo* de las plantas de soja. El follaje de las plantas de soja fue embolsado a cierta altura del suelo (por sobre las hojas unifoliadas) de manera de no captar volátiles del mismo; formando una cámara abierta por su extremo inferior. Las bolsas empleadas fueron de poliestireno (Embale Bem, 27 x 41 cm). En el extremo superior de la misma se adosó una columna de vidrio (tipo pipeta Paster; 15.7 cm l. x 0.6 cm d. i.) empacada con 0.1 g de Super Q[®] entre dos porciones de lana de vidrio. Simultáneamente se preparó un blanco con una bolsa vacía. Las salidas de ambas columnas fueron unidas a un conector en forma de “T” en cuyo extremo se colocó una bomba de vacío portátil (Apex 1.04; Casella Cel). Así la bomba arrastró la atmósfera circundante a las plantas y los compuestos volátiles fueron recogidos en el lecho de adsorbente. Las condiciones de muestreo fueron las siguientes: flujo de aire: 1.60 L/min; programa de muestreo: 20 horas; sistemas de colecta por duplicado. La temperatura fue variable en virtud de la variación climática diaria. Las bombas fueron colocadas a cierta altura del suelo y protegidas mediante malla sombra dado que al ser expuestas al sol directamente, las condiciones de funcionamiento pueden variar. Las bolsas también fueron parcialmente protegidas del calor mediante malla sombra para evitar el marchitamiento de las plantas muestreadas. Con ello también se mitiga en parte la descomposición, como consecuencia del calor, del material constituyente de las bolsas.



Figura 5: Sistema de colecta para volátiles a campo, aquí ejemplificado para el muestreo en estadios V_8 - V_9 .

5.3- Extracción y análisis químico de los VOCs:

5.3.1- Extracción de VOCs:

Para la extracción de los VOCs se procedió a la elución de las columnas provenientes de los muestreos (tanto de blanco como de soja) con 2 ml de n- hexano (95 % de pureza, Mallinckrodt Chemicals), adicionándose 100 μ l de n-tridecano (0.05408 mg/ml) cómo estándar interno. A dicho extracto se lo concentró bajo corriente gaseosa de N_2 hasta 100 μ l, y se lo almacenó a -18 °C hasta su posterior análisis químico y comportamental.

5.3.2- Análisis por cromatografía gaseosa (GC):

Para ello se empleó un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 serie II con las siguientes condiciones: gas carrier: H_2 ; T inyector: 220 °C; T detector (FID): 250 °C; método: 40 °C (4 min)- 10 °C/min- 240 °C (5 min); Inyección Splitless, Columna Elite 5 (5% difenil-95% dimetil polisiloxano; 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 μ m).

El cromatógrafo se conectó a una PC equipada con el Software HP Chem Station, donde pudo visualizarse los cromatogramas y ajustar las condiciones de funcionamiento del equipo.

La determinación de picos pertenecientes a extractos de soja fue realizada por comparación entre los cromatogramas de los mismos y los correspondientes de los blancos.

Se calcularon los índices de retención (IR) de los componentes de los extractos de VOCs de soja por inyección de 1 μ l del extracto bajo las mismas condiciones cromatográficas que en el caso anterior, en paralelo a 0.5 μ l de solución de Kovats (C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{22} , C_{26} , C_{32} ; 100 ppm).

5.3.3- Análisis por GC acoplado a espectrometría de masas (GC-MS):

Los extractos de todos los estadios fueron inyectados en modalidad splitless por duplicado (1 µl) en un GC-MS Shimadzu QP2010 Plus. La columna empleada fue OPTIMA- 5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) con He como gas portador. La fuente de ionización fue de impacto electrónico (IE) a 70-eV sometida a 200 °C y con la línea de transferencia a 300 °C. La cuantificación fue realizada por comparación de áreas con el estándar interno de n-tridecano. Adicionalmente se inyectó 0.5 µl de la solución de Kovats para un segundo cálculo de índices de retención (IR).

La identificación de los compuestos fue mediante comparación de sus IR y espectros de masas con la datos de la base de datos SHIM 2205 ⁽¹⁵⁾. Como criterio de identificación se tomó un porcentaje de similitud de espectros mayor al 85%, y una diferencia de índices de retención no mayor a 10 unidades. Identificación tentativa se le llamó a aquella en la que sólo se pudo contar con el porcentaje de similitud del espectro de masas, tomándose en éste caso como criterio un 90% de similitud en los mismos. Aquellos compuestos que se encontraron en los extractos de soja pero no pudo ser determinada su identidad fueron incluídos en la cantidad total de VOCs reportada.

5.4- Respuesta comportamental de insectos a los VOCs:

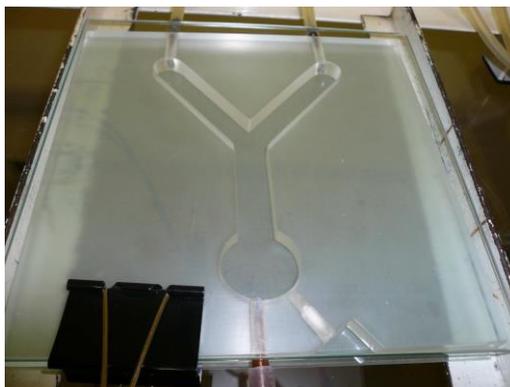
5.4.1- Cría de insectos:

Tanto ninfas como adultos de *Piezodorus guildinii* fueron alimentados con germinadores de lentejas (*Lens culinaris*, Fabaceae) junto al agregado periódico de chauchas frescas. Los huevos fueron puestos por las chinches en hilera en cuerdas colocadas a tal fin, y fueron separados de los adultos para dar lugar a una nueva generación.

5.4.2 Bioensayos. Olfatómetro en "Y":

Tanto machos y hembras adultos de *P. guildinii* fueron colocados en el extremo basal de la "Y" del olfatómetro, donde se encontraron frente a dos opciones: el blanco o el extracto de VOCs (muestreos R₅ y R₈).

Físicamente el olfatómetro es un block de acrílico con una cavidad en forma de Y, aprisionado entre dos placas planas de vidrio. El tronco del dispositivo mide 20 cm y cada brazo 17 cm (ver figura 6); tanto en el tronco como en cada brazo se trazaron arbitrariamente líneas a la mitad de su longitud, para cuantificar la respuesta del insecto.



*Figura 6: Olfatómetro en Y donde se realizaron los estudios comportamentales de preferencia de *P. guildinii* hacia los VOCs de soja.*

La fuente de olor se generó absorbiendo 3 μ l de la muestra (sea extracto o blanco de n-hexano) en un papel de filtro (3 x 1 cm) doblado a la mitad a modo de carpa. Tanto los papeles de filtro con el blanco como con el extracto fueron colocados en cámaras cilíndricas de vidrio, las cuales tuvieron conexión con los respectivos brazos del olfactómetro. El aire que arrastró los volátiles fue conducido por caños de goma desde una bomba de diafragma (Aquarium Air Pump, LifeTech 9830), pasando por un humidificador de agua destilada y un lecho de carbón activado antes de llegar a las cámaras de volatilización. El flujo se reguló a 2.2 L/min, y se utilizó luz roja para emular condiciones nocturnas. Ello responde al hecho de que en estudios preliminares de movilidad en olfactómetro en Y (blanco contra blanco), los insectos fueron más móviles bajo luz roja que bajo luz blanca.

La respuesta del insecto se observó durante 15 minutos, registrándose la primera elección de brazo, tiempo de residencia en cada brazo y número de veces que prefirió cada uno de ellos. Cada individuo fue utilizado una única vez y entre ensayos sucesivos se limpió el olfactómetro con etanol (70%), y se alternaron las cámaras de volatilización.

La preferencia por control o tratamiento se evaluó estadísticamente mediante el test de rangos pareados de Wilcoxon para el número de entradas y tiempo de permanencia en cada brazo. La primera elección de un brazo u otro se analizó por el test de Chi cuadrado ⁽¹⁶⁾.

5.5- Análisis preliminar de los VOCs por GC-EAD:

Los ensayos electrofisiológicos son claves para la Ecología Química. En los electroantenogramas (EAG) se registra la diferencia de potencial entre los extremos de la antena de un insecto como respuesta a un determinado estímulo ⁽¹⁷⁾. Esta metodología puede ser acoplada a un cromatógrafo de gases (haciendo las veces de

detector conocido como EAD; ver figura 7), de manera de poder evaluar la respuesta de la antena del insecto a los diferentes compuestos que eluyen de la columna, simultáneamente a la detección de dichos compuestos por el detector usual de GC.

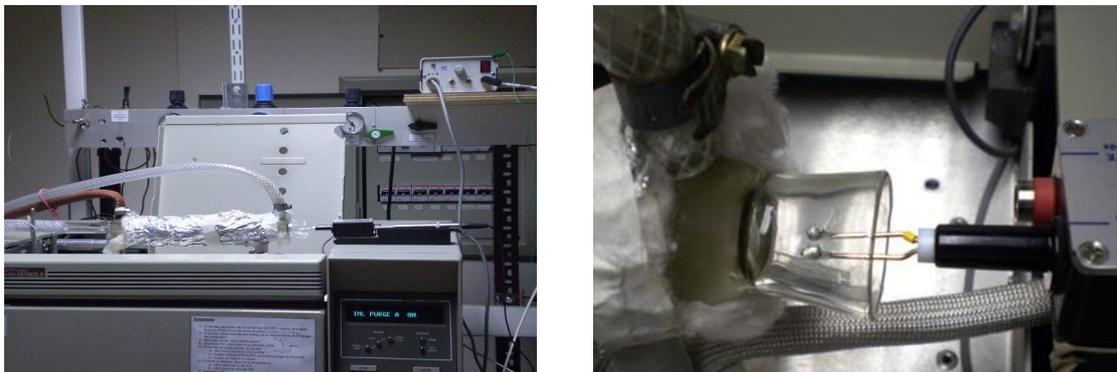


Figura 7: cromatógrafo de gases acoplado a detector de electroantenograma (GC-EAD). En la imagen de la izquierda se puede observar en detalle la antena entre los electrodos.

Si algún compuesto químico estimula dicha antena, ella emite un impulso eléctrico que es amplificado y registrado por un software. De ésta manera se tiene una comparación a tiempo real de los compuestos químicos eluidos y sus respectivas respuestas de las antenas de los insectos.

Dado que las cantidades de semioquímicos implicadas en las interacciones biológicas entre organismos vivos son ínfimas (del orden de pg), tal detector es muy sensible. Se pueden registrar respuestas electrofisiológicas en los cromatogramas en donde no se puede visualizar ningún pico mediante los detectores usuales de GC ⁽¹⁸⁾.

Para llevar a cabo el análisis se diseccionó la antena del insecto en su base, se la colocó entre dos electrodos de plata y se la fijó a los mismos mediante un gel conductor. Este es el encargado, en última instancia, de transmitir el impulso nervioso de la antena a los electrodos. Los electrodos se conectaron a un amplificador, y éste a un registrador en un PC, mediante software HP Chem Station. Dado que la respuesta de las antenas no fue consistente, se procedió a realizar un cambio en el sistema de detección, utilizando como electrodos hilos de plata sumergidos en una solución llamada de Ringer (solución de 0.755 % NaCl, 0.064 % KCl; 0.022 % CaCl₂, 0.173 % MgCl₂, 0.086% Na₂HCO₃ y 0.061 % Na₃PO₄ ⁽¹⁹⁾) que simula las condiciones osmóticas de la hemolinfa.

A los efectos de la realización de éstos análisis, los insectos fueron colocados por 15 minutos en una conservadora con escarchas de hielo, condiciones bajo las cuales los mismos permanecen inmovilizados (entran en un estado de quiescencia), quedando

aptos para la disección de las antenas. Se procuró colocar la antena inmediatamente después de la disección para formar parte del detector, y que la señal de la misma permaneciera estable (visualizada en el registrador).

Para que la respuesta detectada de la antena sea consistente, se pretende que la misma se repita en al menos dos análisis consecutivos, lo cual no pudo ser verificado en ninguna de las condiciones planteadas.

En éste trabajo, debido a problemas de disponibilidad de insectos y de extractos, se realizaron apenas 4 corridas de GC-EAD con antenas de machos (dado que habían mostrado una leve tendencia de atracción de VOCs de madurez en primera opción de olfatómetro) y extractos de R_8 (el más afectado por las chinches en observaciones de campo).

6- RESULTADOS:

6.1- Puesta a punto del adsorbente:

6.1.1- Limpieza de CA y Super Q[®]:

Ambas fueron altamente efectivas ya que el análisis del eluido por GC arrojó un cromatograma donde las diferencias con el blanco de solvente fueron poco apreciables.

En el caso del CA, ello fue logrado luego de realizar ambas extracciones con aparato de Soxhlet.

6.1.2- Pruebas de adsorción con AE:

Eucalyptus globulus

El 1.8-cineol es su compuesto mayoritario (constituyendo hasta un 90% del AE), por lo cual a la hora de realizar la adsorción de los compuestos minoritarios, aquél impide la correcta visualización de los mismos. Aún así se pudo apreciar que hay compuestos, como los correspondientes a los picos 3, 4 y 9 de la figura 8, que son adsorbidos por el carbón activado en muy baja proporción.

En cuanto a las proporciones relativas de los compuestos mayoritarios, calculadas considerando como referencia el pico 6, ver tabla 1), se pueden distinguir tres casos: compuestos que se ven enriquecidos en su cantidad en el eluido de la adsorción respecto del aceite esencial (picos 1 y 2 de naturaleza monoterpenoide, incluyendo al 1.8-cineol), compuestos que se ven notablemente disminuidos en su concentración en el eluido respecto del aceite esencial en bruto (caso de los picos 3, 4 y 9); y compuestos que prácticamente mantienen su proporción en el eluido y el AE. Estos últimos químicamente corresponden a sesquiterpenos (la identificación es debida a la

forma típica de elución de los componentes de aceites esenciales en cromatografía de gases ⁽¹⁵⁾).

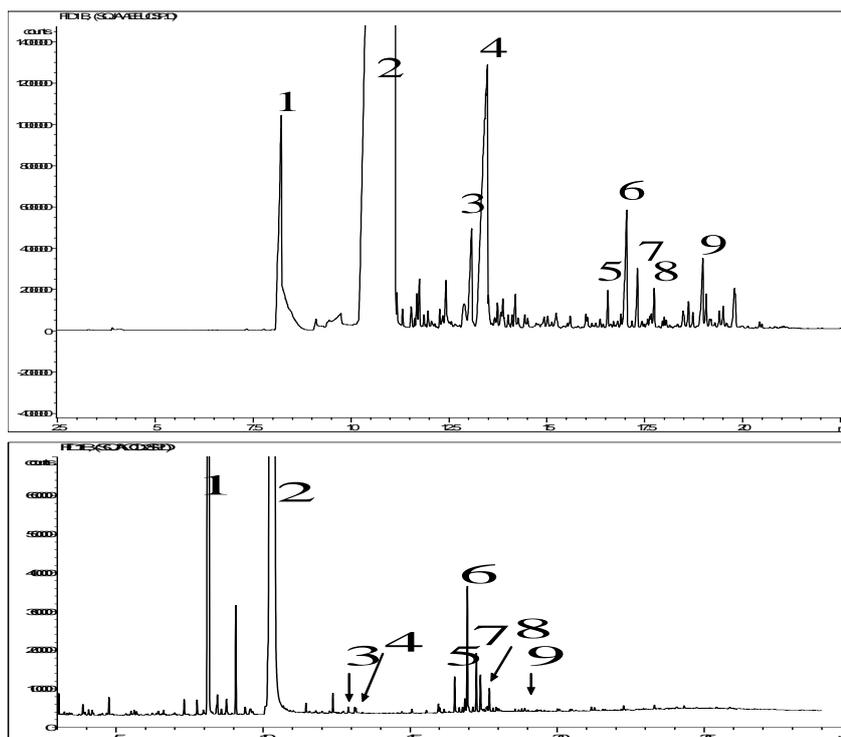


Figura 8: Cromatogramas de AE de *Eucalyptus globulus* y su respectiva adsorción en carbón activado. Nótese que las escalas de ambos cromatogramas son diferentes. La identificación de los picos fue mediante sus tiempos de retención y la forma relativa de los picos. El pico 2 corresponde al 1.8 cineol.

AE <i>E. globulus</i>			Adsorción en CA	
Pico	tr (min)	Relación de áreas	tr (min)	Relación de áreas
1	8,219	3,60	8,159	23,64
2	11,071	123,01	10,397	217,17
3	13,077	1,01	12,897	0,09
4	13,479	5,90	13,115	0,05
5	16,558	0,21	16,520	0,27
6	17,036	1	16,949	1
7	17,314	0,37	17,256	0,47
8	17,741	0,23	17,697	0,18
9	18,983	0,58	NI	#

Tabla 1: Comparación de las proporciones relativas de compuestos del AE de *E. globulus* del aceite en bruto y su adsorción en carbón activado.

*Nota: las proporciones se calculan tomando el pico 6 como referencia (área igual a 1);
NI: no identificado.*

Eupatorium buniifolium

En éste caso se aprecia claramente la falta de representatividad del carbón activado en la adsorción de monoterpenos (ver en figura 9 la desaparición de los picos 1-5 en el eluído de adsorción).

El análisis de las proporciones relativas de los compuestos mayoritarios arrojó los resultados que figuran en la tabla 2. En la misma se puede apreciar que la proporción de todos los sesquiterpenos considerados aumenta en el eluído de la adsorción del aceite esencial respecto al mismo aceite esencial. Por tal, se da un enriquecimiento en sesquiterpenos en el eluído (el caso más dramático es representado por los picos 9 y 10, que prácticamente se enriquecen 10 veces en su proporción).

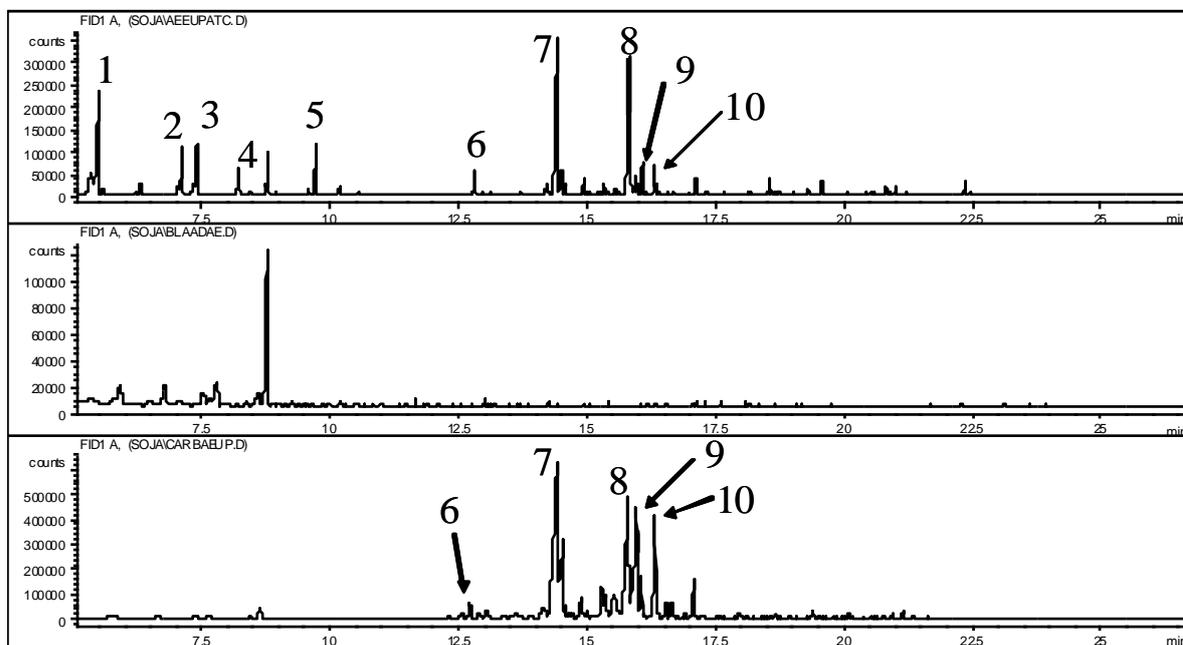


Figura 9: Cromatogramas de AE de Eupatorium buniifolium, blanco de adsorción y eluído de adsorción del AE (respectivamente). Aquí es claramente apreciable la falta de selectividad de adsorción del carbón activado para los monoterpenos.

AE <i>E. buniifolium</i>			Adsorción en CA	
Pico	tr (min)	Relación de áreas	tr (min)	Relación de áreas
1	5,498	8,67	NI	#
2	7,120	2,69	NI	#
3	7,409	2,75	NI	#
4	8,231	1,18	NI	#
5	9,721	2,45	NI	#
6	12,814	1	12,726	1
7	14,422	11,88	14,424	19,31
8	15,803	7,25	15,797	11,76
9	15,940	0,76	15,964	7,02
10	15,978	0,38	16,009	3,54

Tabla 2: Comparación de las proporciones relativas de compuestos del aceite esencial de *E. buniifolium* en el aceite en bruto y en el eluido de la adsorción de CA.

Nota: se toma como referencia el pico 6 (área igual a 1). NI: no identificado.

En experimentos de adsorción con Super Q[®] del AE de *E. buniifolium*, se constató una alta representatividad en la misma (no ilustrado aquí) que finalmente fue determinante para la elección de dicho absorbente para trabajos posteriores.

6.1.3- Prueba de adsorción de plantas *in vivo* a laboratorio.

Cucurbita maxima

Según lo demuestra la figura 10, en las condiciones en que se realizó la prueba de adsorción, no se detectaron diferencias en los volátiles captados de la planta respecto a los del blanco.

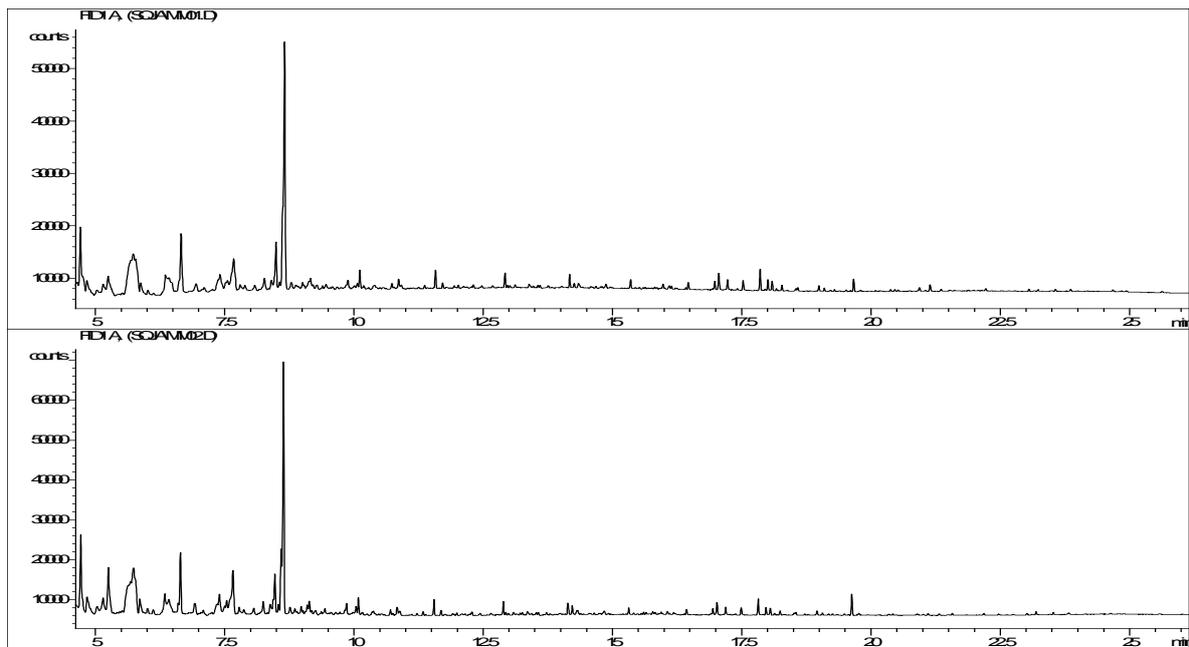


Figura 10: Cromatogramas de blanco y adsorción de plantas de Cucurbita maxima en carbón activado. No se aprecian diferencias significativas entre ambos.

6.2- Análisis químico de los VOCs de soja:

Se obtuvieron los perfiles de emisión de VOCs de plantas de cultivo de soja a campo, en los diferentes estadios de desarrollo muestreados.

En todos los casos el estándar interno utilizado para cuantificar los VOCs fue n-tridecano, siendo su tiempo de retención de 15.5 minutos.

6.2.1- Muestreo 1 (V₄-V₅):

En éste muestreo no hubo diferencias apreciables entre el blanco y la muestra, detectándose dos picos que no pudieron ser identificados por comparación con biblioteca de espectros de masa (tabla 3).

Pico	Compuesto	% Similitud	tr GC-MS (min)	tr 2 GC-MS (min)	IR GC-MS	IR teórico	ng eq. tridecano
1	?	*	10,892	10,885	1011	*	510,53
2	?	*	25,847	25,839	2211	*	704,87

Tabla 3: VOCs detectados de muestreo 1 (V₄-V₅) de plantas de soja in vivo.

En cuanto a las cantidades relativas de ambos compuestos, se puede decir que ambos tienen áreas importantes (comparado al estándar interno) por lo cual son compuestos mayoritarios en los VOCs de soja.

6.2.2- Muestreo 2 (V₈-V₉):

En el mismo se detectaron diferencias apreciables del extracto de VOCs de soja respecto del blanco. Los compuestos identificados, junto a sus cantidades relativas se pueden visualizar en la tabla 4; y la figura 11 representa el cromatograma GC-MS de los VOCs del muestreo.

Dado que en la visión sin aumentos de los cromatogramas de los distintos muestreos son todas semejantes (los VOCs, en su mayoría son componentes minoritarios en el cromatograma total y no se pueden ver sus picos en la visión suministrada), sólo se muestra el correspondiente para el primer muestreo. En todos ellos se constató una alta presencia de volátiles de bolsa (como es indicado en la figura 11) de origen antropogénico, lo cual presumiblemente se deba a la descomposición de las mismas en el campo (con altas temperaturas por tiempos prolongados). Tal aspecto demanda estudios adicionales de optimización de condiciones de absorción, los cuales están siendo realizados para la temporada venidera.

Pico	Compuesto	% Simil.	tr GC-MS (min)	tr GC (min)	tr2 GC-MS (min)	IR en GC	IR en GC-MS	IR teórico	ng eq. tridecano
1	6-metil-5-hepten-2-ona	95	10,349	9,224	10,347	986	983	985	136,6
2	(E)-β-Ocimeno	97	11,545	10,491	11,541	1053	1050	1044	92,99
3	butanoato de 3-(Z)-hexen-1-ilo	91	13,758	12,915	13,730	1188	1181	1184	50,83
4	salicilato de metilo (MeSA)	98	13,971	13,158	13,951	1202	1194	1190	142,06
5	β-humuleno	89	17,339	16,731	17,340	1445	1437	1436	138,4
6	geranil acetona	95	17,517	16,901	17,522	1458	1451	1453	80,35
7	α-zingibereno	86	18,073	17,329	18,066	1491	1495	1493	106,72
8	(E,E)-α-farneseno	94	18,265	17,648	18,249	1516	1510	1505	1595,33

9	?	*	18,815	18,245	18,809	1560	1554	*	37,9
10	?	90	19,118	18,536	19,114	1582	1579	*	118,17
11	tetradecanal	95	19,469	18,941	19,476	1614	1608	1611	67,71
12	epóxido de farneseno?	93	19,578	19,074	19,583	1626	1618	S/D	72,93
13	?	*	24,818	NI	24,816	*	2117	*	45,91
14	?	*	25,003	NI	25,002	*	2135	*	90,11
15	?						2158	*	46,78

Tabla 4: VOCs caracterizados de muestreo 2 (V_8 - V_9) de plantas de soja in vivo. NI: no identificado. NI: no identificado. S/D: sin datos.

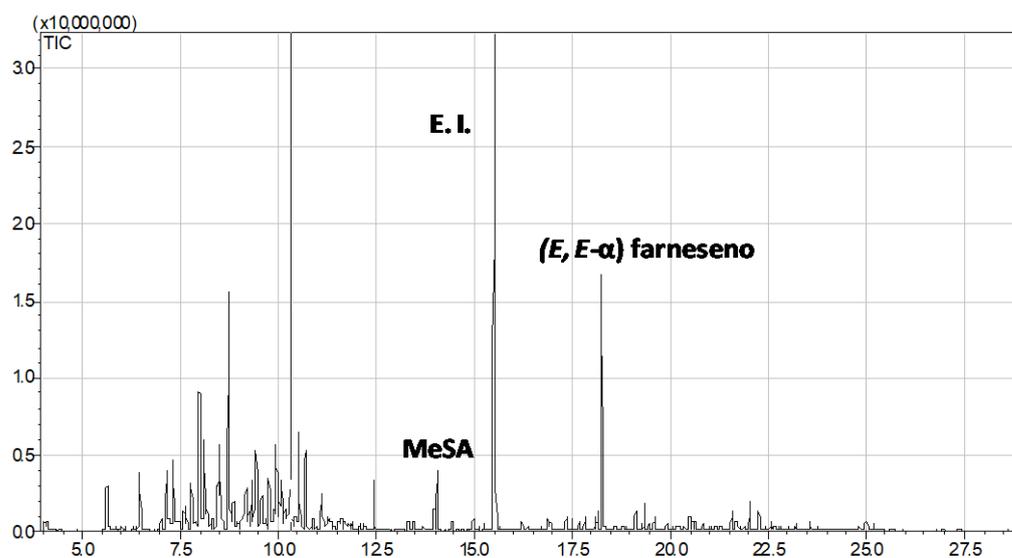


Figura 11: Cromatograma GC-MS de VOCs de soja, estadio (V_8 - V_9). Sin aumento, los únicos picos que se pueden apreciar correctamente son los correspondientes al metil salicilato (MeSA) y (E,E - α) farneseno, lo cual es indicado. E.I. denota el estándar interno: n -tridecano. Nota: los picos prominentes al principio del cromatograma corresponden a VOCs de bolsa (presentes en el blanco).

La discriminación según el tipo de compuestos identificados es la siguiente:

Cetonas: 6-metil-5-hepten-2-ona (GLV); geranil acetona.

Hidrocarburos monoterpenos: (E)- β -ocimeno.

Hidrocarburos sesquiterpenos: β -humuleno; α -zingibereno.

Aldehídos: tetradecanal.

Ésteres: salicilato de metilo, butanoato de 3-(Z)-hexen-1-ilo (GLV).

Éteres: epóxido de farneseno (tentativo).

En la figura 12 se representan químicamente los VOCs identificados en éste muestreo.

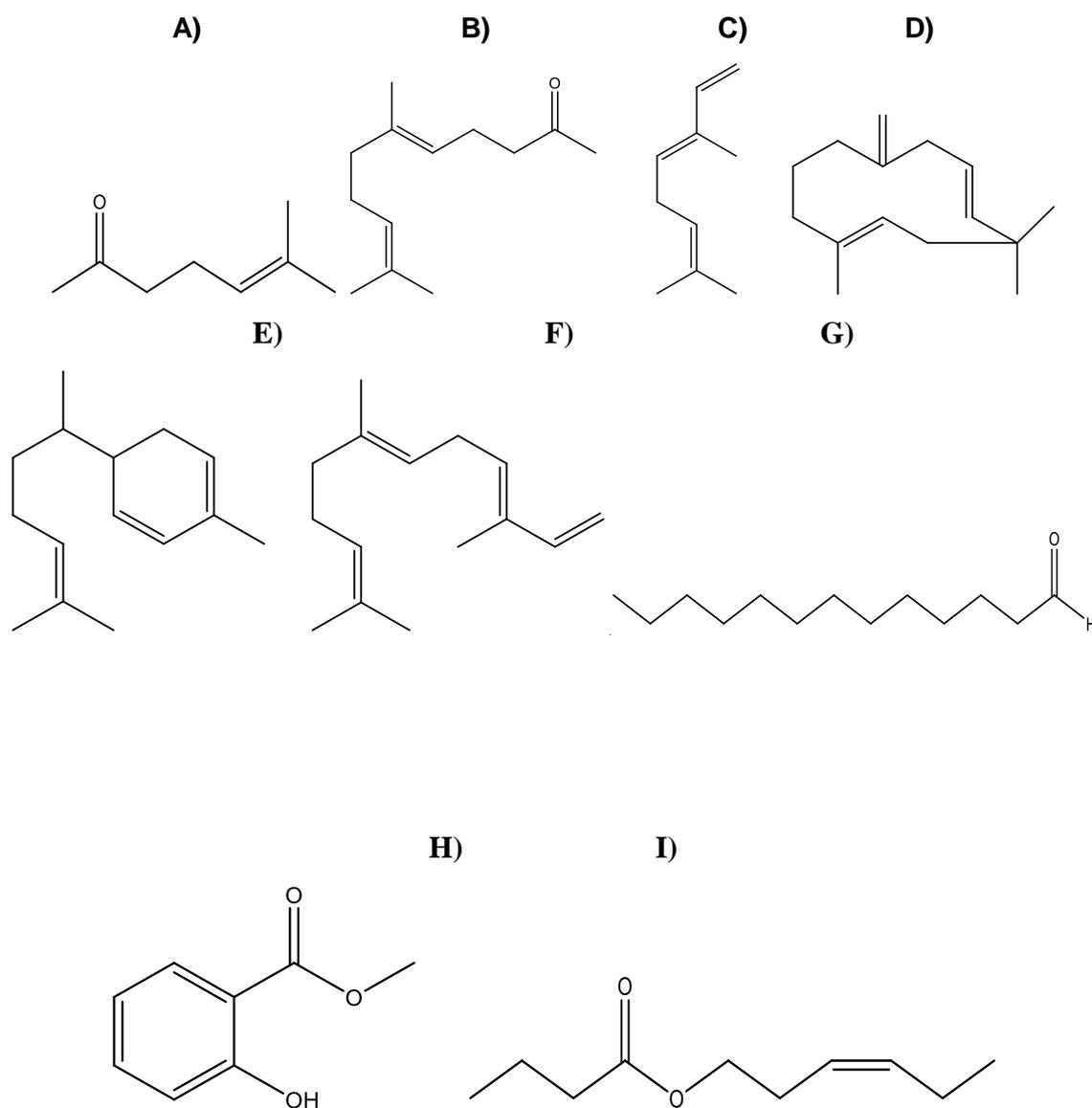


Figura 12: VOCs de soja identificados plenamente en el muestreo 2. **A)** 6-metil-5-hepten-2-ona, **B)** geranyl acetona, **C)** (E)-β-ocimeno, **D)** β-humuleno, **E)** α-zingibereno, **F)** (E,E)-α-farneseno **G)** tetradecanal **H)** salicilato de metilo **I)** butanoato de 3-(Z)-hexen-1-ilo.

6.2.3- Muestreo 3 (R₂):

En éste muestreo también se registraron diferencias apreciables respecto del blanco y de los restantes muestreos.

A continuación se presentan los compuestos identificados con sus cantidades relativas de VOCs de éste muestreo (tabla 5).

Pico	Compuesto	% Simil.	tr GC-MS (min)	tr 2 GC-MS (min)	tr GC (min)	IR GC	IR GC-MS	IR teórico	ng equiv. tridecano
1	amil-vinil carbinol	97	10,265	10,279	9,195	985	980	974	825,12
2	cetona insaturada (GLV)	*	10,364	10,35	NI	*	983	*	136,38
3	limoneno	90	11,251	11,242	NI	*	1032	1024	286,5
4	(E)- β -ocimeno	93	11,551	11,525	NI	*	1049	1044	141,49
5	butanoato de 3-(Z)-hexen-1-ilo	87	13,767	13,83	NI	*	1187	1184	12,51
6	α -copaeno	91	16,738	16,688	NI	*	1385	1374	27,48
7	β -elemeno	92	16,903	16,861	NI	*	1399	1389	57,15
8	β -humuleno	91	17,352	17,313	NI	*	1435	1436	233,61
9	?	*	17,456	17,426	NI	*	1444	*	3,18
10	?	*	17,607	17,591	NI	*	1457	*	15,56
11	hidrocarburo sesquiterpénico	*	17,891	17,811	NI	*	1475	*	20,03
12	(E,E)- α -farneseno	94	18,262	18,259	17,65 3	1515	1510	1505	1576,34
13	?	*	18,584	18,463	NI	*	1527	*	15,67
14	?	*	18,818	18,684	NI	*	1544	*	2,99
15	farnesil cianuro?	88	19,122	19,133	NI	*	1579	S/D	26,55
16	?	*	19,575	19,533	NI	*	1614	*	24,27
17	?	*	20,418	20,4	NI	*	1620	*	3,63

Tabla 5: VOCs caracterizados de muestreo 3 (R₂) de plantas de soja in vivo. NI: no identificado. S/D: sin datos.

La discriminación según el tipo de compuestos identificados es la siguiente:

Alcoholes: amil-vinil carbinol (GLV).

Hidrocarburos monoterpénicos: limoneno, (E)- β -ocimeno,

Hidrocarburos sesquiterpenos: α -copaeno, β -elemeno, β -humuleno; (*E,E*)- α -farneseno.

Ésteres: butanoato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo (GLV).

Compuestos nitrogenados: farnesil cianuro (tentativo).

En la figura 13 se representan químicamente los VOCs identificados en éste muestreo

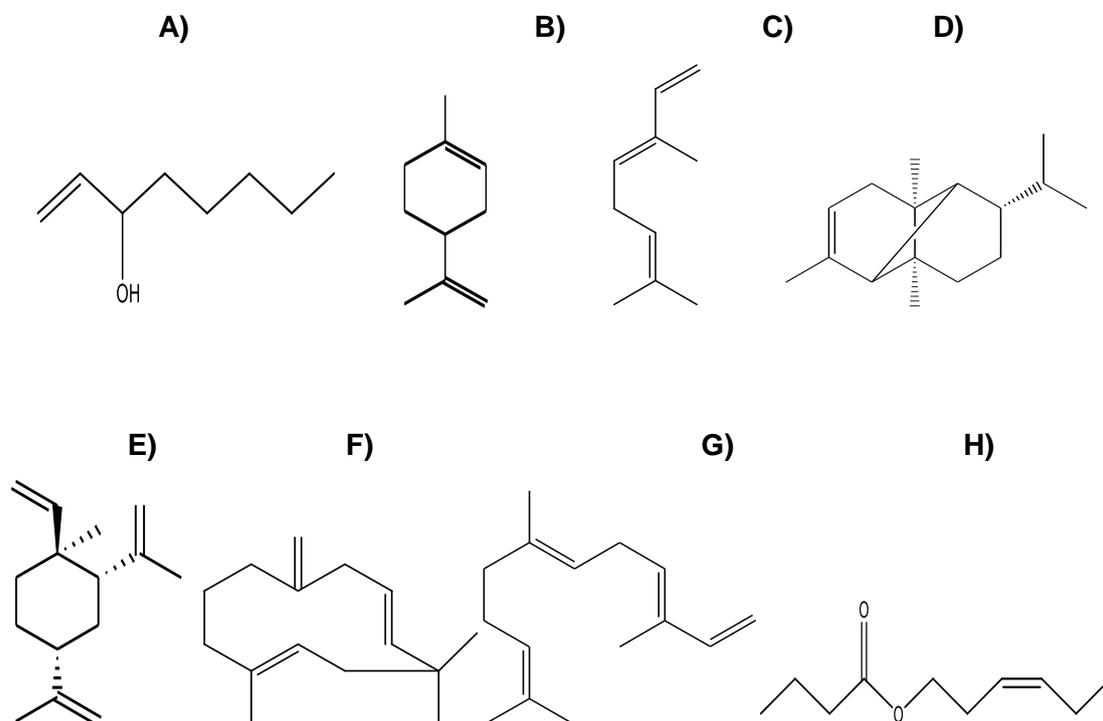


Figura 13: VOCs de soja identificados plenamente en el muestreo 3. **A)** amil-vinil carbinol, **B)** limoneno, **C)** (*E*)- β -ocimeno, **D)** α -copaeno **E)** β -elemeno **F)** β -humuleno, **G)** (*E,E*)- α -farneseno, **H)** butanoato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo.

6.2.4- Muestreo 4 (R₅):

Si bien éste muestreo fue en el que más se caracterizaron VOCs, la identificación se logró para pocos de ellos. Existen diferencias apreciables tanto a nivel cuantitativo como cualitativo respecto de los restantes muestreos.

A continuación se presentan los compuestos identificados con sus cantidades relativas de VOCs de éste muestreo (tabla 6).

Pico	Compuesto	% Simil.	tr GC-MS (min)	tr 2 GC-MS (min)	tr GC (min)	IR GC	IR GC-MS	IR teórico	ng. eq. tridecano
1	tolueno	88	5,543	5,548	NI	*	< 800	S/D	10,04
2	3-hexanona	94	5,921	5,905	NI	*	< 800	S/D	9,75
3	α -pineno	95	9,45	9,431	8,172	940	941	932	96,12
4	?	*	10,208	10,24	9,101	981	978	*	9,4
5	3-(Z)-hexenil acetato	93	10,739	10,731	9,746	1011	1001	1004	171,76
6	(E)- β - ocimeno	87	11,546	11,597	10,518	1054	1053	1044	6,95
7	?	*	12,694	12,7	NI	*	1119	*	1,11
8	4-etil- benzaldehído	93	13,692	13,645	12,631	1172	1176	S/D	43,81
9	?	*	14,134	14,125	NI	*	1205	*	4,87
10	hidrocarburo alifático (C11)	*	14,21	14,202	NI	*	1211	*	1,53
11	?	87	16,251	16,244	NI	*	1355	*	16,18
12	β -humuleno	89	17,349	17,34	16,634	1438	1437	1436	50,19
13	?	88	17,596	17,588	NI	*	1457	*	8,92
14	?	92	17,678	17,669	16,977	1464	1463	*	56,58
15	?	*	17,887	17,876	NI	*	1479	*	2,35
16	(E,E)- α - farneseno	88	18,253	18,249	17,654	1515	1510	1505	73,8
17	?	*	19,853	19,85	NI	*	1642	*	2,99
18	?	*	20,405	20,404	NI	*	1692	*	0,86
19	?		22,032	22,024	NI	*	1841	*	78,44
20	?	*	22,166	22,158	NI	*	1854	*	24,62
21	?	*	22,474	22,464	21,913	1871	1884	*	6,87
22	?	*	22,649	22,625	NI	*	1900	*	6,14

Tabla 6: VOCs caracterizados de muestreo 4 (R₅) de plantas de soja in vivo. NI: no identificado. S/D: sin datos.

La discriminación según el tipo de compuestos identificados es la siguiente:

Hidrocarburos aromáticos: tolueno (tentativo).

Cetonas: 3-hexanona (GLV) (tentativo).

Hidrocarburos monoterpénos: α -pineno, (*E*)- β -ocimeno.

Hidrocarburos sesquiterpenos: β -humuleno, (*E,E*)- α -farneseno.

Ésteres: acetato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo (GLV).

Aldehídos: 4-etilbenzaldehído (tentativo).

En la figura 14 se representan las estructuras químicas de los VOCs caracterizados en éste muestreo.

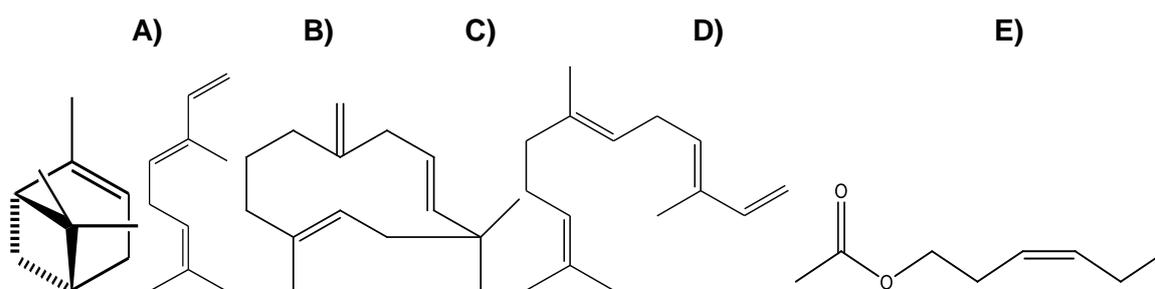


Figura 15: VOCs de soja identificados plenamente en el muestreo 4. **A)** α -pineno, **B)** (*E*)- β -ocimeno, **C)** β -humuleno, **D)** (*E,E*)- α -farneseno, **E)** acetato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo.

6.2.5- Muestreo 5 (R_3):

En éste muestreo, correspondiente a la madurez fisiológica del cultivo, se obtuvieron muy pocos VOCs. Aún así se pudieron identificar algunos no presentes en los restantes muestreos como así también variación cuantitativa de compuestos comunes a los otros muestreos.

A continuación se presentan los compuestos identificados con sus cantidades relativas de VOCs de éste muestreo (tabla 7).

Pico	Compuesto	% Simil.	tr GC-MS (min)	tr 2 GC-MS (min)	tr GC (min)	IR GC	IR GC-MS	IR teórico	ng equiv. tridecano
1	2-(<i>E</i>)-hexenal	93	7,548	7,561	NI	*	853	846	63,05
2	3-(<i>Z</i>)-hexen- 1-ol	87	7,694	7,708	NI	*	860	850	5,99
3	3-(<i>Z</i>)-hexenil acetato	88	10,723	NI	9,771	1013	*	S/D	2,48
4	(<i>E</i>)- β - ocimeno	85	11,533	11,547	10,533	1055	1050	1044	14,32
5	?	*	12,291	12,295	NI	*	1095	*	6,41
6	alqueno de cadena larga	*	15,364	15,367	NI	*	1293	*	4,89
7	?	*	16,24	16,24	NI	*	1355	*	10,3
8	hidrocarburo aromático	*	17,086	NI	16,417	1421	*	*	3,64
9	hidrocarburo sesquiterpeno	*	17,336	17,333	16,65	1439	1436	*	11,44
10	?	*	17,585	17,588	NI	*	1457	*	7,4
11	?	*	20,392	20,393	NI	*	1691	*	1,93

Tabla 7: VOCs caracterizados de muestreo 5 (R_8) de plantas de soja in vivo. NI: no identificado. S/D: sin datos.

La discriminación según el tipo de compuestos identificados es la siguiente:

Alcoholes: 3(*Z*)-hexen-1-ol (GLV).

Hidrocarburos monoterpénos: (*E*)- β -ocimeno.

Ésteres: acetato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo (GLV).

Aldehídos: 2-(*E*)-hexenal (GLV).

En la figura 15 se representan las estructuras químicas de los VOCs caracterizados en éste muestreo.

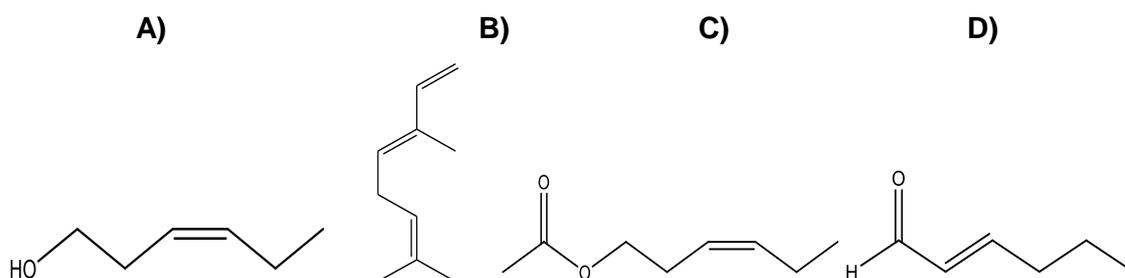


Figura 15: VOCs de soja identificados plenamente en el muestreo 5. **A)** 3-(Z)-hexen-1-ol, **B)** (E)-β-ocimeno, **C)** acetato de 3-(Z)-hexen-1-ilo, **D)** 2-(E)-hexenal.

6.2.6- Evolución de cantidades de los compuestos comunes a muestreos:

Tal cual pudo ser apreciado anteriormente, hay ciertos compuestos comunes a los distintos muestreos.

En éste apartado se pretende representar las evoluciones individuales y colectivas de dichos VOCs (tabla 8 y figuras 16 y 17).

Se puede apreciar que los compuestos (E)-β-ocimeno, (E,E)-α-farneseno y β-humuleno, siguen aproximadamente la tendencia general de la evolución de las cantidades totales de VOCs representada por el gráfico verde de la figura 17. En el mismo se puede ver claramente un máximo cuantitativo de emisión en floración.

Sin embargo, los GLVs butanoato de 3-(Z)-hexen-1-ilo y acetato de 3-(Z)-hexen-1-ilo, presentan el máximo de emisión en el estadio vegetativo avanzado y de llenado de vainas, respectivamente.

Compuesto	(V ₄ -V ₅)	(V ₈ -V ₉)	R ₂	R ₅	R ₈
(E)-β-ocimeno	NI	92,99	141,49	6,95	14,32
(E,E)-α-farneseno	NI	1595,33	1576,34	73,8	NI
β-humuleno	NI	138,4	233,61	50,19	NI
butanoato de 3-(Z)-hexen-1-ilo	NI	50,83	12,51	NI	NI
acetato de 3-(Z)-hexen-1-ilo	NI	NI	NI	171,76	2,48

Tabla 8: VOCs identificados en más de un muestreo de soja in vivo y su evolución respecto de las etapas de crecimiento y desarrollo del cultivo (en ng. equivalentes de tridecano). NI: no identificado.

Vale aclarar que posiblemente la 6-metil-5-hepten-2-ona sea el GLV indicado en el muestreo 3 con 10,364 min como tiempo de retención (aunque el % de similitud es inferior a 85%, en cuyo caso la concentración de la misma se mantendría prácticamente constante en los muestreos en los que fue identificada (136,6 ng en el muestreo 2 y 136,38 ng en el muestreo 3).

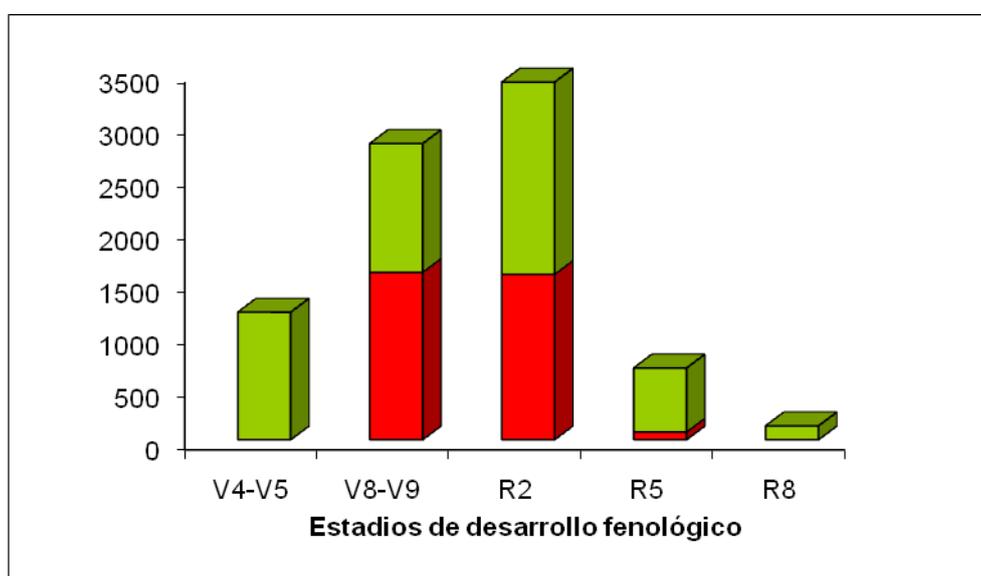
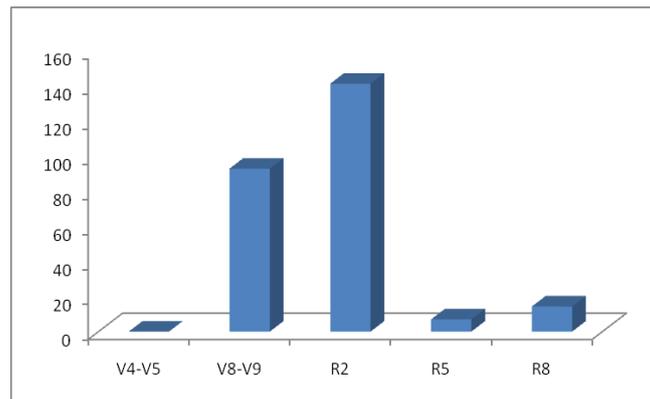


Figura 17: Evolución de los VOCs de soja (verde) y del (E,E)-α-farneseno (rojo) a lo largo de la temporada de desarrollo del cultivo de soja. Cantidades equivalentes a ng de tridecano.

A)



B)

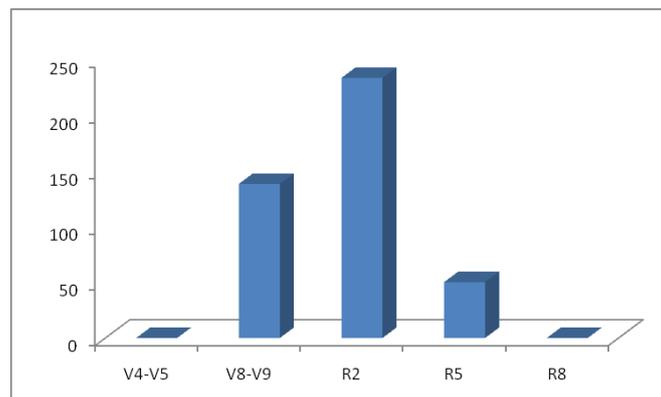
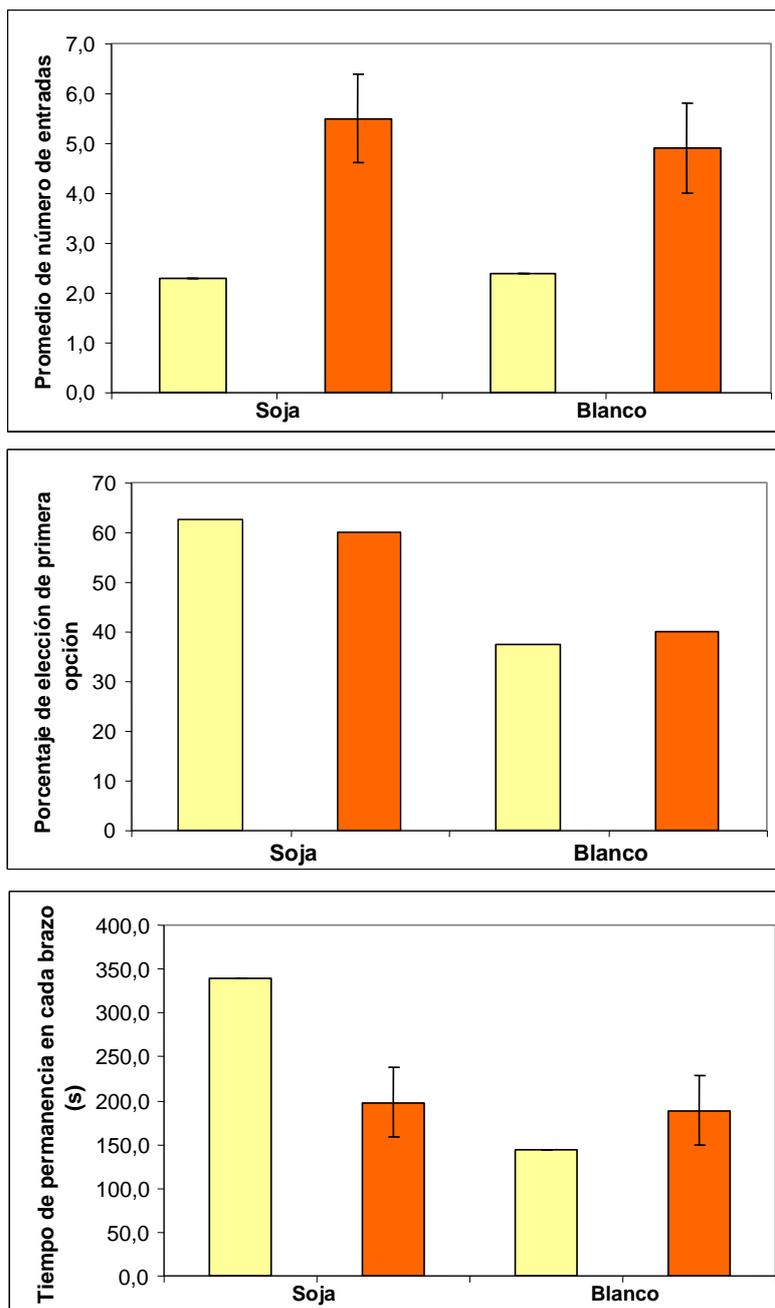


Figura 18: Evolución de (E)-β-ocimeno (A) y de β-humuleno (B) a lo largo del desarrollo fenológico de la soja. Las cantidades se expresan en ng equivalentes de tridecano.

6.3- Respuesta comportamental de insectos a los VOCs:

6.3.1- Muestreo 4, R₅.

A continuación se presentan los resultados para machos y hembras para las tres variables medidas en olfatómetro en Y.



*Figura 19: Resultados comportamentales en olfatómetro para machos (N=15) y hembras (N=8) de *P. guildinii* en cuanto a número de entradas en cada compartimento (A), porcentaje de elección de primera opción (B) y tiempo de permanencia en cada brazo (C) para los VOCs de R_5 . Las hembras se visualizan en color claro y los machos en oscuro. Nota: para las hembras no se realizó análisis estadístico debido al bajo número de individuos.*

6.3.2- Muestreo 5, R_8 .

A continuación se presentan los resultados para machos y hembras para las tres variables medidas en olfatómetro en Y.

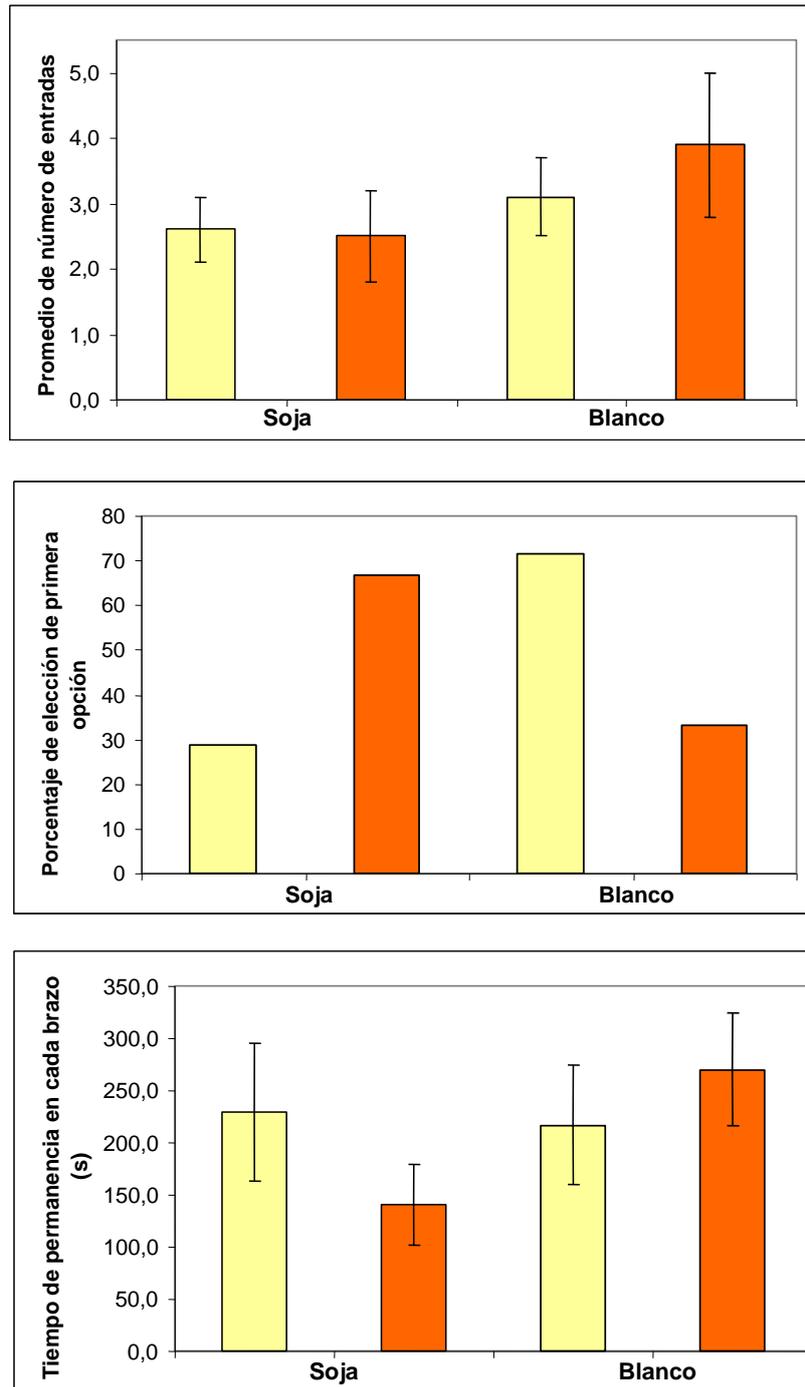


Figura 20: Resultados comportamentales en olfactómetro para machos (N=15) y hembras (N=14) de *P. guildinii* en cuanto a número de entradas en cada compartimento (A), porcentaje de elección de primera opción (B) y tiempo de permanencia en cada brazo (C) para los VOCs de R_8 . Las hembras se visualizan en color claro y los machos en oscuro.

6.3.3- Tratamiento estadístico e interpretación:

En el caso del muestreo en R₅ para los individuos machos, en las variables de porcentaje de primera elección (Test Chi cuadrado; $p > 0.4$) y promedio de número de entradas (Test de Wilcoxon; $p > 0.1$) a cada brazo; hay una leve tendencia aunque no significativa de atracción de los mismos hacia los VOCs de soja. En el caso de la variable tiempo de residencia, tampoco hay diferencia significativa entre ambos tratamientos, aunque la tendencia es a que la permanencia en ambos brazos sea prácticamente la misma, según lo ilustra la figura 19 C.

En el mismo muestreo para las hembras, no se pueden hacer inferencias ninguna porque debido a disponibilidad de insectos (en cantidad y estado fisiológico adecuado), no se consiguió un número mínimo de individuos para lograr significancia estadística. Aún, a pesar de lo antedicho, parece haber una tendencia de atracción hacia los VOCs de soja en cuanto a porcentaje de elección de primera opción y tiempo de permanencia en cada brazo.

Para el estadio R₈ e individuos machos se observa disparidad en cuanto al valor de las distintas variables, ya que hay una tendencia (nuevamente no significativa) a elegir primera opción (Test Chi cuadrado; $p > 0.1$) con tratamiento de soja. Pero he aquí que las otras dos variables, tanto promedio de número de entradas (Test de Wilcoxon; $p > 0.1$) y tiempo de residencia, sean favorables al blanco. En el caso de la última variable, hay significancia estadística de repulsión a los VOCs de soja (ejemplificado por el cuadro de error de la figura 20 C). Ello puede interpretarse en el sentido de que el insecto sensa el ambiente del olfatómetro y percibe un estímulo que lo repele y le hace huir de dicho brazo.

En el caso de las hembras parece también haber una leve tendencia (no significativa) a la repulsión de los VOCs, en las variables promedio de número de entradas (Test de Wilcoxon; $p > 0.4$) y primera opción (Test Chi cuadrado; $p > 0.1$).

Del estudio bibliográfico de éste sistema y en la procura de las causas de éste comportamiento inusual surgió que, el estándar interno usado (n-tridecano), es uno de los principales compuesto defensivos de *P. guildinii* ante parasitoides ⁽²⁰⁾, información ésta que no se tenía al principio del trabajo. De ello se puede formular la hipótesis de que el n-tridecano, aparte de ser un compuesto defensivo, pueda actuar como feromona de alarma para los individuos de *P. guildinii*. Evidentemente para comprobar o refutar dicha hipótesis se deberían hacer más bioensayos aumentando el número de individuos testados.

Aún así, ello sirvió de aprendizaje para los muestreos realizados en la temporada 2009-2010, los cuales se hicieron con tetradecano como estándar interno. Los

resultados de dichos muestreos escapan a los objetivos y tiempo de duración de la tesis de Licenciatura y no son presentados aquí.

6.4- Análisis de los VOCs por GC-EAD:

En las corridas preliminares realizadas no pudo observarse ninguna respuesta que indique atracción hacia alguno de los VOCs. Sin embargo, se sabe (González, A.; comunicación personal), que las antenas de hemípteros no presentan padrones de reacción tan claros como lepidópteros en EAD. Ello es cierto para feromonas, y aún más para posibles kairomonas debido a que la relación planta-insecto no es tan específica ni determinante para la sobrevivencia de la especie (*P. guildinii* es polífaga) como la que surge de la emisión de aquellas.

7- DISCUSION:

Un aspecto importante a destacar, entre los factores bióticos que pueden influenciar los resultados aquí obtenidos, es que al realizar el muestreo a campo el cultivo se encuentra sometido a un complejo de plagas y no solamente a la plaga en estudio. Ejemplo de ello es que en la temporada de muestreo se encontraron altas poblaciones de la arañuela (*Tetranychus urticae*, Acarina) y *Anticarsia gemattalis* (Lepidoptera). Asimismo, no debe despreciarse la posibilidad de obtener VOCs de otras fuentes durante los muestreos a campo, por ejemplo de la microfauna asociada a las plantas, o del ambiente circundante (que incluye otras plantas tales como malezas). A modo de ejemplo, compuestos como el 2-(*E*)-hexenal, α -pineno, α -zingibereno y (*E*, β)-ocimeno (informados aquí como VOCs de soja), se han reportado como emisiones de machos y hembras vírgenes de *P. guildinii*⁽⁸⁾.

7.1- Optimización del adsorbente:

En virtud de los resultados obtenidos, se pudo constatar que el Super Q[®] es un adsorbente eficiente y eficaz para el muestreo de VOCs. Por su parte, el carbón activado muestra falencias al ser selectiva su adsorción hacia los sesquiterpenos, impidiendo una correcta evaluación de las condiciones reales de emisión de las plantas.

7.2- Perfil químico de VOCs:

En cuanto a la cantidad relativa de VOCs emitidos, se pudo observar un aumento paulatino hasta el máximo en la floración, seguido de un decrecimiento abrupto hasta la madurez fisiológica, como se puede apreciar en la figura 17. Rostás et. al. reportó

menor cantidad de VOCs con el desarrollo fenológico de la soja ⁽²¹⁾, pero teniendo en cuenta solamente los estadios V₃ y R₄ y no la floración.

En cuanto a la diversidad química detectada (medida cómo la cantidad de compuestos diferentes), se puede observar un máximo en el estadio de desarrollo de llenado de vainas (R₅) (Tabla 7).

Según lo mostrado en las figuras 17 y 18, β-humuleno, (E,E-α)-farneseno y β-E-ocimeno, parecen seguir (dentro de ciertos límites de error experimental), la tendencia general de variación de las cantidades relativas de VOCs mostrada en la figura 17. El β-E-ocimeno muestra un leve incremento hacia el final de la temporada, lo que podría deberse a la emisión de *P. guildinii*, especie que alcanzó altas poblaciones hacia el final de la temporada ⁽⁸⁾.

(E,E-α)-farneseno aparece como el compuesto ampliamente mayoritario en los muestreos V₈-V₉ y R₂, siendo mayor la proporción de este compuesto que la suma de todos los restantes VOCs caracterizados en el muestreo 2 (56.5% del total de VOCs) y el 46.2 % de los VOCs en el muestreo 3. En el muestreo correspondiente a llenado de vainas (R₅) es apenas el 11.5 % de los VOCs y no fue detectado en la madurez fisiológica. Van de Boom halló dicho compuesto en una proporción del 5% de los VOCs en soja vegetativa (de 5 semanas, posiblemente V₃-V₄), donde es inducido por plantas sometidas a daño por *T. urticae* ⁽²²⁾. Esto justificaría que dicho compuesto no fuera detectado en el estadio vegetativo temprano en nuestro estudio. Sin embargo, Rostás lo encontró como mayoritario en V₃ ⁽²¹⁾, lo que puede reflejar propiamente el efecto de las condiciones ambientales y las variedades de soja empleadas.

En el muestreo correspondiente al estado vegetativo avanzado se pudo observar la presencia de salicilato de metilo (segundo compuesto mayoritario, 5% del total de VOCs), un compuesto conocido por ser elicitador de defensas químicas indirectas de la planta como consecuencia de la herbivoría de muchas especies, incluso de *T. urticae* ⁽²²⁾. Dicho compuesto ha sido reportado también como atractivo a depredadores en interacciones tritróficas ⁽²³⁾ y se ha planteado cómo un compuesto clave en la resistencia inducida contra ataques fúngicos, virales o bacterianos ⁽²⁴⁾.

El amil vinil carbinol (1-octen-3-ol) fue detectado solamente en el muestreo correspondiente a floración. Sin embargo, Boué *et. al.* determinaron que el mismo aumentaba a medida que el cultivo alcanza la madurez por emisión específica de las semillas ⁽²⁵⁾, lo que puede deberse también a la variabilidad de éste tipo de compuestos.

El acetato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo, un volátil de hoja verde (GLV), es el componente mayoritario del muestreo 4 (llenado de vainas), siendo el 26.9 % del total de los VOCs detectados, seguido por el α -pineno con un 15.1%. Anteriormente Van Den Boom *et al.* reportaron al primero de ellos cómo componente mayoritario de los VOCs inducidos por la infestación de *T. urticae* en el estadio vegetativo avanzado ⁽²²⁾.

En el muestreo 5 (madurez fisiológica), el 2-(*E*)-hexenal (otro GLV) es el componente mayoritario, alcanzando el 47.8 % de todos los VOCs. En éste muestreo se detectan otros dos GLVs: 3-(*Z*)-hexen-(1)-ol y acetato de 3-(*Z*)-hexen-1-ilo.

Si bien en todos los muestreos (salvo el primero) se detectaron GLVs, resulta interesante que los mismos hayan sido detectados como compuestos mayoritarios en los estados avanzados de madurez, donde no deberían estar apreciablemente presentes, dado que las hojas verdes son escasas. Esto puede deberse a la retención foliar de la soja, que hace que la misma llegue al final de la temporada con hojas verdes, o a la emisión por parte de las chinches que colonizaban las plantas hacia el final de la temporada.

El 2-(*E*)-hexenal posee probada actividad antifúngica ^(24,25,26,27), siendo su biosíntesis activada ante el ataque de herbívoros o patógenos. Mientras Boué reporta una disminución del contenido de este aldehído en R₇ y R₈ respecto a R₆ y a estadios vegetativos y de floración en soja no atacada ⁽²⁵⁾, en éste trabajo se encontró el patrón contrario, lo que puede deberse a una respuesta de la planta inducida por el ataque de plagas.

En el muestreo en R₅ la cetona 3-hexanona fue tentativamente identificada, y ha sido reportada anteriormente ⁽²⁵⁾. Dicho autor confirma la presencia de la misma en R₆, R₇ y R₈, con una disminución de la cantidad de la misma hasta alcanzar la madurez, lo que explicaría que no se hubiera determinado en el presente trabajo en R₈. Incluso el mismo autor postula dicho compuesto como quimioindicador de los estados de desarrollo R₆ y R₇.

Los compuestos nóveles respecto de reportes anteriores fueron tetradecanal (V₈-V₉) α -copaeno, β -elemeno (R₂) y tentativamente farnesil cianuro (V₈-V₉ y R₂), tolueno y 4-etil benzaldehído.

La posible presencia de farnesil cianuro en el estadio de floración no es sorprendente, ya que se han reportado varias oximas y nitrilos dentro de los VOCs de soja, tanto de plantas sanas como dañadas ⁽²³⁾. Asimismo, dado que el (E,E- α)-farneseno es el compuesto mayoritario en ambos estadios, no es de extrañar la presencia de vías metabólicas adicionales activas para su biotransformación.

7.3- Estudios comportamentales:

En el muestreo en R₅, *P. guildinii*, tanto en individuos machos como hembras mostró una leve tendencia a elegir como primera opción los extractos de soja, mientras que la diferencia en el valor de las variables número de entradas a cada brazo y tiempo de permanencia entre soja y blanco no es significativa.

En el muestreo en R₈, por el contrario, machos y hembras muestran una leve tendencia a entrar más veces al brazo del blanco que al brazo de los VOCs de soja. En cuanto al tiempo de residencia, hay una tendencia significativa de repulsión de machos hacia el brazo de los VOCs. Mientras tanto, en la elección de primera opción se obtuvieron resultados contrapuestos entre machos y hembras, los machos con tendencia de atracción hacia los VOCs de soja y las hembras de repulsión a los mismos.

Lo antedicho permite apreciar lo complejo que puede ser el estudio del comportamiento animal. Aún así en éste caso puede haber incidencia directa del estándar interno en dicho comportamiento, ya que por falta de información se incurrió a uno de los principales compuestos defensivos secretados por las chinches.

8- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

En éste trabajo se identificaron VOCs de soja reportados anteriormente y se reporta la existencia de algunos volátiles nuevos.

La evaluación comportamental hacia los VOCs, parece ser poco clara con resultados contrapuestos para R₅ y R₈, aunque puede haberse debido a errores de la metodología utilizada. Los estudios electroantenoográficos hasta el momento no han arrojado ningún resultado concluyente.

Aunque no se ha obtenido evidencia comportamental y electrofisiológica, se seguirá investigando sobre las bases químicas de la comunicación interespecífica entre *P. guildinii* y *G. max*. Una aliciente importante para éste trabajo es el hecho de que a campo se ha observado (Castiglioni, E.; comunicación personal) un rápido aumento de la población de la plaga en un corto período de tiempo posterior a la floración. Las bases de éste comportamiento pueden subyacer en la percepción por parte de los insectos de un estímulo químico proveniente de la planta (kairomona) que ha sido adaptativamente seleccionado para la ubicación de la fuente de alimentación.

9- AGRADECIMIENTOS:

Éste trabajo ha sido posible gracias a muchas personas.

Porque en éste proceso he tenido la fortuna de conocer un grupo humano fantástico, a los que orgullosamente puedo llamar amigos. Porque he aprendido que la investigación es mucho más que pasar horas en un laboratorio indagando lo desconocido, es una vocación. Porque como todo en la vida, tiene sus momentos duros, tiene sinsabores y frustraciones. Pero también tiene esos momentos únicos en los cuales uno siente que aporta su granito de arena para la construcción de un mundo mejor, más justo y más humano.

Agradezco profundamente a mi tutores, Prof. Dr. (Phd) Andrés González y la Prof. Dra. (Phd) Carmen Rossini por toda la paciencia y comprensión, así como el ánimo que me suministraron a lo largo de todo este proceso. Por poner todos los recursos a mi disposición para poder realizar éste trabajo y confiar en mí. A todos mis compañeros de laboratorio: Qca. Carolina Sellanes, Lic. Qca. María Laura Umpierrez, Lic. Biol (Msc) Paula Altesor, Bioq. Clin. Lucía Castillo, Qca. Martina Díaz, Ayud. Inv. Alejandro Fredes, Qca. Farm. (Msc) Soledad Camarano, Lic. Biol Estela Santos, Qca. Farm Irene Ávila, Qca. Farm. Paola Liberatti, Lic. Biol. Florencia Doño, Ayud. Inv. Valeria Cal; por su calidez humana, por todas las enseñanzas del día a día y por su solidaridad. A los integrantes de la Cátedra de Entomología de EEMAC: Ing Agr. Dr. Enrique Castiglioni, Ing. Agr. (Msc) Adela Ribero, Ing. Agr. Horacio Silva, Ing. Agr. Claudia Pereyra y Ayud. Inv. Noel Martínez por su disposición, ayuda y afabilidad a la hora de hacer los trabajos de campo.

A mi familia y amigos extra LEQ, por siempre motivarme a seguir, a darme aliento y fuerza cuando las cosas parecían no salir.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por apoyar mi iniciación científica.

Manuel Minteguiaga Carbajal

Junio de 2010

10- BIBLIOGRAFIA:

- (1) Burkart, A.; en Parodi, L. R.; "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Volumen 1: Descripción de plantas cultivadas"; Editorial ACME S.A.C.I.; Buenos Aires; 1959; página 501.
- (2) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.; "Brock. Biología de los Microorganismos"; 8ª edición revisada; Ed. Prentice Hall; Madrid; 1997.

- (3) Fehr, W. R.; Caviness; C. E.; Burmood, D.T.; Pennington, J. S.; Stage of Development descriptions for Soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill; *Crop Science*; Vol. 11, pp 929-931; 1971.
- (4) Blum, A.; Narbondo, I.; Oyhantcabal, G.; Sancho, D.; Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. La nueva colonización; RAP-AL; 2008.
- (5) Bentancourt, C.M.; Scatoni, I. B.; Guía de Insectos y Ácaros de Importancia Agrícola y Forestal en el Uruguay; Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur; Montevideo; 1999.
- (6) Castiglioni, E; La soja avanza sobre el paisaje y la chinche avanza sobre la soja. *Revista Cangüé N° 26. Estación Experimental Mario A. Cassinoni, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Paysandú, Uruguay. p. 2-6, 2004.*
- (7) Schoonhoven, L. M.; Van Loon, J. J. A.; Dicke, M.; *Insect-Plant Biology*; Second Edition; Oxford University Press; 2005.
- (8) Moraes, M.C. B.; Laumann, R. A.; Pareja, M.; Sereno, F. T. P. S.; Michereff, M. F. F.; Birkett, M. A.; Pickett, J. A.; Borges, M.; Attraction of the Stink Bug egg parasitoid *Telenomus podisi* to defence signals from soybean activated by treatment with *cis*-jasnone; *Ent. Exp. et App.*; 131:178-188; 2009.
- (9) Kesselmeier, J.; Staudt, M.; Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology; *Journal of Atmospheric Chemistry*; Vol. 33; pp 23–88, 1999.
- (10) Liu, S. H.; Norris, D. M. ; Lyne, P. ; Volatiles from the Foliage of Soybean, *Glycine max*, and Lima Bean, *Phaseolus lunatus*: Their Behavioral Effects on the Insects *Trichoplusia ni* and *Epilachna varivestris*; *J. Agric. Food Chem.*; 37:496-501; 1989.
- (11) Van Den Boom, C. E.; Van Beek, T. A.; Posthumus, M. A.; De Groot, A.; Dicke, M.; Qualitative and Quantitative variation among Volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families; *J. Chem. Ecol.*; 30, 1: 69-89; 2004.
- (12) Zhu, J.; Park, K. C.; Methyl Salicylate, a Soybean Aphid-Induced Plant Volatile Attractive to the predator *Coccinella setempunctata*; *J. Chem. Ecol.*; 31, 8:1733-1746; 2005.
- (13) Gardner, H. W.; Dornbos Jr., D. L.; Desjardins, A. E.; Hexanal, *trans*-2-Hexenal, and *trans*-2-Nonenal Inhibit Soybean, *Glycine max*, Seed Germination; *J. Agric. Food Chem.*; 38, 6:1316-1320; 1990.

- (14) Umpierrez, M.; Santos, E.; González, A.; Rossini, C., Tipificación química y bioactividad de aceites esenciales de plantas nativas contra *Varroa destructor*, ectoparásito de *Apis mellifera*; DQO, Facultad de Química.
- (15) Adams, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry; 4th Ed.; Allured Publishing Corporation; Carol Stream, IL; 2007.
- (16) Zar, J.H.; Biostatistical Analysis; 4th ed.; Prentice Hall; New Jersey; 1999.
- (17) Agosta, W. C. Chemical communication, the language of pheromones. Scientific American Library; New York; 1992.
- (18) González, A., Laboratorio de Ecología Química: que podemos hacer?; ponencia presentada en encuentro Entomología-Ecología Química, Facultad de Agronomía (UdelaR); Noviembre 2008.
- (19) Logan, J. G.; Birkett, M. A.; Clark, S. J.; Powers, S.; Seal, N. J.; Wadhams, L. J.; Mordue, A. J.; Pickett, J. A.; Identification of Human-Derived Volatile Chemicals that Interfere with Attraction of *Aedes aegypti* Mosquitoes; *Journal of Chemical Ecology*, Vol 34; pp 308-322; 2008.
- (20) Laumann, R. A.; Aquino, M. F. S.; Moraes, M. C. B.; Pareja, M.; Borges, M.; Response of the Egg Parasitoid *Trissolcus basalis* y *Telenomus podisi* to Compounds from Defensive Secretions of Stink Bugs; *Journal of Chemical Ecology*, Vol 35; pp 8-19; 2009.
- (21) Rostás, M.; Eggert, K.; Ontogenic and spatio-temporal patterns of induced volatiles in *Glycine max* in the light of the optimal defence hypothesis; *Chemoecology*; 18:29-38; 2008.
- (22) Van Den Boom, C. E.; Van Beek, T. A.; Posthumus, M. A.; De Groot, A.; Dicke, M.; Qualitative and Quantitative variation among Volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families; *J. Chem. Ecol.*; 30, 1: 69-89; 2004.
- (23) Zhu, J.; Park, K. C.; Methyl Salicylate, a Soybean Aphid-Induced Plant Volatile Attractive to the predator *Coccinella setempunctata*; *J. Chem. Ecol.*; 31, 8:1733-1746; 2005.
- (24) Shulaev, V.; Silverman, P.; Raskin, I.; Airborne signalling by Methyl Salicylate in Plant-Pathogen resistance; *Nature*; 385: 718-721.
- (25) Boué, S. M.; Shih, B. Y.; Carter-Wientjes, C. H.; Cleveland, T. E.; Identification of Volatile Compounds in Soybean at Various Developmental Stages Using Solid Phase Microextraction; *J. Agric. Food Chem.*; 51:4873-4876; 2003.

- (26) Gardner, H. W.; Dornbos Jr., D. L.; Desjardins, A. E.; Hexanal, *trans*-2-Hexenal, and *trans*-2-Nonenal Inhibit Soybean, *Glycine max*, Seed Germination; *J. Agric. Food Chem.*; 38, 6:1316-1320; 1990.
- (27) Boué, S. M.; Shih, B. Y. ; Carter-Wientjes, C. H. ; Cleveland, T. E.; Effect of Soybean Lipoxygenase on Volatile Generation and Inhibition of *Aspergillus flavus* Mycelial Growth; *J. Agric. Food Chem.*; 53:4778-4783; 2005.