



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

KAIROMONA Y FEROMONA DE AGREGACIÓN DE *Optatus palmaris* (PASCOE, 1889) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

JOSÉ MANUEL PINEDA RÍOS

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Kairomona y feromona de agregación de *Optatus palmaris* (Pascoe, 1889) (Coleoptera: Curculionidae)**, realizada por el estudiante: **José Manuel Pineda Ríos**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

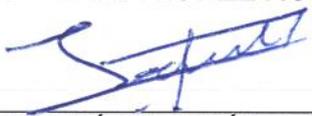
CONSEJERO


DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

ASESORA


DRA. ROSA MARÍA LÓPEZ ROMERO

ASESOR


DR. LUIS MARTÍN HERNÁNDEZ FUENTES

ASESORA


DRA. MARÍA CELINA MICAELA LLANDERAL CÁZARES

ASESOR


DR. JESÚS ROMERO NÁPOLES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, enero de 2023

KAIROMONA Y FEROMONA DE AGREGACIÓN DE *Optatus palmaris* (PASCOE, 1889) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

**José Manuel Pineda Ríos, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un fruto tropical con usos alimenticios, terapéuticos, de conservación de agroecosistemas y propiedades insecticidas. México es el principal productor y exportador de este frutal a nivel mundial. El proceso productivo de la guanábana es limitado principalmente por problemas fitosanitarios que pueden ocasionar pérdidas considerables durante el cultivo y la postcosecha. En 2006 se reportó por primera vez al picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* (Pascoe)), un curculiónido cuya larva y adulto ocasionan daños severos externos e internos a frutos. Una alternativa para el monitoreo y manejo de curculiónidos, que pudiera ser empleada para el picudo de las anonáceas, es el uso de semioquímicos, específicamente la feromona de agregación que actúa en sinergia con los compuestos volátiles de la planta hospedante (kairomona). Sin embargo, a la fecha no existe investigación sobre dichos semioquímicos, ni de sus interacciones y de los mecanismos detrás de éstas. En este sentido, el objetivo de este trabajo de investigación fue aislar y caracterizar químicamente los componentes de la kairomona y la feromona de agregación del picudo de las anonáceas, así como determinar la actividad biológica de los semioquímicos en laboratorio. Se realizó el arrastre de compuestos volátiles de diferentes fuentes de olores, separación e identificación de éstos a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se determinó la presencia de α -terpineol, un monoterpenoide producido exclusivamente por machos de la especie, con mayor emisión cuando éstos se encontraban alimentándose de guanábana. Pruebas de olfatometría determinaron que el efecto biológico de atracción del α -terpineol hacia ambos sexos era potenciado con los volátiles emitidos por la guanábana, específicamente aquellos liberados por frutos en etapa de madurez fisiológica. En estos últimos, se determinó la presencia de alrededor de 129 compuestos, entre los que destacaron por su correlación biológica atrayente el benzotiazol, cariofileno, benzofenona y nerolidol.

Palabras clave: feromona de agregación, α -terpineol, kairomona.

KAIROMONE AND AGGREGATION PHEROMONE OF *Optatus palmaris* (PASCOE, 1889) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

**José Manuel Pineda Ríos, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) is a fruit with diverse usages including food source, nutraceutical effects, agro-ecosystems conservation, and insecticidal properties. Mexico is the main producer and exporter worldwide of this fruit. However, the production of this crop is limited by several phytosanitary problems, which cause big losses during its growth and post-harvest time. In 2006, the annonaceae weevil (*Optatus palmaris* (Pascoe)) was reported for the first time as a new pest for soursop fruits. The larva and adult of this curculio cause severe external and internal damage to the fruits. In this regard, the use of semiochemicals, aggregation pheromone and kairomone, represents an alternative for the management of this pest. Nonetheless, nowadays there is no data about the chemical composition of such ecochemicals, neither of its interactions or mode of action. In the context the aims of this research were to isolate, identify, and characterize the chemical constituents of the aggregation pheromone and kairomone of the annonaceae weevil, and determine their biological activity. To do so, dynamic headspace was used to trap volatile compounds and they were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The analyses showed the production of α -terpineol as a main volatile during the feeding of male weevils. Subsequently, olfactometry assays demonstrated the attraction caused by this compound to both weevil sexes. Moreover, the attraction effect produced by α -terpineol was potentiated by the aroma of soursop fruit, especially those who reached physiological maturity. Finally, benzothiazole, caryophyllene, benzophenone and nerolidol were determined as some of the compounds most correlated to the attraction of the annonaceae weevil and were pointed out as potential constituents of the soursop kairomone.

Key words: aggregation pheromone, α -terpineol, kairomone.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo financiero proporcionado durante mis estudios de doctorado.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Postgrado de Fitosanidad - Entomología y Acarología** por darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al **Dr. Juan Cibrián Tovar**, por su gran apoyo como consejero, por darme la oportunidad y brindarme su confianza para permitirme hacer este trabajo, que con su experiencia y paciencia supo guiarme hasta la culminación del mismo, dándome siempre consejos y sugerencias acertadas.

Al **Dr. Luis Francisco Salomé Abarca**, por el gran apoyo brindado durante mis estudios de doctorado. Por compartir conmigo gran parte de sus conocimientos, experiencia profesional y contribuir con ellos al buen término de esta investigación.

A la **Dra. Rosa María López Romero**, por todo el apoyo brindado. Por siempre estar en disposición de apoyar en el desarrollo de esta investigación y emitir siempre sus mejores comentarios y consejos.

A la **Dra. Celina M. Llanderal Cázares**, por la atención brindada y las aportaciones constructivas a este trabajo. Gracias por su valioso apoyo, confianza y enseñanzas durante mis estudios de doctorado.

Al **Dr. Luis Martín Hernández Fuentes**, por sus aportaciones, tiempo dedicado para la presente investigación y la confianza depositada para concluir ésta.

Al **Dr. Jesús Romero Nápoles**, por el apoyo brindado durante toda la investigación. Por los consejos brindados para el desarrollo personal y profesional.

Al **Dr. Lauro Soto Rojas**, que de manera cordial y atenta me brindó su apoyo y mostró siempre gran interés por el trabajo desarrollado, dando consejos y contribuyendo de forma práctica con base en toda su experiencia.

Al **M. C. Jorge Valdez Carrasco**, por el apoyo incondicional brindado durante mi etapa de doctorado. Por siempre estar dispuesto a apoyar a todo estudiante cuando le es solicitado.

Al **Dr. Ariel Guzmán Franco**, por el apoyo brindado para el desarrollo de mis estudios de doctorado.

A **Verónica Romero**, por los buenos consejos y siempre estar dispuesta a apoyarme en todo momento.

A la **Dra. Guadalupe Carrillo**, por su amistad, enseñanza y apoyo durante el desarrollo de la investigación.

A la **Dra. Norma Robledo, Dra. Paola Rossy García y M.C. Abraham Sánchez**, por abrirme las puertas de su espacio de trabajo y brindarme el apoyo solicitado.

A los **doctores del Postgrado de Fitosanidad**, por todo el conocimiento compartido y brindarme siempre su apoyo incondicional cuando lo necesitaba.

Al **personal administrativo del Postgrado**, por el excelente trabajo que realizan en apoyo a todos los estudiantes.

Al **Ing. Cristian Salas**, por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Campo Experimental Santiago Ixcuintla del INIFAP y ayuda durante las recolectas de insectos.

Al **Sr. Gamaliel Virgen**, por su confianza brindada para poder ingresar a sus huertos de guanábana para la recolecta de frutos e insectos.

DEDICATORIA

A **mis padres:** Ignacia Ríos Nava y Rigoberto Pineda Ochoa, por todo el amor y apoyo que siempre me han dado. Por enseñarme que con trabajo y esfuerzo podemos cumplir nuestros objetivos.

A **mis hermanos:** Jesús, Aurora, Zeida, Carime, Marideisa, Ma. Adelvit, Nelida y Analut, por estar siempre a mi lado apoyándome de manera incondicional, por su cariño y buenos consejos que de su parte siempre recibo.

A **Luis Francisco** por siempre estar conmigo apoyándome en lo personal y formación académica. Por siempre motivarme y enseñarme a ser mejor cada día.

A **mis compadres:** Rocío, Daniel y Mercedes por su cariño y apoyo brindado.

A **mis amigos:** Isabel R., Verónica, Brenda, Fátima, Lupita, Francisca, Adriana, Pablo, Edith, Valeria, Miguel, Karen, Abraham, Isabel S., Yobani, Yeimi... gracias por su amistad.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Superfamilia Curculionoidea	3
Familia Curculionidae	4
El picudo de las anonáceas (<i>Optatus palmaris</i>)	5
Daños ocasionados en anonáceas	8
Estrategias de manejo de <i>Opatus palmaris</i>	8
Semioquímicos	9
Clasificación de los semioquímicos	9
Semioquímicos para monitoreo y control de plagas	11
Técnicas con potencial para el monitoreo y control de picudos.....	11
OBJETIVOS.....	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
CAPÍTULO I. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FEROMONA DE AGREGACIÓN DE <i>Optatus palmaris</i>	13
1.1 RESUMEN.....	13
1.2 ABSTRACT	14
1.3 INTRODUCCIÓN.....	15
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1.4.1 Recolección de insectos y corroboración de la especie	17
1.4.2 Captura de volátiles.....	17
1.4.2.1 Microextracción en fase sólida (MEFS).....	17
1.4.2.2 Aireación dinámica (AD)	18

1.4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	19
1.4.4 Efectos de recuperación de matriz	19
1.4.5 Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).....	20
1.4.6 Bioensayos.....	20
1.4.6.1 Experimentos de alimentación inversa	20
1.4.6.2 Respuesta conductual de picudos machos y hembras a compuestos volátiles	21
1.4.7 Análisis estadístico.....	23
1.5. RESULTADOS.....	24
1.6 DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN QUIMIOMÉTRICA DE LOS COMPONENTES DE LA KAIROMONA DEL PICUDO DE LAS ANONÁCEAS, <i>Optatus palmaris</i> (PASCOE, 1889)	37
2.1 RESUMEN.....	37
2.2 ABSTRACT	38
2.3 INTRODUCCIÓN.....	39
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.4.1. Material vegetal	40
2.4.2. Recolección de insectos y cría	41
2.4.3. Colección de volátiles	42
2.4.4. Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (CG-EM)	42
2.4.5. Olfatometría	43
2.4.6. Análisis estadístico.....	44
2.4.7. Análisis Multivariado	45
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIÓN GENERAL.....	54
LITERATURA CITADA	55
ANEXO 1	66
ANEXO 2	81

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1. Combinaciones de fuentes de olor utilizadas en ensayos de olfatometría. 23

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Combinaciones de fuentes de olor utilizadas en ensayos de olfatometría. 44

ANEXO 1

Cuadro 1. Preparación de diluciones para determinar la cantidad mínima detectable de α -terpineol con base en la relación señal/ruido. 68

Cuadro 2. Preparación de diluciones para la elaboración de la curva de calibración de 15 puntos. 72

Cuadro 3. Pesos registrados de cada una de las diluciones de la curva de calibración. 73

Cuadro 4. Áreas de α -terpineol, para la curva de calibración. 75

ANEXO 2

Cuadro 1. Compuestos volátiles orgánicos determinados a través de CG-EM en diferentes órganos vegetales de guanábana. 81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Huevo de <i>Optatus palmaris</i>	6
Figura 2. Larva de <i>Optatus palmaris</i>	6
Figura 3. Adulto de <i>Optatus palmaris</i>	7
Figura 4. Daños ocasionados por <i>Optatus palmaris</i> en guanábana.	8

CAPÍTULO I

Figura 1. Preferencia olfativa de machos y hembras de <i>Optatus palmaris</i> a diferentes fuentes de olores estímulos, simples o dobles.....	27
Figura 2. Cromatogramas de mezclas volátiles producidas por diferentes fuentes de olor.	28
Figura 3. Identificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas de α -terpineol	29
Figura 4. Cromatogramas representativos de los efectos de alimentación e inanición sobre la liberación de α -terpineol por <i>Optatus palmaris</i>	31

CAPÍTULO II

Figura 1. Preferencia olfativa de hembras (color verde) y machos (color azul) de <i>Optatus palmaris</i> a flores de guanábana retados contra frutos maduros (G4)	47
Figura 2. Análisis multivariado de volátiles emitidos por frutos y flores de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.).....	48
Figura 3. Preferencia olfativa de machos y hembras de <i>Optatus palmaris</i> hacia frutos de guanábana en diferentes estados fenológicos.....	49
Figura 4. Análisis multivariado de datos de volátiles emitidos por frutos y flores de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.).....	50

ANEXO 1

Figura 1. Sobreposición de cromatogramas de concentraciones bajas de α -terpineol para la determinación visual del límite de detección (LOD) con base en la relación señal/ruido.....	71
Figura 2. Integración manual del α -terpineol de 0.039 ng μL^{-1} (área = 2568).	71
Figura 3. Sobreposición de cromatogramas de 0.044 a 627.53 ng μL^{-1} de α -terpineol.....	74
Figura 4. Integración de α -terpineol, de 10.16 ng μL^{-1}	75
Figura 5. Representación gráfica de regresión lineal para 15 estándares de α -terpineol.....	76
Figura 6. Representación gráfica de regresión lineal para 12 estándares de α -terpineol.....	77

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las especies de la familia Annonaceae son de origen tropical y con distribución en ambos hemisferios, se ubican dentro de las plantas más primitivas de las angiospermas. En México se localizan en los estados del Centro, Golfo, Pacífico y se les reconocen usos alimenticios, terapéuticos, de conservación de agroecosistemas y propiedades insecticidas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2016). Dentro de esta familia, los cuatros géneros de mayor importancia económica por su calidad frutícola y potencial farmacéutico son *Annona*, *Rollinea*, *Uvaria* y *Asimina* (Hernández-Vidal *et al.*, 2014). En México se ubican 14 géneros y 63 especies de la familia Annonaceae identificados hasta ahora, de éstas, las de mayor importancia económica son guanábana (*A. muricata*), chirimoya (*A. cherimola*), saramuyo (*A. squamosa*), ilama o papausa (*A. diversifolia*), anona colorada o amarilla (*A. reticulata*) y chincuya o cabeza de negro (*A. purpurea*) (Andrés y Andrés, 2011). Únicamente la guanábana y la chirimoya se cultivan con fines comerciales, ya que el resto de las especies se encuentran en traspatio o en la vegetación natural, de donde se recolectan los frutos para consumo en fresco; sin embargo, el cultivo de la guanábana es la actividad de mayor importancia agrícola entre las anonáceas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2013). En 2019 se establecieron 3,612.54 ha de este cultivo, con una producción anual de 30,790.70 t. El principal estado productor de este frutal es el estado de Nayarit, que aporta el 75.44% de la producción nacional, seguido de Michoacán, Colima, y Guerrero (SIAP, 2019).

El cultivo de la guanábana es limitado principalmente por problemas fitosanitarios que pueden ocasionar pérdidas considerables durante el cultivo y postcosecha. Algunas de sus plagas más importantes son el barrenador de la semilla (*Bephratelloides cubensis* Ashmead), palomilla barrenadora de frutos (*Cerconota anonella* (Sepp)), barrenador de frutos (*Oenomaus ortygnus* (Cramer)), cochinilla rosada del hibiscus (*Maconellicoccus hirsutus* (Green)), piojo harinoso (*Planococcus citri* (Risso)), antracnosis (*Colletrotichum gloeosporioides* (Penzig)), muerte descendente de ramas y pudrición del fruto (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat)) (Hernández-Fuentes *et al.*, 2013). Aunado a todas estas plagas, en 2006 se reportó por primera vez a *Optatus palmaris* (Pascoe) (Coleoptera: Curculionidae: Baridinae) atacando frutos de guanábana en las Varas, Nayarit (Hernández-Fuentes *et al.*, 2013), no obstante, no era considerado como un insecto plaga de importancia para el cultivo, si no hasta después de los trabajos realizados por

Maldonado-Jiménez (2013) y Maldonado-Jiménez *et al.* (2014). El adulto se alimenta del tejido tierno de la epidermis del fruto, lo perfora y oviposita en él; las larvas se alimentan de la pulpa y semilla, con lo que merman su calidad y favorecen el desarrollo de patógenos (Hernández-Fuentes *et al.*, 2018). Otra de las partes del fruto que el insecto usa como alimento es el pedúnculo, lo cual afecta tejidos vasculares y produce la caída del fruto. Cuando no existen frutos disponibles, los adultos se alimentan de las flores y también producen su caída (Castañeda-Vildózola *et al.*, 2009). Debido a su reciente detección y rápida propagación, la investigación sobre el control del picudo de las anonáceas se limita a la rotación de algunos insecticidas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2021). Sin embargo, esta estrategia no es suficiente para controlar completamente el nivel de población de picudos y, por ende, los daños que causan. Es necesario la implementación de algunas otras tácticas que puedan actuar de manera aditiva o sinérgica con las ya existentes y de menor impacto ambiental y a la salud humana.

Un método de manejo que se ha explorado en años recientes es el uso de compuestos modificadores del comportamiento insectil conocidos como semioquímicos (Larsson, 2016), dentro de los cuales se encuentran las feromonas (primarias y secundarias, de comunicación intraespecífica) y aleloquímicos (kairomonas, alomonas y sinomonas, de comunicación interespecífica) (Dickie y Sabelis, 1988). Las feromonas secundarias provocan una respuesta conductual inmediata o de corto plazo, con base en lo cual se dividen principalmente en sexuales, de alarma, marcasenderos, de dispersión y de agregación. Esta última es emitida principalmente por machos y atrae individuos de ambos sexos para la alimentación, el apareamiento o la hibernación (Ali y Morgan, 1990). Por otro lado, se encuentran las kairomonas, que son sustancias volátiles liberadas por un primer organismo y al ser percibidas por un individuo de otra especie (organismo 2), evocan un comportamiento y/o respuesta fisiológica que es favorable para este último (Dicke y Sabelis, 1988). Dentro del manejo con semioquímicos, el uso individual de feromonas o combinado con atrayentes alimenticios o kairomonas ha mostrado tener un efecto aditivo o sinérgico con gran capacidad para el monitoreo y manejo de plagas (Reddy y Guerrero, 2004). Adicionalmente, estas sustancias representan una herramienta robusta, de bajo impacto para el ambiente, específica y altamente sensible para la detección temprana de infestaciones. Por ejemplo, una trampa cebada con feromona puede detectar la presencia de un insecto en el cultivo, mientras que numerosas técnicas de muestreo tradicionales pueden no proporcionar información exacta (Piñero y Ruiz - Montiel, 2012).

Uno de los casos más exitosos del uso de semioquímicos en monitoreo y manejo de curculiónidos en México se reporta en cultivos de cocotero. En estas plantaciones uno de los problemas fitosanitarios más importantes son las infestaciones por *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus), comúnmente conocido como picudo negro del cocotero, principal vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) causante de la enfermedad anillo rojo. Para su manejo se ha utilizado con efectividad su feromona de agregación conocida como rhynchophorol, la cual puede utilizarse de forma individual o en conjunto con un atrayente alimenticio para trapeo de adultos de ambos sexos (CENIPALMA, 2017). Otro claro ejemplo de la efectividad del uso de feromonas de agregación en combinación con volátiles emitidos por las plantas hospedantes es su uso para el monitoreo y trapeo masivo del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal) (Piñero y Ruiz-Montiel, 2012). En un estudio realizado por Figueroa-Castro *et al.* (2017), se determinó que el uso de esta técnica puede reducir las poblaciones de esta plaga de 542.8 a 2.8 picudos/trampa/quincena, lo cual disminuye consecuentemente el nivel de daño en el cultivo. Por tanto, la implementación de estrategias de monitoreo y manejo mediante semioquímicos para poblaciones de *O. palmaris* en cultivos de anonáceas podría representar una alternativa para su manejo y conservación del estatus fitosanitario del cultivo. Actualmente no existe investigación alguna sobre la emisión de volátiles feromonales de esta plaga, de su planta hospedante, ni de sus interacciones y mecanismos detrás de éstas. Por ello, es de vital importancia la determinación de la constitución química y el efecto biológico de la feromona de agregación y kairomona para el manejo de *O. palmaris* en cultivos de anonáceas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Superfamilia Curculionoidea

Los Curculionoidea conocidos como gorgojos o picudos, representan uno de los grupos con mayor número de especies del reino animal. Se han descrito aproximadamente 62,000 especies, pero se estima que pueden existir unas 220,000 (Oberprieler *et al.*, 2007), distribuidas en 5,800 géneros asignados a siete familias (Nemonychidae, Anthribidae, Belidae, Attelabidae, Caridae, Brentidae y Curculionidae) (Morrone, 2014). En México se han descrito 603 géneros y 3,594 especies, que representan el 17% y 5.8%, respectivamente, de la diversidad mundial. Cerca del 40% de las especies son endémicas y son pertenecientes a seis familias, ya que la única

ausente en el país es Caridae (Morrone, 2014; Ordóñez-Reséndiz *et al.*, 2008). La principal característica diagnóstica de las especies de Curculionoidea es la presencia de una proyección anterior de la cabeza, denominada rostrum, en cuyo ápice se localiza el aparato bucal masticador. En la mayoría de los Curculionidae el rostrum es muy largo y delgado; corto y ancho en Entiminae y extremadamente corto o incluso ausente en Scolytinae y Platypodinae (Morrone, 2014).

Familia Curculionidae

Comprende alrededor de 4,600 géneros y 51,000 especies descritas, presentes en diferentes regiones del mundo. Las especies de esta familia se alimentan sobre prácticamente todas las plantas, principalmente angiospermas, pero también gimnospermas, pteridofitas, briófitas y líquenes, y ocasionalmente pueden alimentarse sobre algas y cianobacterias. Las larvas de curculiónidos predominantemente viven en el interior de algunas partes de las plantas, desde raíces hasta brotes, flores y semillas (Oberprieler *et al.*, 2007). La familia Curculionidae incluye 10 subfamilias: Baridinae, Brachycerinae, Cossoninae, Curculioninae, Cyclominae, Dryophthorinae, Entiminae, Molytinae, Platypodinae y Scolytinae (Morrone, 2014), algunas de las cuales están constituidas por especies, que por los daños que causan, son consideradas como plagas de importancia en sistemas de producción agrícola. En la subfamilia Baridinae se agrupa al picudo de las anonáceas, *Optatus palmaris*, un insecto que es considerado como una de las principales plagas de la guanábana en México (Hernández-Fuentes *et al.*, 2013; Maldonado-Jiménez *et al.*, 2014; Cham *et al.*, 2019).

Subfamilia Baridinae

De acuerdo con Oberprieler *et al.* (2007), los miembros de la subfamilia Baridinae se caracterizan por presentar una carina transversal en el margen posterior del pronoto, un pliegue submarginal fuertemente curvado en la superficie interior de los élitros, una fusión total de metepisternon y metepimeron, una carina mediana fuerte en el interior del metatórax (una característica aparentemente única en Curculionoidea) y un número de arreglos en la venación del ala. Esta relación y los caracteres que la apoyan no se han probado ni confirmado, y si bien hay al menos algunas especies en esta agrupación que tienen un metepisternon y un metepimeron separados, los taxones en este grupo también comparten algunas otras características notables

como el gran mesepimera ascendente y un pigidio similar. Sin embargo, se necesita una evaluación más detallada de esta relación indicada. En este concepto, Baridinae comprende alrededor de 8,000 especies, más de la mitad de ellas en Baridini, que son especialmente diversas en los trópicos americanos. Sus larvas se desarrollan principalmente en frutos, pero también en tallos de diversas angiospermas, no obstante, las de Conoderini son frecuentemente barrenadoras de madera. También se producen asociaciones con monocotiledóneas y gimnospermas (incluyendo Gnetales). Los Ceutorhynchini están predominantemente asociados con Brassicaceae y Polygonaceae e incluyen agentes importantes de control biológico de malezas invasoras.

El picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*)

El picudo de las anonáceas se reportó por primera vez en el año 2006, atacando frutos de guanábana en las Varas, Nayarit (Hernández-Fuentes *et al.*, 2013). Castañeda-Vildózola (2009) lo describe como un insecto de hábitos diurnos, con actividad de las 10 a las 18 h del día, sin embargo, Corrales (1995) y Maldonado-Jiménez *et al.* (2014) reportan que el adulto presenta actividad de las 8 h del día hasta alrededor de las 23 h. Este insecto presenta metamorfosis completa (holometábola), es decir que presenta estadios de huevo, larva, pupa y adulto, los cuales se describen a continuación.

Huevo

Con base en lo reportado por Maldonado-Jiménez *et al.* (2013, 2014), el huevo (Figura 1) es de forma cilíndrica, de 1.0 mm de largo, con los extremos redondeados y de color blanquecino. El tiempo de incubación es de 5.36 ± 0.69 días, con una variación de cuatro a ocho días en condición de laboratorio a una temperatura de $24.8 \pm 0.46^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $72.2 \pm 1.91\%$. En un estudio realizado para la misma especie se indica que tardó de seis a siete días, con temperatura de 26.5 a 29.5°C y humedad relativa de 40.9 a 63.7% (Castañeda, 2011).

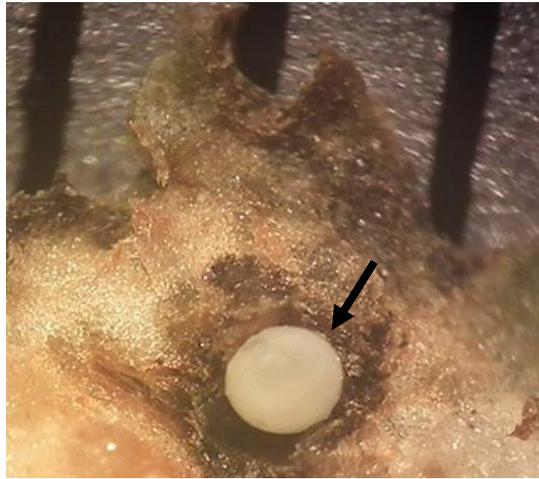


Figura 1. Huevo de *Optatus palmaris* (señalado con flecha). El espacio entre las líneas negras corresponde a 1 milímetro. Créditos: Hernández-Fuentes *et al.*, 2017.

Larva

Puede tener una longitud de 1.1 mm a 12 mm (recién emergida y completamente desarrollada, respectivamente). La larva (Figura 2) se desarrolló en 73.5 ± 2.9 días, con una variación de 54 a 93 días, teniendo una etapa de alimentación de 13 a 18 días y los días restante (36 a 80 días) los pasó en el suelo (Maldonado-Jiménez *et al.*, 2013).

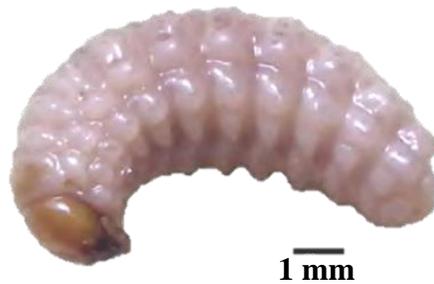


Figura 2. Larva de *Optatus palmaris*. Créditos: Hernández-Fuentes *et al.*, 2013.

Pupa

Es de tipo exarata, con longitud aproximada de 7 mm. De color blanco cremoso a amarillo claro, con los ojos ligeramente marrones, cuerpo de consistencia blanda. Su desarrollo fue de 25.1 ± 1.63 días con una variación de 17 a 41 días, a temperatura de $25.0 \pm 0.01^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $81.59 \pm 0.12\%$ (Maldonado-Jiménez *et al.*, 2013). En otro estudio se reporta que tarda de 17 a 29 días con temperaturas de 23.3 a 24.9°C y humedad relativa de 66.4 a 73.3% (Castañeda, 2011).

Adulto

Los adultos en vista dorsal tienen una forma romboidal o semejante a un balón de fútbol americano, su tamaño es de aproximadamente 7.2 mm de longitud por 4 mm de ancho. Su cuerpo es de color negro, cubierto por escamas blancas que le dan tonalidad ceniza; también presenta escamas de color naranja que se extienden en toda la parte ventral del abdomen, lateral del tórax y la cabeza (Figura 3) (Maldonado- Jiménez *et al.*, 2013). De acuerdo con Champion (1907), el adulto de *O. palmaris* es fácilmente reconocible por la franja submarginal de color rojo bermellón, oblicua, a cada lado del protórax, que se extiende hacia abajo en los flancos a la base y al ápice, y cada franja está bordeada por dentro y por fuera por dos grandes manchas negras glabras; las partes laterales mesosternales, el episterno metatorácico (excepto en el frente) y las partes laterales del abdomen también están cubiertas de escamas de color bermellón. Los primeros dos segmentos ventrales ampliamente excavados hacia abajo en la parte media del macho. El surco prosternal es bastante profundo y limitado en cada lado por una cresta afilada. Las escamas rojas son de un tinte más pálido en algunos especímenes.

Para completar el estado biológico de adulto, *O. palmaris* necesita 112 ± 23.5 días con una variación de 34 a 150 días a temperatura de $26.7 \pm 0.04^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $67.9 \pm 0.21\%$ (Maldonado- Jiménez *et al.*, 2013). Para esta misma especie se reportó que requiere de 83 a 115 días para completar el estado biológico de adulto, con temperaturas de 25 a 27.9°C y humedad relativa de 50.1 a 67.7% (Castañeda, 2011). El total de días que necesita el picudo de las anonáceas para completar su ciclo biológico fue de 216.0 ± 28.73 días, con un rango de 109 a 292 días (Maldonado-Jiménez *et al.*, 2013).

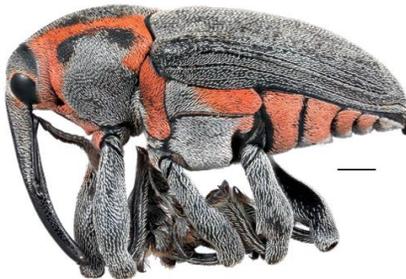


Figura 3. Adulto de *Optatus palmaris*. Créditos: Madrean Archipelago Biodiversity Assessment (MABA), s/f.

Daños ocasionados en anonáceas

Optatus palmaris causa daños en la chirimoya (Hernández-Fuentes *et al.*, 2013; Corrales, 1995); también se ha encontrado en guanábana e ilama. La larva se alimenta de la pulpa y semillas de la fruta; en la fase final sale del fruto y pupa en el suelo (Corrales, 1995). Con base en lo reportado por Hernández-Fuentes *et al.* (2017), los adultos hacen agujeros en los frutos de la guanábana y la chirimoya cuando se alimentan u ovipositan. Cuando no hay frutos desarrollados, se alimentan de los pétalos y el pedicelo de frutos pequeños, lo que provoca su caída. El daño de las especies del género *Optatus* en *A. cherimola* corresponde a un patrón de dibujos similar a las letras "C" u "O", que es un grupo de agujeros causados por los adultos cuando se alimentan. En los lugares donde las larvas se alimentan, se observa de manera inicial necrosis y ligera descarga acuosa (Figura 4); la alimentación hace que un pequeño agujero se profundice hasta la semilla; cuando la larva se mueve en el fruto, deja un orificio de 2 a 3 mm de diámetro (Corrales, 1995). En la guanábana, los adultos de *O. palmaris* pueden dañar el 38 % del área total de la fruta y es posible encontrar un promedio de seis larvas/fruta. Los frutos más afectados son los cercanos a la cosecha (Maldonado-Jiménez *et al.* 2014).

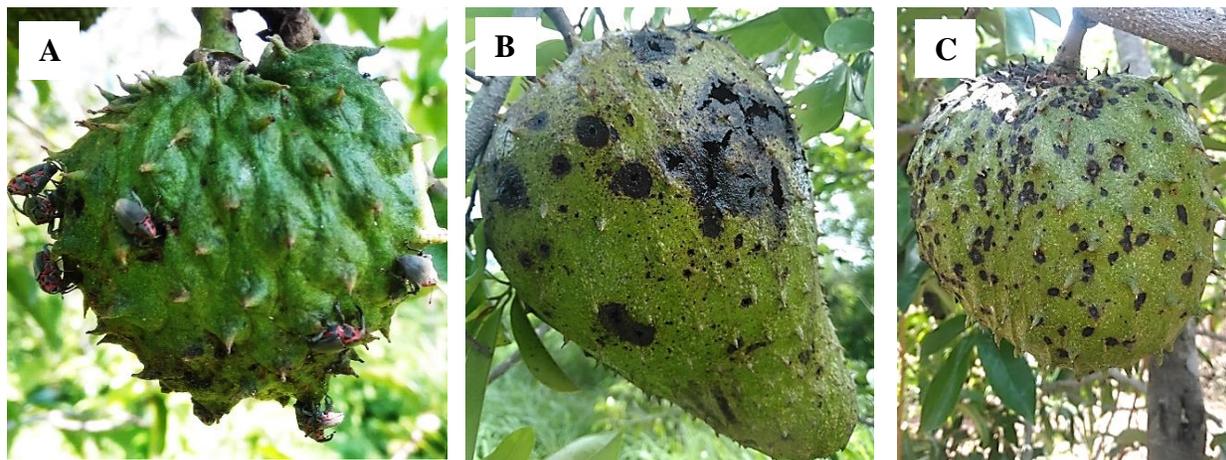


Figura 4. Daños ocasionados por *Optatus palmaris* en guanábana. **A)** Adultos machos y hembras alimentándose sobre fruto de guanábana. **B)** y **C)** Daños sobre superficie de fruto de guanábana; se observan perforaciones, necrosis y ligeras descargas acuosas.

Estrategias de manejo de *Optatus palmaris*

Se han realizado pocos estudios sobre estrategias de manejo de este insecto. Las hasta ahora reportadas mencionan prácticas como el uso de repelentes a base del aceite esencial de

pirul (*Schinus molle* L.), embolsado de frutos con diámetro menor a 8 cm de diámetro para evitar el ataque de los adultos, así como el uso de pulpa fresca de hospedantes en trampas, como un atrayente alimenticio para la plaga (Colunga *et al.*, 2006). Castañeda (2011) recomienda la recolección y eliminación de frutos dañados. Cerdas y colaboradores (2005) proponen como una estrategia de manejo embolsar los frutos con diámetro menor a 15 mm, así como recolectar frutos dañados y sumergirlos en agua con cal y tapar con un plástico. También se recomienda hacer un hoyo, colocar los frutos dañados por capas y espolvorearlos con malation (57%) y cal. En 2021, Hernández-Fuentes y colaboradores evaluaron la toxicidad de los insecticidas y repelentes: spinosad, spinoteram, azadiractina, lambda-cialotrina, clorpirifos, imidacloprid y etofenprox. Dicho estudio determinó al imidacloprid con una CL_{50} de 0.06 g i.a. L^{-1} y TL_{50} de 0.3 h como el insecticida de mayor toxicidad para la especie, seguido del spinoteram con una CL_{50} de 0.96 g i.a. L^{-1} y un TL_{50} de 0.36 h. Hernández-Fuentes *et al.* (2017) mencionan que el uso de compuestos volátiles (semioquímicos) pudieran ser una buena alternativa de manejo.

Semioquímicos

Los semioquímicos son sustancias químicas involucradas en las interacciones (químicas) entre organismos (Nordlund y Lewis, 1976). Éstos son específicos e inocuos para el medio ambiente, además tienen la ventaja de ser utilizados por los insectos para comunicar mensajes a distancias relativamente largas en comparación con otros medios de comunicación y son biológicamente activos a muy baja concentración en el medio ambiente. Estas ventajas sobre las estrategias convencionales para el control de insectos plaga hace que los semioquímicos sean una herramienta prometedora para el manejo de plagas agrícolas, principalmente en sistemas de cultivo orgánico (EI-Shafie y Romeno, 2017).

Clasificación de los semioquímicos

Se clasifican con base en su efecto o función, lo cual debe tenerse en consideración debido a que la misma molécula podría actuar como una feromona para una especie de insecto y como una kairomona o alomona para otra especie (EI-Shafie y Romeno, 2017). De manera general, los semioquímicos se dividen en dos grandes grupos:

Feromonas, que son sustancias que son secretadas al exterior por un organismo y causan una reacción específica en un organismo receptor de la misma especie (Karlson y Lüscher,

1959). Dicke y Sabelis (1988) definen feromona como un infoquímico que media una interacción entre organismos de la misma especie, en la que el beneficio es para el organismo relacionado con el origen, para el receptor o para ambos. Con base en el cambio que causan en el organismo que las recibe, Ali y Morgan (1990) describen como principales a las feromonas sexuales que generalmente son liberadas por la hembra para anunciar su presencia, es decir, para atraer al macho a fin de que tenga éxito en el apareamiento; feromonas de agregación, las cuales son liberadas principalmente por el macho. Conllevan a la congregación, es decir, a aumentar la densidad de miembros de la especie en la proximidad de la fuente emisora de la feromona. Un gran número de insectos convergen para diversos fines, como la alimentación, el apareamiento o la hibernación; feromonas de alarma, se definen como compuestos volátiles que producen reacciones estereotipadas entre insectos que aceleran el movimiento (o el vuelo rápido en insectos voladores) y el ataque; feromonas marcasenderos, la cual es una sustancia química o mezcla de sustancias aplicada a una superficie por un primer individuo y que es detectada y seguida por otros individuos de la especie. El comportamiento es mejor conocido en hormigas. Cuando un forrajero encuentra una fuente de alimento, regresa al nido, dejando rastros de olor para dirigir a los demás miembros hacia la fuente de alimento, y cuando regresan al nido, refuerzan el depósito químico. Cuando la fuente de alimento se agota, los forrajeros que regresan no refuerzan el rastro para que se evapore. Finalmente, las feromonas de dispersión que estimulan el comportamiento que conduce a un aumento del espacio entre individuos, con la consiguiente reducción de la competencia intraespecífica. Se puede considerar que los compuestos actúan como disuasivos o repelentes.

Por otro lado, se definen como aleloquímicos compuestos que median una interacción entre dos individuos que pertenecen a especies diferentes (Dicke y Sabelis, 1988). Los aleloquímicos están clasificados como alomonas, las cuales son propias de la biología de un organismo (organismo 1) y que cuando entra en contacto con un individuo de otra especie (organismo 2), evoca en el receptor un comportamiento y/o respuesta fisiológica que es adaptativamente favorable para el organismo 1, pero no para el organismo 2; kairomonas, las cuales son compuestos volátiles liberados por un organismo (organismo 1) y que cuando entra en contacto con un individuo de otra especie (organismo 2), evoca en el receptor un comportamiento y/o respuesta fisiológica que es adaptativamente favorable al organismo 2; sinomona, es un aleloquímico liberado por un organismo (organismo 1) y cuando entra en contacto con un

individuo de otra especie (organismo 2), presenta en el receptor una respuesta conductual y / o fisiológica que es activamente favorable para ambos.

Semioquímicos para monitoreo y control de plagas

El monitoreo espacial y temporal de plagas permite un uso informado de estrategias de control químico, lo cual disminuye significativamente las aplicaciones de insecticidas, respecto al uso preventivo de los mismos (González-Ritzel *et al.*, 2012). Las trampas de feromonas son lo suficientemente sensibles y específicas para detectar bajas densidades de una especie. Esto posibilita la detección de especies invasoras que puedan considerarse plagas cuarentenarias, el monitoreo de una especie ya establecida, así como el éxito en la introducción de una especie benéfica (Coss *et al.*, 2005) o un programa de erradicación (Kean y Suckling, 2005; El-Sayed *et al.*, 2006). Asimismo, la sensibilidad de las trampas de feromonas puede ser empleada para el monitoreo regional de especies en peligro de extinción, información que puede ser útil a la hora de establecer programas de conservación (Millar *et al.*, 2010).

Técnicas con potencial para el monitoreo y control de picudos

Técnica de atraer y matar

El método de “atraer y matar” es uno de los más utilizados en el manejo integrado de plagas (MIP). Los dos elementos clave de este sistema son: 1) un atrayente poderoso que actúe a larga distancia, y 2) un componente (insecticida, trampa) que mate a la plaga (Foster and y Harris, 1997). Esta estrategia de control también se le conoce con el nombre de atracticidas y puede ser confundida con el trampeo masivo cuando este incluye trampas con insecticidas (Downham *et al.*, 1995; Charmillot *et al.*, 2000). Sin embargo, la estrategia de atraer y matar puede diferenciarse del trampeo masivo debido a que en el primero los insectos entran en contacto con el insecticida, salen de la trampa y mueren lejos de ella (Epsky *et al.*, 2008). Además, el agente insecticida está directamente mezclado con el agente atrayente (Vanhove *et al.*, 2020).

Técnica de “empujar y jalar”

Utiliza atrayentes para dirigir insectos a la fuente de atracción la cual puede ser un cultivo trampa en combinación con repelentes, para evitar que los insectos dañen el cultivo principal

(Cook *et al.*, 2007). Estas dos estrategias se han convertido en pilares importantes para el MIP de algunas especies de picudos. Por ejemplo, el concepto de árbol-trampa es un método de “atraer y matar” el cual se ha aplicado exitosamente para el control directo del picudo de la ciruela, *Conotrachelus nenuphar*, en el noreste de los Estados Unidos de Norteamérica (Leskey *et al.*, 2008).

Técnica de trampeo masivo

Se pueden utilizar trampas cebadas con semioquímicos que son altamente atractivos para los insectos, por ejemplo, estrategias de trampeo masivo se han desarrollado para *Rhynchophorus palmarum* en Costa Rica (Alpizar *et al.*, 2002; Oehlschlager *et al.*, 2002) y México (Osorio *et al.*, 2003). En esta especie, dos elementos parecen esenciales para lograr una buena captura: la feromona sintética de agregación y una fuente de alimento. La presencia de la feromona permite la captura de seis a 30 veces más insectos en comparación con trampas que no lleven este atrayente (Oehlschlager *et al.*, 1993a, b, 1995).

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar e identificar los componentes de la feromona de agregación y kairomona del picudo de las anonáceas, *Optatus palmaris*, así como determinar la actividad biológica de éstas.

Objetivos específicos

- Caracterizar químicamente los componentes de la feromona de agregación de *Optatus palmaris*.
- Extraer, identificar y determinar compuestos kairomonales que guían a *O. palmaris* hacia su hospedante.
- Determinar mediante pruebas comportamentales la actividad y respuesta de *O. palmaris* a volátiles feromonales y kairomonales.

CAPÍTULO I. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA FEROMONA DE AGREGACIÓN DE *Optatus palmaris*

1.1 RESUMEN

El picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) causa pérdidas considerables a la producción de guanábana en México. El daño ocurre cuando las larvas y los adultos se alimentan de los frutos; sin embargo, existe investigación limitada sobre estrategias de control contra esta plaga, aunque, las feromonas proporcionan un esquema de manejo de alto potencial para este curculiónido. Así, esta investigación caracterizó el comportamiento y producción de volátiles de *O. palmaris* en respuesta a sus hábitos alimenticios. Los ensayos de olfatometría establecieron la preferencia de los picudos por los volátiles producidos por la alimentación de los machos y la guanábana. El comportamiento observado sugiere la presencia de una feromona de agregación y una kairomona. Posteriormente, los compuestos volátiles de insectos muestreados por microextracción en fase sólida y aireación dinámica detectaron un compuesto único en los machos, especialmente cuando se alimentaban. Los experimentos de alimentación-inanición mostraron un aumento promedio de quince veces en la concentración de un monoterpenoide en los machos que se alimentan de guanábana, y una disminución de la liberación de este compuesto cuando los machos dejan de alimentarse. El análisis por CG-EM de compuestos volátiles identificó este analito como α -terpineol. Otros ensayos de olfatometría con α -terpineol y guanábana demostraron que esta combinación es doblemente atractiva para los picudos de las anonáceas que sólo los volátiles de la guanábana. Los resultados mostraron un efecto de potencialización entre el α -terpineol y los volátiles de guanábana. Por lo tanto, el α -terpineol es la feromona de agregación de *O. palmaris*, y su efecto de atracción se ve reforzado por los compuestos volátiles de la planta hospedante.

Palabras clave: terpenoide, señalización, señal química, kairomona, potenciación.

1.2 ABSTRACT

The Annonaceae fruits weevil (*Optatus palmaris*) causes high losses to the soursop production in Mexico. Damage occurs when larvae and adults feed on the fruits; however, there is limited research about control strategies against this pest. However, pheromones provide a high potential management scheme for this curculio. Thus, this research characterized the behavior and volatile production of *O. palmaris* in response to their feeding habits. Olfactometry assays established preference by weevils to volatiles produced by feeding males and soursop. The behavior observed suggests the presence of an aggregation pheromone and a kairomone. Subsequently, insect volatile compounds sampled by solid-phase microextraction and dynamic headspace detected a unique compound on feeding males increased especially when feeding. Feeding-starvation experiments showed an averaged fifteen-fold increase in the concentration of a monoterpene on males feeding on soursop, and a decrease of the release of this compound males stop feeding. GC-MS analysis of volatile compounds identified this analyte as α -terpineol. Further olfactometry assays using α -terpineol and soursop, demonstrated that this combination is double attractive to Annonaceae weevils than only soursop volatiles. The results showed a complementation effect between α -terpineol and soursop volatiles. Thus, α -terpineol is the aggregation pheromone of *O. palmaris*, and its concentration is enhanced by host-plant volatile compounds.

Keywords: terpenoid, signaling, chemical cue, kairomone, potentiation.

1.3 INTRODUCCIÓN

La mayoría de los miembros de la familia Curculionidae, excepto Platypodinae y Scolytinae, se llaman picudos. Este término proviene de su rostrum característicamente largo y antenas capitadas con pequeños mazos (Morrone, 2014). Cuando no están en uso, las antenas se almacenan en cavidades ranuradas a lo largo del rostrum. Como se mencionó, estos insectos poseen un rostrum largo (pico) con piezas bucales al final (Morrone, 2014; Hespeneide, 2001). Su rostrum distintivo permite alimentarse de varios órganos vegetales como raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Morrone, 2014). Debido al daño causado a diversas especies de plantas, varios picudos se consideran plagas agronómicas de importancia económica (Morrone, 2014; Ocan *et al.*, 2008; Servin *et al.*, 2008; Oehlschlager *et al.*, 2002). Además del daño causado por su comportamiento de alimentación, las hembras de los picudos pueden ovipositar en los agujeros que quedan después de alimentarse con los frutos; así, la descendencia se alimentará del mesocarpio del fruto y de las semillas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2017).

En México, varios curculios como *Scyphophorus acupunctatus*, *Rhynchophorus palmarum*, *Anthonomus eugenii* y *Anthonomus grandis* se consideran como unas de las principales plagas de los cultivos, y han sido ampliamente estudiados; estos insectos atacan las plantas de agave, cocotero, chile y algodón, respectivamente (Bautista-Hernández *et al.*, 2020; Azuara-Domínguez *et al.*, 2014; Esparza *et al.*, 2013; Showler, 2006). Los picudos plaga también atacan a la guanábana (*Annona muricata* L.), otro importante producto agronómico mexicano. México es el mayor productor de guanábana del mundo (Jiménez-Zurita *et al.*, 2016; Coelho y Alves, 2011); sin embargo, el picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* (Pascoe)) provoca importantes pérdidas en este cultivo. Este picudo se alimenta de las yemas de las hojas jóvenes y de las flores, provocando su desprendimiento del árbol (Hernández-Fuentes *et al.*, 2017). Este insecto también se alimenta de frutas, prefiriendo las maduras si están disponibles, causando daños externos hasta aprox. 40% de la superficie del fruto. Además, diferentes instares larvales se alimentan desde el interior de la fruta, destruyendo el mesocarpio y las semillas de la guanábana (Hernández-Fuentes *et al.*, 2017). El ataque del picudo también puede provocar el desprendimiento de pequeños frutos del árbol (Hernández-Fuentes *et al.*, 2017; Hernández-Fuentes *et al.*, 2013; Corrales, 1995).

El ciclo de vida del picudo de las anonáceas dura alrededor de 215 días; cinco días como huevo, 73 días como larva, 25 días como pupa y 112 días como adulto. En México, se reporta que el período de actividad de adultos en campo es entre las 8 y 23 h (Maldonado-Jiménez *et al.*, 2014). Sin embargo, otro informe mencionó que el período de actividad de este picudo está restringido entre las 10 y 18 h (Castañeda-Vildózola *et al.*, 2009). La presencia de adultos en el campo comienza con el inicio de la temporada de lluvias. Una vez en el campo, los adultos se alimentan y copulan en frutos de guanábana en maduración, especialmente cerca de su punto de cosecha. Es común encontrar hasta 30 adultos por fruto o incluso más dependiendo del tamaño del fruto. Por otro lado, cuando están presentes en las yemas de las hojas y las flores, generalmente solo se encuentra un espécimen en esos órganos. Cuando no copulan, las hembras se dedican principalmente a alimentarse y ovipositar. Por el contrario, los machos van a la copa del árbol para descansar y alimentarse de brotes de hojas jóvenes y flores antes de copular y alimentarse nuevamente de frutos de guanábana (Maldonado-Jiménez *et al.*, 2014). Otras plantas hospedantes alternas de *O. palmaris* son la chirimoya (*Annona cherimola* Mill), ilama (*Annona macrophyllata* Donn. Sm.) y anona (*Annona reticulata* L.) (Castañeda-Vildózola *et al.*, 2020).

Debido a su reciente detección y rápida propagación, la investigación sobre el control del picudo de las anonáceas se limita a la rotación de algunos insecticidas (Hernández-Fuentes, 2021). Sin embargo, esta estrategia no es suficiente para controlar completamente el nivel de población de picudos y, por ende, los daños que causan. Por lo general, el monitoreo efectivo y el control de los picudos incluyen el uso de trampas para insectos cebadas con sus feromonas de agregación (Tewari *et al.*, 2014). El uso de semioquímicos podría potencialmente manejar o incluso controlar completamente las infestaciones del picudo de las anonáceas. Sin embargo, no existe investigación sobre feromonas o kairomonas para esta especie de insecto.

Por lo anterior, el objetivo de la investigación fue la caracterización del comportamiento alimenticio de machos y hembras del picudo de las anonáceas. La caracterización consistió en ensayos de comportamiento realizados por olfatometría. Posteriormente, se llevaron a cabo análisis químicos para identificar volátiles candidatos que funcionan como señales químicas. Se espera que los resultados proporcionen información sobre la mediación de compuestos volátiles en el comportamiento de alimentación de los adultos del picudo de las anonáceas. Además, los

datos obtenidos pueden servir como base para establecer un manejo basado en volátiles de esta plaga.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Recolección de insectos y corroboración de la especie

Los insectos fueron recolectados en el municipio de Compostela, Nayarit, México (21°6' 17.337", -105°9' 49.917"; 21°6' 2.808", -105°10' 40.872"; 21°6' 3.8874", -105°9' 48.492"; 21°6' 13.572", -105°9' 52.2"). Machos y hembras de *Optatus palmaris* fueron recolectados manualmente durante agosto de 2019 y septiembre de 2020. Los insectos se transportaron en botes de plástico herméticos (1 L). Éstos se perforaron para permitir el intercambio de gases para la oxigenación de los insectos. Posteriormente, los ejemplares fueron sexados según sus características morfológicas (Champion, 1907). Los picudos se separaron por sexos y se mantuvieron separados en jaulas entomológicas. Fueron alimentados con trozos de guanábana y sus condiciones de cría se establecieron en 25 ± 2 °C, humedad relativa entre 60 y 70%, y fotoperiodo de 12:12 (L:O). La corroboración de la especie se realizó utilizando caracteres morfológicos previamente reportados (Champion, 1907). Los ejemplares identificados fueron depositados en la Colección de Insectos del Colegio de Postgraduados (CEAM).

1.4.2 Captura de volátiles

Los compuestos volátiles fueron retenidos por microextracción en fase sólida (MEFS) y aireación dinámica (AD). En ambas técnicas se emplearon matraces de borosilicato. La limpieza del material se realizó mediante lavados consecutivos con Extran® al 2%, agua destilada, acetona y se dejaron secar en campana de extracción. Posteriormente, el material se dejó en el horno a 300 °C durante 3 h.

1.4.2.1 Microextracción en fase sólida (MEFS)

Se colocaron grupos de 40 insectos, sólo machos o sólo hembras, en matraces de MEFS de 250 mL. Se utilizaron fibras de polidimetilsiloxano (PDMS/100µm), divinilbenceno/carboxeno/PDMS (50/30 µm) para retener compuestos volátiles de 1 cm de largo. Antes de la recolección de volátiles, las fibras de MEFS se limpiaron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (CG) (HP-6890, Midland, ON, Canadá) a 250 °C hasta quedar

libres de contaminantes. Posteriormente, se introdujo la fibra de MEFS a través de los septos del matraz, que contenían una envoltura de malla metálica para evitar el contacto entre los insectos y la fibra. La distancia entre la fibra de MEFS y los insectos fue de 2 cm. El tiempo de absorción de volátiles fue de 1 h. Posteriormente, la fibra se retiró y se desorbió en el puerto de inyección del CG a 250 °C durante 2 min para análisis cromatográfico. Las muestras volátiles se tomaron de grupos de sólo machos, sólo hembras, machos que se alimentan de 3 g de guanábana, hembras que se alimentan de 3 g de guanábana y sólo guanábana. Los blancos contenían compuestos volátiles atrapados en matraces de MEFS vacíos. Se realizaron diez réplicas para cada grupo.

1.4.2.2 Aireación dinámica (AD)

Grupos de 40 insectos, sólo machos, sólo hembras, machos alimentándose de 8 g de guanábana, hembras alimentándose de 8 g de guanábana y sólo guanábana se colocaron en botellas de lavado de gases Drechsel de 650 mL (PIREX®, glendla, AZ, EE. UU.). El flujo de aire fue proporcionado por una bomba de aire (ELITE 802®, Colchester, VT, EE. UU.) conectada a una manguera de PVC libre de volátiles (Nalgene®, Rochester, NY, EE. UU., PVC 180, DI de 3/16”). La corriente de aire se filtró con un cartucho con 50 mg de Tenax® (60/80) Baltimore, MD, EE. UU. La corriente de aire se humedeció con un suave burbujeo de agua destilada. El flujo de aire que ingresó al sistema fue de 0.330 L min⁻¹ controlado con un flujómetro (GILMONT®, Londres, Reino Unido) y calibrado con un flujómetro manual de vidrio (Hewlett-Packard). Los compuestos volátiles arrastrados por la corriente de aire fueron capturados en un cartucho que contenía 50 mg de Tenax® (60/80) como adsorbente y 20 mg de fibra de vidrio en cada extremo del cartucho. Todos los cartuchos se lavaron previamente con 5 mL de hexano y se dejaron secar en la campana de extracción, para posteriormente mantenerlos a 300 °C durante 3 h en el horno. Las recolecciones de volátiles se realizaron durante 48 h a las mismas condiciones de temperatura, humedad y luz que las establecidas en el pie de cría. Una vez que se alcanzó el tiempo de recolección de compuestos volátiles, los cartuchos se eluyeron con 350 µL de hexano grado HPLC y se adicionaron 50 µL de hexano. Los blancos consistieron en la elución de cartuchos conectados a botellas vacías. Se realizaron diez réplicas para cada grupo.

1.4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los extractos volátiles se analizaron con un cromatógrafo de gases HP-6890 acoplado a un espectrómetro de masas (EM) de cuadrupolo simple HP-5973. El sistema CG-EM estaba equipado con una columna HP-5MS (30 m× 0.250 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria, J&W Science, Folsom, CA, EE. UU.) para la separación de los compuestos. Se utilizó helio (99,999% de pureza) como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹. El horno se programó para comenzar a los 60 °C durante 1 min, luego aumentó a 8 °C/min hasta 90 °C por 1 minuto. Posteriormente, la temperatura volvió a incrementar a 5 °C/min hasta 190 °C y se mantuvo durante 1 min. Finalmente, la temperatura aumentó 10 °C/min hasta 250 °C. El puerto de inyección se estableció en 250 °C. El volumen de inyección fue de 1 µL en modo *splitless* (sin división de muestra). Para la inyección del extracto y de la fibra de MEFS, se utilizaron “liners” de 2 y 0.75 mm de DI, respectivamente. La fuente de iones y la temperatura del cuadrupolo del detector de masas eran 230 °C y 150 °C, respectivamente. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C. La energía de ionización en modo IE fue de 70 eV y los datos de masa se adquirieron en el modo SCAN (50 -550 *m/z*). La identificación cromatográfica de picos fue realizada comparando sus espectros de iones con la biblioteca NIST (versión 2014) y comparando el tiempo de retención y el espectro de masas con el del estándar.

A partir un estándar analítico comercial de α -terpineol (Thermo Fisher Scientifics, 97%) se construyó una curva de calibración para cuantificar el contenido del compuesto en las muestras. Las concentraciones variaron de 2.6 a 1984 ng µg⁻¹. Se hicieron tres réplicas para cada punto de la curva de calibración, y el valor promedio de cada una se usó para construir una curva de calibración final para la cuantificación de la muestra. Se calculó la regresión lineal a partir de las áreas de las soluciones de compuesto estándar inyectadas; se obtuvo la ecuación de la pendiente y se utilizó el área de las muestras para determinar su concentración. Ésta se expresó en ng de α -terpineol por macho equivalente por segundo.

1.4.4 Efectos de recuperación de matriz

Para evaluar los efectos de matriz, se establecieron experimentos de aireación dinámica. Primero, se cargaron discos de papel filtro (4 cm de diámetro) con 18 µg de α -terpineol. Posteriormente, éstos se colocaron en botellas de lavado de gases Drechsel de 650 mL (PIREX®,

EE. UU). El α -terpineol de los discos de papel se capturó de la misma manera que las muestras biológicas descritas anteriormente ($n = 4$). Se llevó a cabo un segundo experimento cargando 18 μg de α -terpineol contenido en 50 μL de hexano en un cartucho con 50 mg de Tenax® (60/80) como adsorbente y 20 mg de fibra de vidrio en cada extremo. El disolvente se dejó secar durante 3 min y el compuesto se eluyó como se describió anteriormente para las muestras biológicas ($n = 4$). Los extractos de ambos experimentos se cuantificaron y compararon entre sí para comprobar si todo el α -terpineol se desplazó del espacio de cabeza al cartucho con Tenax®. Es decir, se consideró que todo el α -terpineol se movilizaba del espacio de cabeza al cartucho si no se determinaban diferencias de concentración significativas entre ambos extractos. Para comprobar los efectos de matriz del cartucho de Tenax®, la cantidad total de α -terpineol en todo el extracto eluido se comparó con la cantidad inicial cargada en el disco de papel de este metabolito ($n = 4$). El análisis mostró que un promedio del 71% ($n = 4$) de la cantidad total de α -terpineol se retuvo en el cartucho en las condiciones de elución utilizadas en los experimentos. Este efecto de matriz se corrigió durante el cálculo del contenido de α -terpineol al aumentar este porcentaje (71%) a la concentración resultante de las muestras.

1.4.5 Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

En el Anexo 1 se describe en detalle el cálculo del límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) para el α -terpineol. Se preparó una curva de calibración de 15 puntos de 0.04 a 627.52 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Sin embargo, sólo los primeros 12 puntos mostraron linealidad (0.04-79,04 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). El coeficiente R^2 de esta regresión lineal fue 0.9994 y la ecuación de la pendiente fue $y = 72391x + 1077.9$. Los valores error típico estándar xy (Sty) y pendiente (m) se calcularon para el conjunto de datos resultantes con las funciones "SLOPE" y "STEYX" en Microsoft Excel® 2016. Los valores se utilizaron en las siguientes fórmulas: $\text{LOD} = 3.3 (\text{Sty}/m)$ y $\text{LOQ} = 10 (\text{Sty}/m)$. Para este estudio, el valor LOD fue igual a 2.10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ y el valor de LOQ fue igual a 6.36 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

1.4.6 Bioensayos

1.4.6.1 Experimentos de alimentación inversa

Se diseñó un experimento de alimentación inversa para correlacionar la liberación de α -terpineol con el comportamiento de los machos alimentándose. Para la alimentación de los

insectos se adquirieron guanábanas comerciales en mercados locales. Se prepararon dos grupos de 40 picudos machos: machos alimentándose de trozos de guanábana (8 g, machos con alimentación inicial) y machos sin alimentación. Cada grupo representó una réplica. Se realizaron quince repeticiones para insectos con alimentación inicial y para los machos sin alimentación. Las recolecciones de volátiles se llevaron a cabo como se describió anteriormente para aireación dinámica en el punto 1.4.2.2.

Una vez que se alcanzó el tiempo de recolección de volátiles, los insectos fueron retirados del matraz y se transfirieron a otros matraces limpios. Subsecuentemente, no se proporcionó alimento a los machos que se alimentaron inicialmente. De forma inversa, se proporcionaron 8 g de guanábana a los machos que inicialmente no se alimentaron. Las capturas de volátiles se reanudaron en las mismas condiciones. Posteriormente, las muestras se analizaron, cuantificaron mediante CG-EM y se compararon entre sí.

1.4.6.2 Respuesta conductual de picudos machos y hembras a compuestos volátiles

Se evaluó el comportamiento de machos y hembras del picudo de las anonáceas a través de su respuesta a diferentes estímulos volátiles en bioensayos de olfatometría de doble elección. Las combinaciones de opciones se presentan en el Cuadro 1. El olfatómetro era un modelo en forma de “Y”: su brazo principal tenía 12 cm de largo con 2.5 cm de diámetro interno (DI); los dos brazos de elección tenían 10 cm de largo y 2.5 cm de DI separados a ángulo de 45°. El cuarto de bioensayos se cubrió con papel negro mate para evitar reflejos de luz en las paredes. Debido al comportamiento biológico de los picudos de las anonáceas, el olfatómetro se elevó a 6 cm de la mesa utilizando una barra de poliestireno blanco, justo debajo del extremo de los brazos de elección. Esta elevación también generó una elevación de 4.5 cm entre la mesa de trabajo y el punto de unión de los brazos del olfatómetro. Las fuentes de olor se colocaron en botellas de lavado de gas Drechsel de 650 mL. El flujo de la corriente de aire utilizado para transportar los volátiles de la fuente de olor desde el punto de liberación al brazo de elección correspondiente se estableció igual que para las aireaciones dinámicas. Cuando se utilizaron picudos machos o hembras como fuente de olor o parte de la fuente de olor, se agregaron grupos de 20 insectos. Cuando se probó el α -terpineol solo o combinado con guanábana, éste fue liberado de un papel filtro de 4 cm de diámetro (Whatman N° 2), para lo cual se adicionaron 100 μ L a 4 ng μ L⁻¹ de solución de α -terpineol en hexano. El hexano se dejó evaporar durante 30 s. El papel con α -

terpineol se cambió cada 3 picudos evaluados. En todos los casos, se utilizaron 2 g de guanábana en estos experimentos. Los frascos que contenían las fuentes de olor también se cubrieron con papel negro mate para evitar interferencias visuales y de luz en los bioensayos. La luz se proporcionó con una barra de luz blanca colocada en el centro del techo del cuarto de olfatometría. El sistema de olfatometría se colocó justo debajo de la fuente de luz. Para evitar reflejos de luz en el vidrio del olfatómetro, se colocó una placa de espuma de poliestireno blanca de 1 cm de espesor a 10 cm por encima del olfatómetro. Es decir, la placa de poliestireno se ubicó entre la fuente de luz y el olfatómetro, obteniendo así iluminación indirecta.

Se probaron grupos de 15 insectos para registrar la preferencia de olor del picudo de las anonáceas. Cada grupo de machos o hembras se consideró una réplica. Se probaron cuatro réplicas para machos y hembras frente a diferentes elecciones de olores ($15 \times 4 \times 2 = 120$ insectos probados por tratamiento) (Cuadro 1). Se liberó un solo insecto a la vez 2 cm dentro del brazo principal del olfatómetro en forma de “Y”. Posteriormente, se observó el comportamiento y elección del insecto por no más de 10 min. Se puntuó una elección de fuente de olor cuando el insecto caminó más de la mitad de uno de los brazos seleccionados y permaneció allí más de 1 minuto. Los datos se reportaron como el porcentaje de picudos que seleccionaron una fuente de olor específica. Los datos representaron el promedio de elección de cuatro réplicas \pm Error estándar.

Todos los insectos analizados se sometieron a un período de ayuno de 24 h antes de ser utilizados en el experimento. Los brazos del olfatómetro se rotaron cada cinco insectos para evitar efectos de posición en la selección del brazo. Además, el olfatómetro se reemplazó cada dos repeticiones para evitar la interferencia de olor residual. Antes de comenzar las pruebas de olor, se usó el aire en ambos brazos para verificar que no hubiera una selección específica causada por reflejos de luz o volátiles remanentes en el sistema. Se seleccionaron y prepararon cuatro grupos de 20 insectos (machos o hembras) para probar un tratamiento completo o una comparación. Los insectos ya utilizados se alimentaron y se dejaron recuperar durante 48 h. Los insectos recuperados se mezclaron con otros insectos no utilizados y se seleccionaron nuevamente al azar para formar 4 nuevos grupos de prueba. Los valores porcentuales de selección se calcularon sólo a partir de los insectos que respondieron (15 insectos). No obstante, también se registró e informó el porcentaje de insectos que no respondieron. Para probar el

efecto del hexano remanente en el papel de filtro, discos limpios de papel filtro (Whatman N° 2) se humedecieron con 100 μL de hexano puro. El disolvente se dejó secar durante 30 s y se evaluó la selección entre aire o papel de filtro seco. Además, los papeles de filtro secos se colocaron en ambos brazos para determinar la presencia de patrones de selección por picudos machos y hembras.

Cuadro 1. Combinaciones de fuentes de olor utilizadas en ensayos de olfatometría. Para todos los bioensayos, cuando la fuente de olor lo requirió, se utilizaron 2 g de guanábana. Todos los grupos de machos y hembras contenían 20 especímenes. Para combinaciones que incluyen α -terpineol, 100 μL de una solución a 4 ng μL^{-1} se adicionaron.

Ensayos con una fuente de olor	
Aire	Guanábana
Aire	Machos
Aire	Hembras
Aire	α -terpineol
Aire	Guanábana + α -terpineol
Aire	Guanábana + machos
Aire	Guanábana + hembras
Ensayos con dos fuentes de olor	
Guanábana	Guanábana + machos
Guanábana	Guanábana + hembras
Guanábana	Guanábana + α -terpineol
Guanábana + hembras	Guanábana + machos
Hembras	Machos

1.4.7 Análisis estadístico

Todos los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Para los ensayos de olfatometría, de una fuente de olor vs. aire, se utilizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Una prueba de G analizó los ensayos de olfatometría que desafían dos fuentes de olor a la vez. Los datos del experimento de alimentación inversa

(mediciones sobre los mismos especímenes) se trataron como muestras por pares analizadas mediante una prueba U. Para los efectos de recuperación de matriz, los efectos de concentración de los extractos se probaron mediante una prueba de t de dos colas ($t < 0.05$). Por otro lado, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para datos sin distribución normal o varianza homogénea. El análisis *post hoc* se realizó con corrección de Bonferroni (datos de olfatometría sin respuesta). Las diferencias estadísticas entre los picudos que no respondieron se determinaron con una prueba ANOVA. Todos los análisis se realizaron en el software R (R Core Team, 2020).

1.5. RESULTADOS

El picudo de las anonáceas tiene un ciclo de vida prolongado y falta una dieta artificial para su cría. Por lo tanto, esta investigación utilizó insectos silvestres. En la primera etapa experimental, se llevaron a cabo experimentos de olfatometría de doble elección en machos y hembras. Antes de comenzar cualquier prueba de olor, se usó el aire en ambos brazos del olfatómetro para verificar que no existía una selección específica de picudos machos o hembras. En general, sólo el 6-13% (1 a 2 picudos de cada 15) eligió un brazo del olfatómetro; el resto no mostró respuesta al aire como estímulo. Se observaron resultados similares para las pruebas de evaporación del disolvente (hexano). Estos ensayos de selección no indicaron efectos de posición, luz, remanentes volátiles o solventes sobre el comportamiento de los picudos evaluados. Después de la prueba en blanco, diferentes fuentes de olor vs. aire, por separado, se utilizaron como pruebas de preferencia por picudos machos y hembras. Los tratamientos incluyeron secciones de guanábana, sólo machos sin alimentarse, sólo hembras sin alimentarse, machos alimentándose de guanábana y hembras alimentándose de guanábana. Los resultados mostraron que machos alimentándose de guanábana produjo el aroma más atractivo para los picudos machos con una selección del 94.99% ($F_{4,15} = 11.77, p < 0.001$). Por otro lado, la preferencia de los machos por la guanábana y hembras alimentándose mostró diferencias estadísticas no significativas ($F_{4,15} = 11.77, p < 0.001$) entre tratamientos (Figura 1). Por el contrario, la preferencia de las hembras hacia volátiles de machos alimentándose, la guanábana y hembras alimentándose mostraron diferencias estadísticas no significativas entre ellos. Es decir, los picudos hembras no mostraron un comportamiento específico para cada fuente volátil probada. Finalmente, tanto machos como hembras mostraron menor preferencia por los volátiles

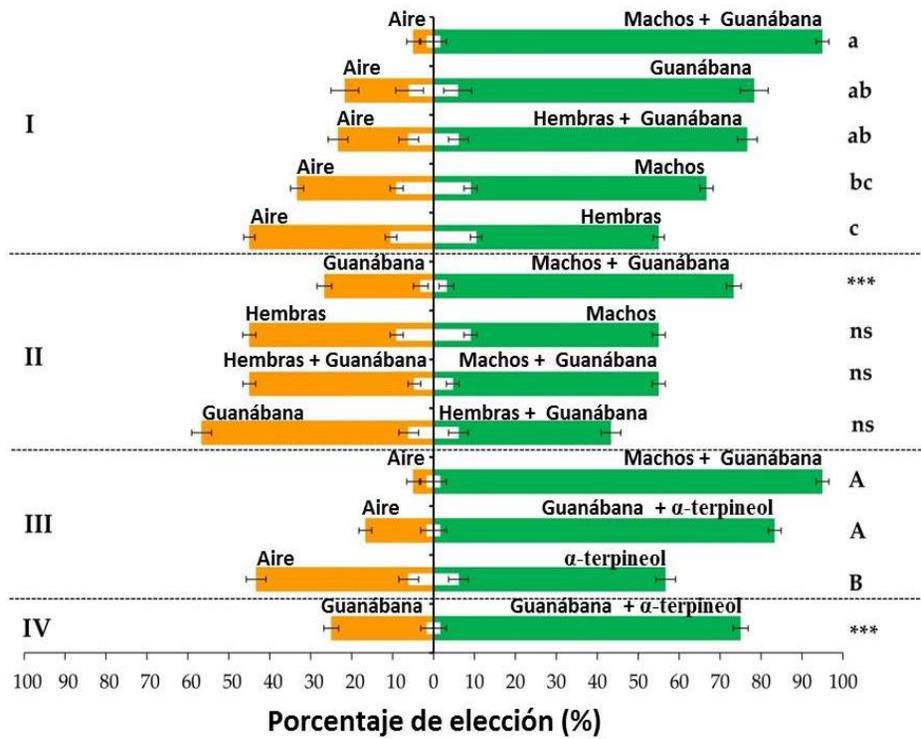
emitidos por hembras sin alimentarse ($F_{4,15} = 11.77$, $p < 0.001$; $F_{4,15} = 26.44$, $p < 0.0001$, respectivamente).

Con base en esta información, en una segunda etapa experimental, la preferencia de los machos y las hembras por los volátiles de guanábana se desafió contra los volátiles de los machos y las hembras alimentándose. Además, se probó la preferencia de ambos sexos por los volátiles emitidos simultáneamente por machos alimentándose y hembras alimentándose en dos brazos de emisión diferentes. Finalmente, también se evaluó la preferencia por los machos sin alimentarse y hembras sin alimentarse. La preferencia por el aroma de machos alimentándose fue altamente significativa para ambos sexos ($G = 22.64$, $p < 0.0001$ para machos y $G = 48.50$, $p < 0.0001$ para hembras) (Figura 1). Las hembras mostraron una marcada preferencia por los tratamientos que contienen volátiles de machos, especialmente a los de los machos alimentándose. Aun así, los machos no mostraron una preferencia significativamente diferenciada cuando se prueban simultáneamente las hembras alimentándose vs. machos alimentándose ($G = 0.99$, $p = 0.31$) (Figura 1). Por lo tanto, la mayor preferencia por machos alimentándose y los aromas de guanábana observada en el primer y segundo ensayo de olfatometría demostró la presencia de una feromona de agregación y una kairomona que podrían mediar paralelamente el comportamiento de alimentación del picudo de las anonáceas. Todos los valores de insectos que no respondieron en cada conjunto experimental no mostraron diferencias significativas cuando se analizaron mediante una prueba ANOVA. Esto podría significar que el comportamiento de no respuesta de algunos picudos está relacionado con algunos factores biológicos intrínsecos de cada insecto más que con la fuerza de la respuesta evocada por cada fuente de olor (Figura 1).

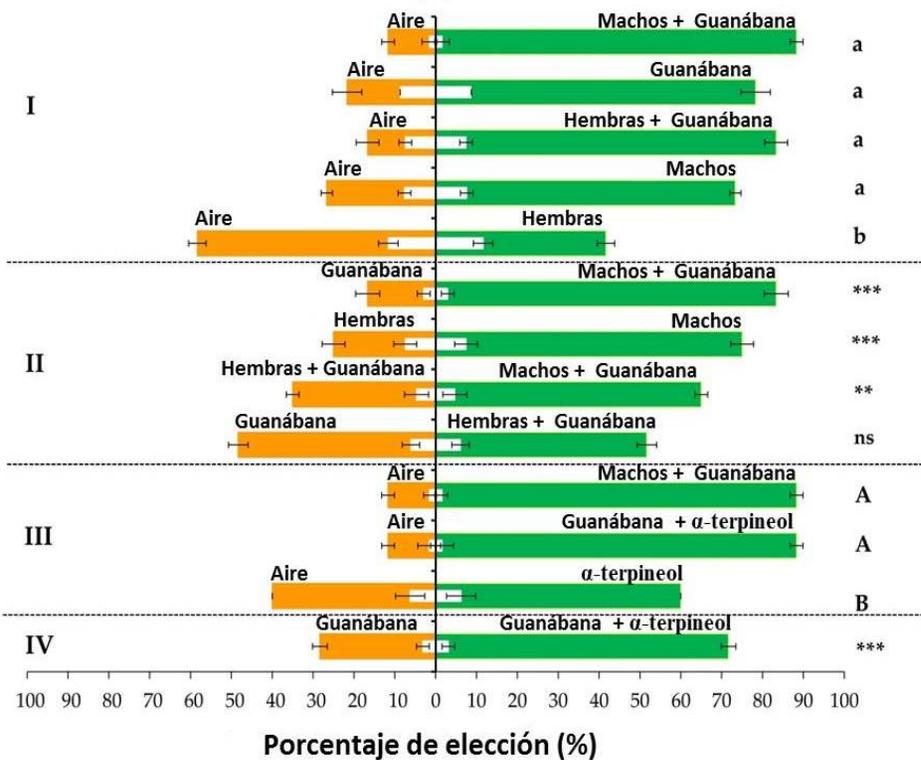
Con base en estos resultados, los compuestos volátiles emitidos por la guanábana, machos sin alimentarse, hembras sin alimentarse y las hembras alimentándose se utilizaron como cromatogramas de referencia para escudriñar los volátiles producidos específicamente cuando los machos se alimentan de guanábana, que potencialmente podrían funcionar como feromona de agregación. Las fracciones volátiles fueron retenidas por microextracción en fase sólida (MEFS) y aireación dinámica (AD). La comparación de los perfiles de CG-EM de todas las muestras mostró la presencia de un pico cromatográfico encontrado exclusivamente en machos a los 10.34 min (Figura 2).

Sorprendentemente, el área de este pico aumentó de cinco a 50 veces en algunos casos y resultó en un incremento promedio de 15 veces del contenido de este compuesto cuando los machos se alimentaron de guanábana (Figura 2). El pico cromatográfico se identificó como α -terpineol [2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl) propan-2-ol] por coincidencia de su espectro (95%) con el de la biblioteca NIST.

La identificación del compuesto también fue apoyada por la interpretación de las pérdidas de masa cuando se observa el espectro de masas de dicho metabolito. Los principales valores m/z fueron 139, 136, 121, 93, 81, 67 y 59. Con base en estos valores, se determinó una pérdida total de los iones parentales y moleculares. Además, el m/z 139 correspondió a M-15, lo que se explica por la pérdida de un grupo metilo de la molécula. El m/z 136 correspondió a M-18 explicado por una pérdida de una molécula de agua típica en alcoholes, en este caso, α -terpineol. Este hecho también fue apoyado por m/z 121 (M-33), que indicó la pérdida de un grupo metilo y una molécula de agua típica en alcoholes con un grupo metilo en su lado alifático de cadena. El m/z 93 indicó la formación de un ion $C_7H_9^+$ que es una masa típica de terpenoides (Nicolescu, 2017; Mormann *et al.*, 2006). La m/z 81 se explica por la pérdida de $C_4OH_{10}^+$, potencialmente seguido por un reordenamiento McLafferty. El valor m/z 69 también se explica por la pérdida de todos los radicales unidos al anillo ciclohexeno del α -terpineol, seguida de su ruptura a través de una reacción retro-Diels-Alder. El pico base corresponde a m/z 59, que representa un fragmento de $C_3H_7O^+$ fragmento, que también es una masa típica de alcoholes (Nicolescu, 2017) (Figura 3a). Finalmente, el tiempo de retención del pico cromatográfico y el espectro de masas se compararon con los de un compuesto estándar (Figura 3B).



(a)



(b)

Figura 1. Preferencia olfativa de machos y hembras de *Optatus palmaris* a diferentes fuentes de olores estímulos, simples o dobles. (a-I), preferencia de machos por una sola fuente de estímulo frente al aire. (a-II), preferencia de machos cuando se evalúan dos fuentes de olor, una contra otra. (a-III), preferencia de machos a una fuente de estímulo que involucra α -terpineol contra aire. (a-IV), preferencia de machos a guanábana desafiada contra guanábana suplementada con α -terpineol. Los datos representan el porcentaje de selección de machos para un estímulo de olor (n = 4).

Las barras negras horizontales indican valores de error estándar. Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes en una prueba de Tukey (**a-I**) ($p < 0,05$); (**a-II**) prueba de G ($G < 0,05$), $*** < 0,0001$; (**a-III**) prueba de Tukey ($p < 0,05$), y (**a-IV**) Prueba G ($G < 0,05$), $*** < 0,0001$. (**b-I**), preferencias de hembras a una sola fuente de estímulo frente al aire. (**b-II**), preferencia de hembras cuando dos fuentes de olor se enfrentan entre sí. (**b-III**), preferencia de hembras a una fuente de estímulo que involucre α -terpineol contra el aire. (**b-IV**), preferencia de las hembras por la guanábana desafiada frente a la guanábana suplementada con α -terpineol. Los datos representan el porcentaje de selección de hembras a un estímulo de olor ($n = 4$). Las barras negras horizontales indican valores de error estándar. Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes en una prueba de (**b-I**) Kruskal-Wallis/Bonferroni ($p < 0,05$); (**b-II**) prueba de G ($G < 0,05$), $** < 0,001$, $*** < 0,0001$; (**b-III**) prueba Kruskal-Wallis/Bonferroni ($p < 0,05$), y (**b-IV**) prueba de G ($G < 0,05$), $*** < 0,0001$. El análisis estadístico se realizó por separado para los datos de machos y hembras. Las barras blancas representan los valores promedio ($n = 4$) de insectos que no respondieron en cada prueba de elección. Las barras negras horizontales indican valores de error estándar. Los valores de insectos que no respondieron se compararon para las tres primeras secciones (I, II y III) con una prueba ANOVA. No hubo diferencias estadísticas entre los valores de insectos que no respondieron en ningún conjunto de experimentos analizados ($p > 0,05$).

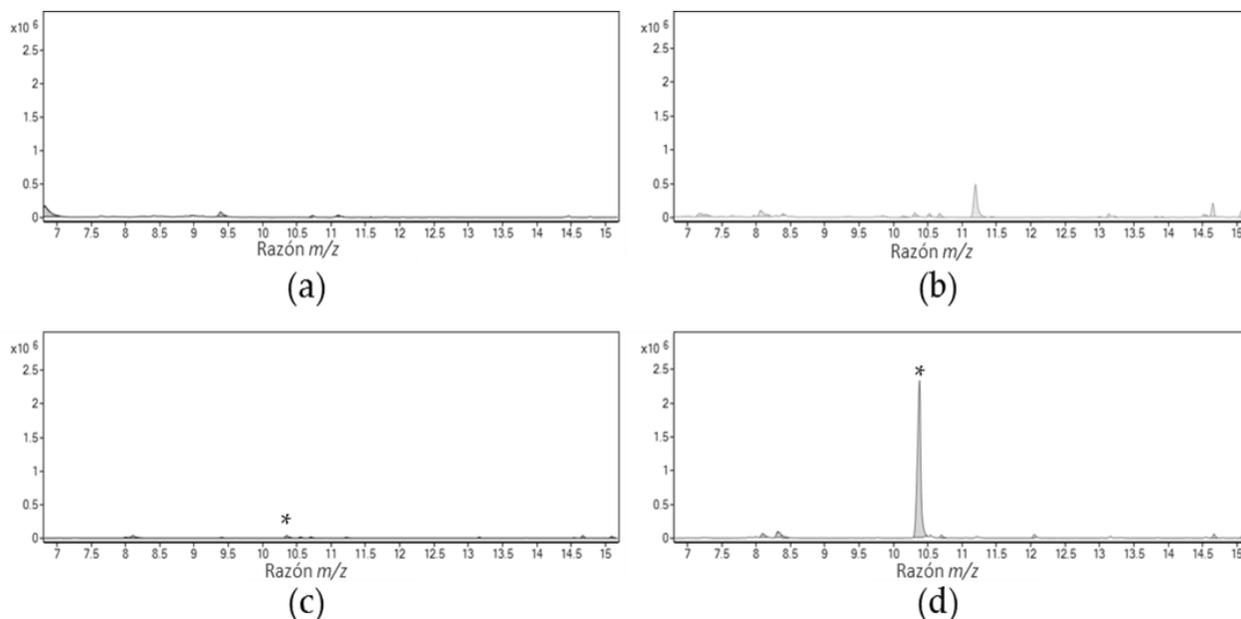


Figura 2. Cromatogramas de mezclas volátiles producidas por diferentes fuentes de olor. (a), guanábana, (b), insectos hembras alimentándose de guanábana, (c), machos que no se alimentan, y (d), machos alimentándose de guanábana. * α -terpineol con $tr=10.34$ min encontrado en los machos y aumentado cuando los machos se alimentan de guanábana.

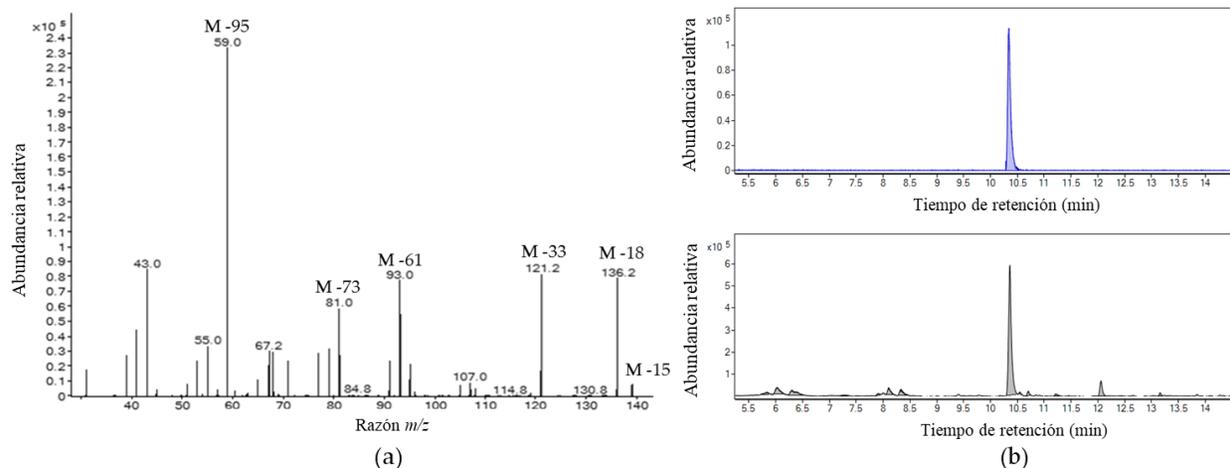


Figura 3. Identificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas de α -terpineol (a), espectro de masas obtenido a partir de un pico cromatográfico de la mezcla volátil producida por machos que se alimentan de guanábana. (b), Comparación del tiempo de retención entre los picos cromatográficos de un compuesto estándar (cromatograma superior) y una mezcla volátil producida por machos que se alimentan de guanábana (cromatograma inferior).

Para reforzar la correlación entre la liberación de α -terpineol y el comportamiento de alimentación de los picudos machos de las anonáceas, se cuantificó su concentración en el espacio de cabeza. Por lo tanto, se determinaron los efectos de recuperación de matriz para lograr datos cuantitativos adecuados. Algunos discos de papel se cargaron con una concentración conocida del volátil, luego se retuvieron, extrajeron y cuantificaron. Además, se realizó el mismo proceso con cartuchos de Tenax® cargados directamente con el mismo compuesto. El contenido medio de α -terpineol de los extractos de papel filtro fue $14.89 \pm 2.61 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y $14.29 \pm 3.18 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para los cartuchos cargados directamente con la misma cantidad de α -terpineol. No hubo diferencias significativas entre estos valores ($t > 0,05$). Por lo tanto, los experimentos del efecto de recuperación de matriz mostraron que todo el α -terpineol cargado originalmente en los discos de papel filtro ($18\mu\text{g}$) es liberado al espacio de cabeza y movido al cartucho. Sin embargo, la concentración de los extractos obtenidos a partir de papel filtro ($14.89 \pm 2.61 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) y su volumen total de extracto ($350 \mu\text{L}$), indican que sólo $5.21 \mu\text{g}$ de α -terpineol fueron recuperados del cartucho bajo las condiciones de elución usadas. Es decir, el 71% de la cantidad total de este metabolito se mantiene en el cartucho de espacio de cabeza dinámico. Entonces, cada valor de cuantificación inicial se compensó con el 71% de su masa.

Posteriormente, se realizó una serie de experimentos de alimentación inversa (alimentación-inanición). Brevemente, se determinó la producción de α -terpineol en machos que

inicialmente se alimentaban de guanábana. Después de 48 h, se retiró el alimento y se cuantificó nuevamente la producción de α -terpineol. El mismo experimento se realizó de manera simultánea con machos sin alimento y machos alimentados con guanábana después de 48 h. Estos experimentos permitieron caracterizar la liberación de α -terpineol en respuesta a los hábitos alimenticios de los picudos machos de las anonáceas. Curiosamente, como se observó anteriormente, la liberación de α -terpineol fue mayor en los machos con alimentación inicial. Por otro lado, los insectos que no se alimentaron aumentaron esta producción volátil cuando se alimentaron y, a la inversa, los machos que se alimentaron inicialmente redujeron su liberación de α -terpineol cuando se les retiró el alimento. Independientemente de la cantidad total de este compuesto producido por los machos que no se alimentan y alimentados después de un período de inanición, la liberación de este volátil aumentó $87 \pm 3.87\%$ en todos los experimentos (Figura 4). La misma relación de disminución se observó cuando se eliminó el alimento a los machos con alimentación inicial (Figura 4).

Considerando la cantidad total de machos (40) usados en los bioensayos para obtener el contenido promedio de α -terpineol en el espacio de cabeza, se determinó una tasa de liberación de 1.83 ± 0.36 ng por 40 machos por segundo. Al considerar la producción por un macho equivalente, se determinó una tasa de liberación de 0.05 ± 0.01 ng por macho equivalente por segundo. Por tanto, soluciones que oscilan entre 0.5 y 10 ng μL^{-1} y 100 ng μL^{-1} se probaron en experimentos de olfatometría de doble elección. El rango de 0.5 a 2 ng μL^{-1} no mostró un patrón de selección claro ni por parte de los picudos machos ni hembras. El rango de 3 a 5 ng μL^{-1} mostró atracción por los picudos machos y hembras. Por encima de estas concentraciones, se produjo un efecto repelente para ambos sexos, especialmente a 100 ng μL^{-1} . Debido a esto, todos los experimentos de preferencias siguientes con este metabolito utilizaron soluciones a 4 ng μL^{-1} . Curiosamente, este compuesto volátil mostró sólo un 56.66% y un 60% de atracción hacia machos y hembras, respectivamente. Por lo tanto, si bien toda la evidencia mostró que este volátil es un metabolito relacionado con el comportamiento alimenticio del picudo de las anonáceas, su atracción no muy alta indica más bien la presencia de otros posibles compuestos volátiles que potencian sus efectos de atracción. Estos compuestos volátiles podrían ser producidos por el insecto o por su planta hospedante. Sin embargo, el análisis cromatográfico de las muestras no mostró ningún otro compuesto potencial que actúa como componente secundario de la feromona de agregación del picudo de las anonáceas. Por lo tanto, todo el ramo volátil de

guanábana se complementó con $4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de α -terpineol, que simuló el efecto de alimentar a los machos sobre esta fruta. La combinación de los volátiles de guanábana y este metabolito resultó en una mayor atracción de machos (83.33%) y hembras (88.33%) a esta fuente de olor. Además, estos valores son comparables a los obtenidos al alimentar a los machos mostrando diferencias estadísticas no significativas entre ellos ($p > 0.05$) (Figura 1). Además, cuando el aroma de la guanábana y la guanábana suplementados con α -terpineol se compararon entre sí este último fue al menos dos veces más atractivo para los picudos machos (74.99%) y hembras (71.66%) (Figura 1).

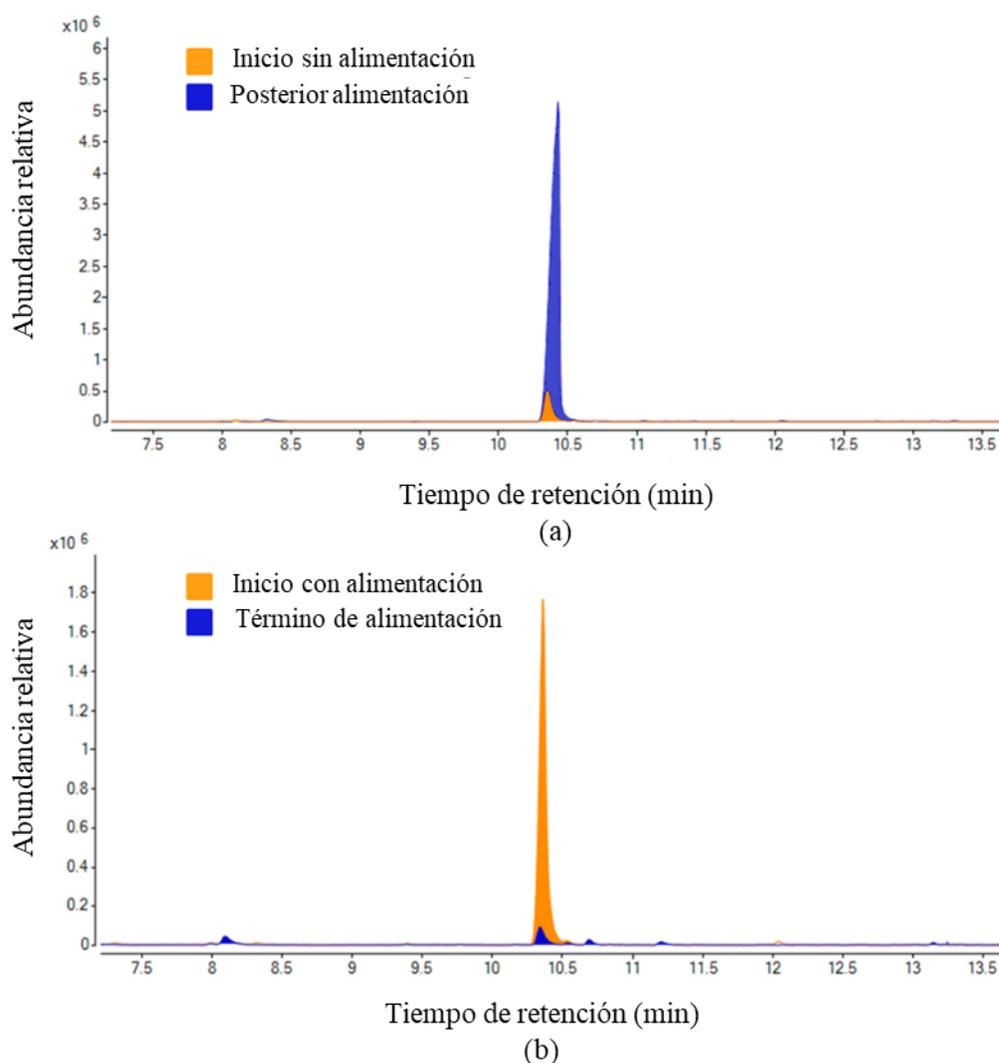


Figura 4. Cromatogramas representativos de los efectos de alimentación e inanición sobre la liberación de α -terpineol por *Optatus palmaris* (a), Aumento de la producción de α -terpineol después de que los machos de *O. palmaris* se alimentan de guanábana. (b), Disminución de la producción de α -terpineol después de que los machos de *O. palmaris* dejaran de alimentarse de guanábana.

El análisis de CG-EM de la fracción volátil retenida por aireación dinámica y microextracción en fase sólida de frutos de guanábana, detectó una gran cantidad de picos cromatográficos. Solo algunos de ellos mostraron una coincidencia de identificación buena con la biblioteca NIST (> 75%). Se identificaron un total de 16 compuestos, incluidos mono y sesquiterpenoides, aldehídos, ácidos grasos, una cetona y un alcohol. No obstante, tres compuestos, D-limoneno, β -cariofileno y nonanal fueron confirmados con estándares.

1.6 DISCUSIÓN

En la naturaleza, los mensajeros químicos constituyen el lenguaje de la comunicación dentro y entre reinos (Beck *et al.*, 2017a). Varias de estas señales químicas poseen un carácter volátil, produciendo respuestas fisiológicas o de comportamiento en el organismo receptor (Beck *et al.*, 2017b). Los volátiles que determinan las interacciones intraespecíficas se denominan feromonas. Dependiendo del resultado conductual, se pueden categorizar como feromonas sexuales, de agregación, de alarma, de ataque o epidécticas, entre otras (Nandagopal *et al.*, 2008). Actualmente, estos compuestos volátiles, cuando se usan en combinación con trampas, detectan, monitorean y controlan las plagas de insectos de manera eficiente y efectiva (Sharma *et al.*, 2019).

En una era en la que la resistencia a las estrategias de control convencionales y a los productos químicos por parte de microbios e insectos aumenta continuamente, las alternativas se vuelven esenciales para garantizar la seguridad alimentaria. Existen varios casos exitosos de control en este contexto, especialmente en insectos lepidópteros y curculiónidos, con semioquímicos (Haenniger *et al.*, 2020; Azuara-Domínguez *et al.*, 2014). En esta investigación, los compuestos volátiles que median el comportamiento de alimentación del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) fueron analizados por su uso potencial en el manejo de este insecto plaga. La primera etapa experimental mostró una alta preferencia por parte de los picudos machos y hembras por el aroma de la guanábana y los machos que se alimentan de esta fruta. Nuestra investigación mostró que los picudos usan los volátiles de la guanábana para encontrar alimento basándose en la atracción por el aroma de la guanábana; este comportamiento se asemeja al comportamiento causado por el olor de una kairomona (Bruce *et al.*, 2005). Sin embargo, los compuestos volátiles de la planta hospedante no son la única señal que se usa para la localización de alimento o de la pareja, como se observa en algunas especies de picudos. Por

ejemplo, las feromonas de agregación producidas por los machos atraen y agrupan a machos y hembras de la misma especie hacia la fuente de alimento para la alimentación y el apareamiento (Tewari *et al.*, 2014). El mismo comportamiento se registró en los ensayos de olfatometría, ya que los machos que se alimentaban estimulaban una mayor preferencia por el aroma, en particular por parte de los picudos machos, en comparación con cualquier otra fuente de olor (Figura 1). La menor preferencia por hembras alimentándose corroboró aún más los resultados. La atracción del picudo a este tratamiento podría deberse únicamente a los volátiles de la guanábana, como lo demuestra la comparación de los valores de atracción de las hembras que se alimentan y la guanábana probada frente al aire (Figura 1). En el caso de las hembras, incluso si se observaron diferencias no significativas entre las preferencias por machos alimentándose o sólo a los volátiles de guanábana, la atracción por machos alimentándose mostró una tendencia a ser más preferida. Sin embargo, los valores observados también indicaron que las hembras poseen un alto uso de los compuestos volátiles del hospedante para localizar alimento. En este sentido, se ha reportado que los picudos hembras localizan su planta hospedante utilizando varias señales volátiles, incluidas la kairomona y las feromonas de agregación (Wang *et al.*, 2020; Webster y Cardé, 2016).

El comportamiento observado de los insectos sugirió la conveniencia del análisis químico de los volátiles. En varias especies de picudos, las feromonas de agregación son moléculas que contienen diez carbonos o menos (Azua-Domínguez *et al.*, 2014; Esparza *et al.*, 2013; Showler, 2006). Debido a esto, se eligieron dos tipos de fibras de microextracción en fase sólida (MEFS) para capturar volátiles en el rango de 40-275 g mol⁻¹, la primera de polidimetilsiloxano (PDMS) y otra de carboxeno/divinilbenceno/PDMS. Los experimentos de aireación dinámica (AD) complementaron los datos de MEFS. Los análisis cromatográficos de todas las fracciones volátiles proporcionaron un pico cromatográfico distintivo, altamente amplificado sólo en los machos que se alimentan. Es decir, un metabolito de baja concentración producido por grupos de machos que no se alimentan, pero que en promedio se incrementa 15 veces cuando los machos se alimentan de guanábana. Este metabolito se identificó como α -terpineol, un monoterpeneoide vegetal común.

Se ha reportado que algunos insectos pueden secuestrar los metabolitos de la planta hospedante para la defensa directa o indirecta o como moléculas de comunicación (Erb y Robert,

2016). Sin embargo, en la composición volátil de la guanábana, los análisis por CG-EM no detectaron α -terpineol (límite de detección= 2.10 ng μL^{-1}), en la composición volátil de la guanábana. Se descartó la producción de este metabolito por los frutos de guanábana luego de los daños causados por la alimentación de los picudos, ya que los perfiles cromatográficos de las hembras que se alimentan de guanábana tampoco mostraron α -terpineol. Por lo tanto, debe ocurrir la síntesis de *novo* por el picudo de las anonáceas. En comparación con los miles de terpenoides detectados en las plantas, estos metabolitos se encuentran sólo en nueve órdenes de insectos (Beran *et al.*, 2019). Por lo tanto, la cantidad total de terpenoides producidos por insectos representa menos del 1% de todos los terpenos que se encuentran en la naturaleza (Zhao *et al.*, 2018). El coleóptero al que pertenece el picudo de las anonáceas es uno de estos nueve órdenes capaz de sintetizar de *novo* terpenoides (Beran *et al.*, 2019). Ejemplos específicos de insectos que producen terpenoides como componentes de feromonas de agregación en la familia Curculionidae son *Anthonomus eugenii*, *Anthonomus musculus*, *Anthonomus rubi*, y *Anthonomus grandis* (Cross *et al.*, 2006; Eller *et al.*, 1994; Hardee, 1974); estos insectos atacan el chile, el arándano, las flores de fresa y los cuadros o botones florales de algodón, respectivamente. Sus feromonas de agregación contienen terpenoides como ácido geránico, geraniol, grandlure II, III, IV y lavandulol (Cross *et al.*, 2006; Eller *et al.*, 1994; Hardee, 1974). Es más, *Curculio caryae* utiliza algunos de estos compuestos en proporciones variables, como feromona de agregación (Hedin *et al.*, 1997). Hasta donde sabemos, el α -terpineol está presente sólo en el escarabajo cerambícido *Megacyllene caryae* como uno de los siete componentes de su feromona de agregación (Mitchell *et al.*, 2018; Lacey *et al.*, 2008). Por lo tanto, este es el primer informe de que el α -terpineol se produce potencialmente como un componente de feromona de agregación en la familia Curculionidae.

Además, un conjunto de experimentos de alimentación inversa mostró un incremento-decremento de α -terpineol relacionado con el comportamiento de alimentación del picudo de las anonáceas. Estos resultados respaldaron aún más que este metabolito actúa como una feromona de agregación (Tewari *et al.*, 2014; Müller y Buchbauer, 2011; Tinzaara *et al.*, 2002) (Figura 4). Además, durante las recolecciones de insectos, las observaciones en el campo también confirmaron que la guanábana sirve como sitio de copulación y alimentación para este picudo. Este comportamiento en el campo corresponde al patrón de comportamiento típico de los insectos bajo un efecto de feromonas de agregación (Tewari *et al.*, 2014).

Sin embargo, el α -terpineol no mostró un fuerte efecto de atracción hacia machos o hembras cuando se probó individualmente contra el aire. Los valores de atracción de este volátil rondaron el 60% para ambos sexos. Además, la solución probada actuó como repelente cuando la concentración aumentó por encima de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. El efecto repelente fue evidente a $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$: debido a que todos los especímenes, independientemente del sexo, seleccionaron el brazo de aire del olfatómetro “Y” o salían de éste. Este comportamiento no indica una preferencia por el aire, sino que sugiere un escape de la corriente de aire concentrada con α -terpineol. El efecto anti-agregación relacionado con la concentración del α -terpineol puede funcionar de la siguiente manera: cuando no hay suficiente espacio para alimentarse y aparearse debido a la alta densidad de insectos en una fruta o árbol, una alta concentración de α -terpineol del grupo de machos del picudo señala a otros conespecíficos la falta de disponibilidad de espacio (Tewari *et al.*, 2014). Los efectos antiagregación mitigan la competencia intraespecífica por la alimentación y el apareamiento (Stelinski *et al.*, 2007). Por lo tanto, utilizando un solo compuesto, cuya función depende de su concentración, representa una estrategia ventajosa de ahorro de energía.

El efecto de atracción relativamente bajo observado del α -terpineol (60%) indicó que el efecto de agregación señalado por la alimentación de los machos también dependía de otros compuestos volátiles. Como se mencionó anteriormente, los análisis de CG-EM descartaron la posibilidad de otro compuesto que complemente el efecto de atracción de la feromona de agregación. La combinación de α -terpineol con volátiles de guanábana exploró una segunda posibilidad. La mezcla atrajo alrededor de un 40% más que solo el α -terpineol cuando se desafió contra el aire. Además, en un ensayo de doble elección, los volátiles de guanábana suplementados con α -terpineol desafiados sólo contra volátiles de guanábana fueron dos veces más atractivos para los picudos machos y hembras.

Investigaciones previas reportaron que los volátiles de la planta hospedante mejoran la actividad de algunas feromonas de insectos (Landolt y Phillips, 1997). En este sentido, la interacción de compuestos volátiles de la planta hospedante e insectos y su repercusión en la atracción resultante se ha estudiado considerablemente en Coleoptera (Beran *et al.*, 2019). Por ejemplo, en el picudo del algodón (A. *grandis*), las capturas en trampas aumentaron significativamente cuando su feromona de agregación se combinó con *trans*-2-hexen-1-ol, *cis*-3-hexen-1-ol o 1-hexanol; compuestos emitidos por las plantas de algodón (Dickens, 1989). El

mismo efecto ocurrió en trampas cebadas con la feromona de agregación del picudo de la ciruela y benzaldehído, un volátil frutal (Piñero y Prokopy, 2003; Piñero *et al.*, 2001). De manera similar, los volátiles de la planta hospedante sinergizaron la respuesta del picudo rojo de las palmas (*Rhynchophorus ferrugineus*), el picudo negro del cocotero (*Rhynchophorus palmarum*), y el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) (Cruz *et al.*, 2019; Hallet *et al.*, 1999). Estos efectos no se limitan a las plagas agronómicas de los cultivos, sino que también se extienden a los insectos forestales. Las capturas de trampas cebadas con la feromona de agregación de *Dendroctonus ponderosae* aumentó considerablemente (de 5 a 13 veces) cuando se combina con compuestos volátiles de pino (Borden *et al.*, 2008).

Por lo tanto, confirmamos que el α -terpineol es un compuesto volátil vinculado al comportamiento de alimentación de los machos del picudo de las anonáceas. Además, este volátil se utiliza como feromona de agregación, cuyos volátiles de la planta hospedante mejoran su efecto. Es posible que se requiera corroboración en ensayos de campo adicionales, pero estos resultados resaltan el potencial del uso de semioquímicos asociados con el comportamiento de alimentación picudo de las anonáceas para su manejo y control.

Sin embargo, incluso si el análisis de CG-EM de la fracción volátil de frutos de guanábana detectó una gran cantidad de picos cromatográficos, sólo algunos de ellos mostraron una buena coincidencia de identificación con la biblioteca NIST. Solo tres compuestos, D-limoneno, β -cariofileno y nonanal se confirmaron con compuestos estándares. Además, no hubo criterios claros de selección para la selección de volátiles de guanábana específicos para experimentos combinatorios adicionales. Además, incluso si se identifica, D-limoneno y β -cariofileno son compuestos generales que se encuentran en varias especies de plantas (Hartsel *et al.*, 2016; Erasto y Viljoen, 2008), lo que los convierte en compuestos no específicos de la guanábana. Estos hallazgos sugieren la necesidad de desarrollar un enfoque específico para la caracterización de la kairomona del picudo de las anonáceas. Esto, especialmente para determinar compuestos específicos y proporciones que mejoren la atracción de las feromonas de agregación.

CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN QUIMIOMÉTRICA DE LOS COMPONENTES DE LA KAIROMONA DEL PICUDO DE LAS ANONÁCEAS, *Optatus palmaris* (PASCOE, 1889)

2.1 RESUMEN

El género *Annona* está compuesto por diversas especies, con distribución en América Latina, entre ellas destaca la guanábana (*Annona muricata*) debido a que posee el tamaño de fruta más grande del género, además, su valor comercial ha aumentado debido a sus múltiples efectos benéficos sobre la salud humana. A pesar de la importancia económica de la guanábana y su alto potencial como agente nutracéutico, su producción es limitada por diversos problemas fitosanitarios, entre los que se encuentra el picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*), que ocasiona daños severos en el fruto, lo cual incluye cáscara y pulpa, que resulta finalmente en el desprendimiento prematuro del fruto del árbol. Las estrategias de manejo hasta ahora implementadas no han sido suficientes para mitigar el daño causado por esta especie. Por lo tanto, investigación sobre estrategias alternativas y complementarias de manejo y control comenzaron a ser objeto de estudio. Uno de estos enfoques incluye el uso potencial de semioquímicos para monitorear y controlar esta plaga. Anteriormente, se comprobó el papel del α -terpineol como feromona de agregación en *O. palmaris*; además, se demostró que la fracción aromática de la guanábana aumenta la atracción del α -terpineol de especímenes machos y hembras de *O. palmaris*. Sin embargo, no se identificaron compuestos volátiles específicos ni se correlacionaron con el efecto de atracción del aroma de la guanábana hacia los picudos. Así, este estudio trata sobre la determinación de compuestos volátiles emitidos por frutos no dañados a través de su desarrollo fenológico y preferencia por el picudo de las anonáceas. Los datos químicos y biológicos se combinaron y abordaron mediante métodos quimiométricos para determinar los posibles volátiles involucrados en la ubicación de los frutos de guanábana y la potenciación de la feromona de agregación de *O. palmaris*. Pruebas de olfatometría mostraron la alta preferencia de hembras y machos a frutos en madurez fisiológica. Los volátiles asociados a la preferencia por dichos frutos fueron principalmente benzotiazol y β -cariofileno.

Palabras clave: benzotiazol, β -cariofileno, olfatometría.

2.2 ABSTRACT

The genus *Annona* is composed of several species, with distribution in Latin America, among them, soursop (*Annona muricata*) outstands because of its bigger size compared with other *Annona* species. Moreover, it possesses great commercial value and several benefits over human health. However, its production is limited by several phytosanitary problems. One of these problems is the Annonaceae weevil (*Optatus palmaris*), which causes severe damage to the fruit. This results in the detachment of the fruit from the soursop tree. Furthermore, the management strategies implemented so far have not been sufficient to mitigate the damage caused by this pest. Because of this, research dealing with alternative management and control strategies started to be of interest for the scientific study. One of these approaches is the potential use of semiochemicals for pest monitoring and control. Previously, α -terpineol was determined as the aggregation pheromone of *O. palmaris*, additionally, its potentiation by the soursop aroma was also demonstrated. Nonetheless, there was still a lack of the punctual identification of volatile composing the kairomone used by *O. palmaris* to locate its plant host. Thus, this research deals with the identification of volatile produced by non-damaged soursop fruits through their phenological development and their effect over the insect preference. The chemical and biological data were approached by chemometrics to determine such volatiles. Olfactometry test determined that both male and female weevils significantly prefer fruits which have reached physiological maturity. The two most correlated volatile to such preference were benzothiazole and β -caryophyllene.

Keywords: benzothiazole, β -caryophyllene, olfactometry.

2.3 INTRODUCCIÓN

El género *Annona* está compuesto por alrededor de 120 especies, todas ellas son árboles frutales tropicales de los cuales sólo el siete por ciento de ellos se utilizan con fines comerciales (Hernández-Vidal *et al.*, 2014). Entre ellas, la chirimoya (*Annona cherimola*), la anona (*Annona squamosa*), la atemoya (*Annona x atemoya*) y la guanábana (*Annona muricata*) son las especies de mayor importancia económica (George y Nissen, 2003). Sin embargo, la guanábana posee el tamaño de fruta más grande del género; el peso de una sola fruta varía de 1 a 10 kg, aproximadamente, y 4 kg como peso promedio por fruta (Padmanabhan y Paliyath, 2016). Hasta el 85 % del fruto entero está compuesto por pulpa blanda blanca, la cual puede ser consumida directamente o utilizada para la elaboración de mermeladas, dulces, bebidas y otros productos (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Además, el valor comercial de la guanábana ha aumentado debido a sus múltiples efectos benéficos sobre la salud humana (Ojeda *et al.*, 2007; Solís-Fuentes *et al.*, 2010; Padmanabhan y Paliyath, 2016; Guimarães *et al.*, 2022).

No obstante, a pesar de la importancia económica de la guanábana y su alto potencial como agente nutracéutico, su producción enfrenta varios desafíos fitosanitarios. Dichos desafíos incluyen algunas enfermedades asociadas a microorganismos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Prinomerus anonicola*, *Phomopsis anonacearum* y *Botryodiplodia theobromae*. Sin embargo, sólo afectan principalmente a flores y frutos jóvenes en condiciones específicas de alta humedad y temperatura (Pennisi y Agosteo, 1994; Zarate-Reyes, 1995; Badrie y Schauss, 2010). También existen insectos barrenadores de frutos (*Cerconota anonella*), de semillas (*Bephratelloides maculicollis*) y de tallos (*Cratosomus* spp.), entre otros (Badrie y Schauss, 2010). En México, una de las principales plagas de los frutos de guanábana es *Bephratelloides cubensis*, la cual produce orificios en la superficie del fruto al entrar a ovipositar en las semillas, daño que disminuye la calidad del fruto, especialmente para el comercio internacional (Hernández-Fuentes *et al.*, 2008), aunque no es lo suficientemente grande como para descartar la fruta entera, que puede venderse localmente o utilizarse para la obtención de pulpa. Contrariamente, este no es el caso del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*), que causa daños considerables en cáscara y pulpa del fruto, que resulta finalmente en el desprendimiento prematuro de éste del árbol (Hernández-Fuentes *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el control químico no es suficiente para mitigar el daño causado por el picudo de las anonáceas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2021). Por lo tanto, la investigación sobre estrategias alternativas y complementarias de manejo y control comenzaron a ser objeto de escrutinio. Uno de estos enfoques incluye el uso potencial de semioquímicos para monitorear y controlar esta plaga de insectos. Recientemente, se comprobó el papel del α -terpineol como feromona de agregación en el picudo de las anonáceas; además, se demostró que la fracción aromática de la guanábana aumenta la atracción del α -terpineol de especímenes machos y hembras de *O. palmaris* (Pineda-Ríos *et al.*, 2021). Sin embargo, no se identificaron compuestos volátiles específicos ni se correlacionaron con el efecto de atracción del aroma de la guanábana hacia los picudos. En este contexto, se han realizado varios estudios sobre la fracción volátil de la guanábana, teniendo como resultado a los ésteres como los principales componentes del aroma de la guanábana (Lako *et al.*, 2007). No obstante, todos estos estudios se han realizado sólo en materiales de pulpa (Pino *et al.*, 2001; Cheong *et al.*, 2010; Cheong *et al.*, 2011a; Galvao *et al.*, 2017; Wongkaew *et al.*, 2021). Además, otros estudios de volátiles se centran en la producción de volátiles después de la maduración postcosecha (Marquéz-Cardoso *et al.*, 2012; Padmanabhan y Paliyath, 2016). Por tanto, considerando el mecanismo de ubicación natural de los frutos de guanábana por el picudo de las anonáceas, se consideró conveniente realizar un estudio sobre los volátiles liberados por los frutos no dañados.

Así, este estudio trata sobre la determinación de compuestos volátiles emitidos por frutos no dañados a través de su desarrollo fenológico y su preferencia por el picudo de las anonáceas. Además, los datos químicos y biológicos se combinaron y abordaron mediante métodos quimiométricos para determinar los posibles volátiles involucrados en la ubicación de los frutos de guanábana y potenciación de la feromona de agregación de *Optatus palmaris*.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material vegetal

Durante septiembre de 2021 se recolectaron flores y frutos de guanábana en un huerto ubicado en la localidad de Las Varas, municipio de Compostela, Nayarit, México (21°6' 13.572", -105°9' 52.2"). Se seleccionaron flores maduras completas, sin daño, de coloración amarillo-verdoso y con sépalos abiertos. Los frutos fueron seleccionados con base en su estado

de desarrollo, tamaño y maduración; además se verificó que no presentaran daños externos ocasionados por plagas, enfermedades o algún otro agente biótico o abiótico. Se definieron cuatro grupos de frutos, diferenciados principalmente por tamaño (longitud y ancho), peso, coloración y desarrollo de protuberancias estilares. Se determinó la media y error típico de la media para cada uno de los datos cuantitativos de los grupos de guanábana. Los frutos de menor tamaño (G1), denominados “cepillos”, presentaron una longitud promedio de 5.87 ± 0.565 cm, ancho de 5.79 ± 0.480 cm y 20.73 ± 4.200 g de peso ($n=121$). Los frutos G2 fueron de dimensiones mayores que el G1, con longitud de 10.35 ± 0.608 cm, ancho de 10.50 ± 0.707 cm y de 129.75 ± 3.389 g ($n=20$). El grupo de frutos G3 tuvo una longitud promedio de 13.4 ± 0.380 cm, ancho de 12.58 ± 0.335 cm y peso de 317.51 ± 28.091 g ($n=8$). El grupo de frutos en madurez fisiológica (G4) presentaron una longitud promedio de 21.01 ± 0.447 cm, ancho de 18.27 ± 0.420 cm y 687.169 ± 38.683 g de peso. La coloración de frutos varió desde verde intenso para “cepillos”, hasta verde amarillento de frutos en madurez fisiológica. En frutos G1 se presentaban protuberancias estilares poco definidas, poco desarrolladas y aglomeradas. Estas incrementaban gradualmente de tamaño y eran más dispersas conforme se incrementa el tamaño del fruto, de tal manera que los de mayor tamaño y separación eran las de frutos G4.

Las flores y frutos fueron desprendidos utilizando una navaja con la finalidad de realizar un solo corte en el pedicelo y pedúnculo, respectivamente. La totalidad de ambos órganos vegetales fueron envueltos en papel absorbente y depositados en hielera con geles refrigerantes para su transporte a laboratorio.

2.4.2. Recolección de insectos y cría

Se recolectaron de manera manual insectos de edad y estado de apareamiento desconocido. Los especímenes se transportaron en recipientes de plástico provistos con orificios para la oxigenación. En laboratorio, los insectos fueron separados por sexo, con base en las características morfológicas descritas por Champion (1907) y colocados en jaulas entomológicas con segmentos de guanábana para su alimentación. Las condiciones de cría fueron 25 ± 2 °C, 60 - 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 12:12 h (luz:obscuridad).

2.4.3. Colección de volátiles

La recolecta de volátiles emitidos por flores y guanábanas G1-G4 se llevó a cabo mediante la técnica de “headspace” o espacio de cabeza, bajo la modalidad de aireación dinámica (AD). El material de vidrio empleado se lavó en la siguiente secuencia: Extran®, agua destilada, acetona, diclorometano y hexano; posteriormente se mantuvo en el horno a 300 °C por 3 h.

El material vegetal se colocó sobre una base (14.2 x 22.7 cm) de alambre de acero inoxidable, a una altura de 4.6 cm de la parte inferior del sistema de AD. En promedio 660 g de fruto para cada estado de desarrollo y 250 g de flores, por separado, fueron utilizados para la recolecta de los compuestos orgánicos volátiles (COV's). El sistema de AD corresponde a un diseño horizontal de 14 L de capacidad, conformado por un cilindro central y unido a éste, en cada extremo, dos embudos empotrables. Para el arrastre de COV's, se produjo un flujo de aire con una bomba de vacío (ELITE 802®, Colchester, VT, EE. UU.), el cual fue direccionado por manguera de PVC libre de volátiles (Nalgene®, Rochester, NY, EE. UU., PVC 180, DI de 3/16”) hacia un cartucho con 50 mg de Tenax® (60/80, Baltimore, MD, EE. UU.) para ser filtrado. El flujo de aire que ingresó al sistema fue de 0.330 L min⁻¹, el cual fue controlado con un flujómetro (GILMONT®, Londres, Reino Unido) y calibrado con un flujómetro manual de vidrio (Hewlett-Packard). La recolección de volátiles se realizó durante 4 h.

Para la captura de volátiles se usó un cartucho con 50 mg de Tenax® (60/80) como absorbente y 20 mg de fibra de vidrio en cada extremo. Todos los cartuchos se lavaron previamente con 5 mL de hexano y se dejaron secar en campana de extracción, posteriormente se hornearon a 300 °C durante 3 h. Posterior a la absorción, los cartuchos se eluyeron con 350 µL de hexano de grado HPLC. Finalmente, se adicionaron 50µL de hexano. Los blancos consistieron en la elución de cartuchos conectados al sistema de AD vacías. Se realizaron cuatro réplicas para cada grupo.

2.4.4. Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (CG-EM)

Los extractos volátiles se analizaron con un cromatógrafo de gases HP-6890 acoplado a un detector selectivo de masas (DSM) de tipo cuadrupolo simple HP-5973. El sistema CG-EM estaba equipado con una columna HP-5MS (30 m× 0.250 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria, J&W Science, Folsom, CA, EE. UU.) para la separación de muestras. Se utilizó helio (99.999% de pureza) como gas acarreador a flujo de 1 mL min⁻¹. Para

la separación de los compuestos se utilizó un programa con rampas de temperatura. El horno se programó para comenzar a las 60 °C y se mantuvo durante 1 min, luego aumentó 4 °C/min hasta 102 °C por 1 minuto. Posteriormente, la temperatura volvió a incrementar a 6 °C/min hasta 175 °C y se mantuvo durante 1 min. Se incrementó la temperatura 5 °C/min hasta 192 °C, manteniéndose 1 min en espera. Finalmente, la temperatura aumentó 6 °C / min hasta 270 °C, con tiempo de espera de 1 min. El puerto de inyección se estableció en 250 °C en modo *splitless* (sin división de muestra). El volumen de inyección fue de 1 µL y se utilizó un “liner” de 2 mm de DI. La fuente de iones y la temperatura del cuadrupolo del DSM fueron 230 °C y 150 °C, respectivamente. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C. La energía de ionización en modo IE fue de 70 eV y los datos de masa se adquirieron en el modo SCAN (30 - 550 m/z). Como estándar interno se adicionó a cada extracto 50 µL de β -ionona, a concentración de 27 ng µL⁻¹. La identificación cromatográfica de picos fue realizada comparando sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST (versión 2014) y comparando su tiempo de retención y el espectro con el de los estándares.

2.4.5. Olfatometría

Se evaluó, mediante series de experimentos de elección por pares, la respuesta comportamental de hembras y machos adultos de *O. palmaris* a compuestos volátiles emitidos por flores y frutos G1-G4. Se utilizó un olfatómetro de vidrio de borosilicato tipo “Y” con brazo principal de 12 cm de longitud, 2.5 cm de diámetro interno (DI); brazos de elección 10 cm de largo, 2.5 cm de DI, separados en un ángulo de 45°. Para el arrastre de COV’s, las fuentes de olor (flores y frutos G1-G4), se colocaron por separado en cámaras herméticas, libres de volátiles, de 3.4 L, conectadas con mangueras (Nalgene®, Rochester, NY, EE. UU., PVC 180, DI de 3/16”) a los brazos del olfatómetro. Las cámaras fueron cubiertas con papel negro mate para evitar interferencia visual. Las cantidades de material vegetal y flujo de aire de arrastre fueron las mismas que para AD. El acondicionamiento del cuarto de bioensayo, colocación del olfatómetro y evaluación de pruebas se realizó como en Pineda-Ríos *et al.* (2021). Las combinaciones evaluadas se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Combinaciones de fuentes de olor utilizadas en ensayos de olfatometría. Se utilizaron en cada tratamiento 650 g de fruto y 250 g de flores.

Ensayo	Brazo 1	Brazo 2
Dos fuentes de olor	Flor	G4
Una fuente de olor	Aire	G1
	Aire	G2
	Aire	G3
	Aire	G4

Los insectos evaluados permanecieron sin alimento por 24 h antes del inicio del bioensayo. Grupos de 15 machos o 15 hembras, por separado y de manera individual, se probaron para determinar su preferencia a fuentes de olor específicas. Cada grupo se consideró una repetición y para cada fuente de olor se tuvieron cuatro repeticiones (120 insectos evaluados). Los brazos del olfatómetro se rotaron cada cinco insectos para evitar efectos de posición en la selección del brazo. Además, el olfatómetro se reemplazó cada dos repeticiones para evitar la interferencia de olor residual. Antes de comenzar las pruebas de olor, se usó el aire en ambos brazos para verificar que no hubiera una selección específica causada por reflejos de luz o volátiles remanentes en el sistema. Se seleccionaron y prepararon cuatro grupos de 20 insectos (machos o hembras) para probar un tratamiento completo o una comparación. Los insectos ya utilizados se alimentaron y se dejaron recuperar durante 48 h. Los insectos recuperados se mezclaron con otros insectos no utilizados y se seleccionaron nuevamente al azar para formar cuatro nuevos grupos de prueba. Los valores porcentuales de selección se calcularon sólo a partir de los insectos que respondieron (15 insectos). No obstante, también se registró e informó el porcentaje de insectos que no respondieron. Finalmente, los datos se registraron como el porcentaje de picudos que seleccionaron una fuente de olor específica. Los datos representaron el promedio de elección de cuatro réplicas \pm error estándar.

2.4.6. Análisis estadístico

Los datos de los diferentes experimentos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Para los ensayos de olfatometría, de una fuente de olor vs. aire, se

utilizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los ensayos de olfatometría que compararon dos fuentes de olor simultáneamente se analizaron mediante una prueba de G. Asimismo, para determinar la independencia de elección de frutos basada en el sexo, se realizó la prueba de Chi cuadrada. El análisis *post hoc* se realizó con corrección de Bonferroni (datos de olfatometría sin respuesta). Las diferencias estadísticas entre los picudos que no respondieron se determinaron con una prueba ANOVA. Todos los análisis se realizaron en el software R (R Core Team, 2020).

2.4.7. Análisis Multivariado

El conjunto de muestras se analizó primero mediante análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para buscar la diferenciación volátil en frutos de guanábana a través de cuatro estados de madurez, y entre flores de guanábana y frutos maduros. Los datos fueron centrados en la media y los modelos fueron escalados por Pareto. Se construyó un análisis discriminante de proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS-DA, por sus siglas en inglés), para explorar diferencias puntuales entre flores de guanábana y sus frutos maduros. Los metabolitos asociados a diferencias entre órganos fueron aquellas variables con valor de $p\text{-corr} \geq 4$ en el S-plot. Además, se construyeron modelos de proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS, por sus siglas en inglés) para determinar las correlaciones entre la fluctuación volátil y el grado de madurez de los frutos de guanábana y su preferencia por especímenes hembras y machos de *O. palmaris*. Todos los modelos OPLS fueron escalados por Pareto. El grado de madurez y el porcentaje de atracción por los picudos de *O. palmaris* se establecieron como variables Y en los modelos. Los modelos fueron validados por permutación (100 permutaciones, considerando un $Q^2 > 0.40$ y por prueba de CV-ANOVA ($p \leq 0.05$). Los volátiles correlacionados con cada variable Y se determinaron mediante la importancia de la variable para la gráfica predictiva de proyección (VIPpred) (valor VIP > 1).

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las observaciones de campo indican que los especímenes del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) se alimentan primero de las flores, pero cuando aparecen los frutos, se desplazan preferentemente hacia ellos (Maldonado-Jiménez *et al.*, 2014; Castañeda *et al.*, 2009). Esto fue confirmado por ensayos de olfatometría utilizando flores y frutas maduras como fuentes

de olor desafiadas entre sí. Las pruebas mostraron una preferencia significativa por frutos ($G = 34.09$, $p < 0.0001$ por hembras y $G = 66.57$, $p < 0.0001$ por machos). En el caso de los picudos hembras, $78.33\% \pm 4.19$ de los ejemplares prefirieron frutos a flores. De manera similar, el $88.33\% \pm 4.19$ de los picudos machos probados prefirieron los frutos sobre flores. Sin embargo, los valores de preferencia de los picudos hembras y machos no fueron estadísticamente diferente ($X^2 = 2.91$, $p = 0.08773$), lo cual significa que, la preferencia por frutos sobre flores es independiente del sexo del picudo (Figura 1). Esto indica que la mezcla kairomonal que es producida por frutos es mucho más atractiva que la expedida por flores. De esta forma, una diferenciación entre el aroma de los órganos debe provocar preferencia hacia los frutos de guanábana.

En este sentido, el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas mostró la presencia de varios tipos de compuestos volátiles en estos materiales. En general, la fracción volátil de los frutos y flores de guanábana incluyó ácidos orgánicos, aldehídos, alcanos, alquenos, monoterpenos, sesquiterpenos, cumarinas, derivados aromáticos, compuestos que contienen azufre y nitrógeno (Anexo 2). El análisis de componentes principales (PCA) de volátiles de frutos y flores maduros de guanábana resultó en un modelo con dos componentes principales (PC) que explican el 36 % de la variación total del modelo ($RX^2_{cum} = 0.36$). Los frutos se separaron de las flores a lo largo del PC1, que capturó el 21 % de la variación total del modelo; el PC2 capturó el 15 % de la variación total (Figura 2A). Esto confirmó la diferenciación volátil entre flores y frutos. Para obtener más información sobre los efectos específicos correlacionados a órganos, se realizó un análisis discriminante por proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS-DA, por sus siglas en inglés) en el mismo conjunto de datos. El modelo confirmó la separación observada previamente por PCA (Figura 2B). Además, el modelo fue bien validado con un $Q^2 = 0,73$ y una $p < 0.01$ en las pruebas de permutación y CV-ANOVA, respectivamente. El gráfico S del análisis OPLS-DA mostró que los frutos maduros se diferenciaban de las flores por un mayor contenido de nerolidol, 4,4,5,7,8-pentametil dihidrocumarina, cariofileno, 4,6,8-trimetil-1-noneno y α -muuroleno. Por otro lado, además de menor contenido de los volátiles anteriores, las flores se diferenciaron de los frutos por contener β -ocimeno, el cual no se detectó en los frutos (Figura 2C).

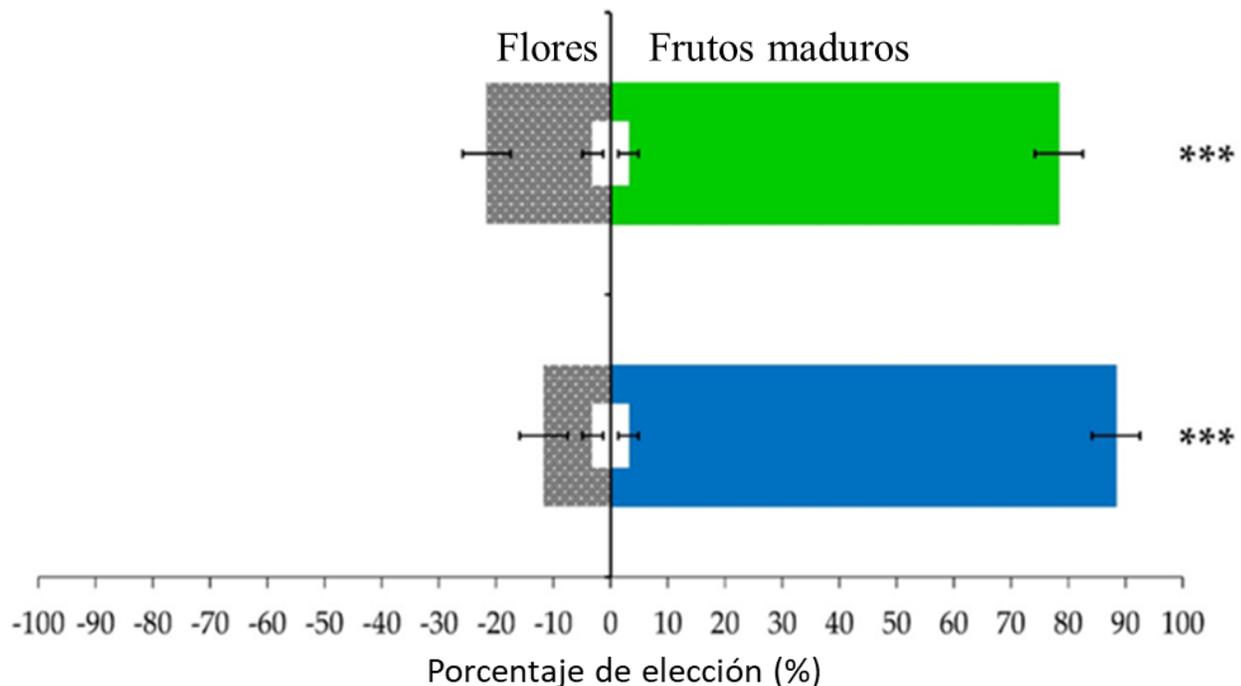


Figura 1. Preferencia olfativa de hembras (color verde) y machos (color azul) de *Optatus palmaris* a flores de guanábana retados contra frutos maduros (G4). Los datos representan el porcentaje de selección de machos para un estímulo de olor ($n = 4$). Las barras negras horizontales indican valores de error estándar. Los datos fueron analizados, por separado para ambos sexos, mediante una prueba de G ($G < 0,05$), $*** < 0.0001$. Las barras blancas representan los valores promedio ($n = 4$) de insectos que no respondieron en cada prueba de elección. No hubo diferencias estadísticas entre los valores de insectos que no respondieron en ningún conjunto de experimentos analizados ($p > 0.05$).

Con excepción de 4,4,5,7,8-pentametil dihidrocurarina y 4,6,8-trimetil-1-noneno, los otros volátiles se han detectado previamente en varios especímenes de la familia Annonaceae (Ekundayo, 1989). No obstante, los volátiles correlacionados con diferencias entre órganos podrían no estar directamente correlacionados con la preferencia de los picudos hacia los frutos. En este contexto, se llevó a cabo un segundo ensayo de olfatometría para evaluar la preferencia del picudo de las anonáceas hacia frutos de guanábana en diferentes estados fenológicos. Los estadios se denominaron G1 a G4, el último estuvo compuesto por frutos maduros de guanábana. Los ensayos mostraron que la preferencia de los picudos machos y hembras hacia las frutas aumentó a medida que aumentaba su madurez. En el caso de los picudos hembras no hubo diferencia significativa en la preferencia del estadio G1 al G3, sin embargo, en el G4 hubo un aumento significativo ($F_{4,15} = 21.17$, $p < 0.0001$) en la atracción (Figura 3A). En el caso de los picudos machos, se observó una tendencia de atracción más notoria a medida que aumentaba la

madurez de los frutos. Es decir, G1 fue significativamente menos atractivo que G2, no hubo diferencias significativas entre G2 y G3, pero G4 fue significativamente más atractivo que G2 y G3 ($F_{4,15} = 47.03$, $p < 0,0001$) (Figura 3B). Esta respuesta conductual indica una potencial de diferenciación volátil cualitativa y/o cuantitativa a través del desarrollo fenológico en frutos de guanábana. Adicionalmente se determinó que la preferencia de *O. palmaris* hacia los diferentes estados de desarrollo del fruto no depende del sexo ($X_3^2 = 0.34655$, $p = 0.951$).

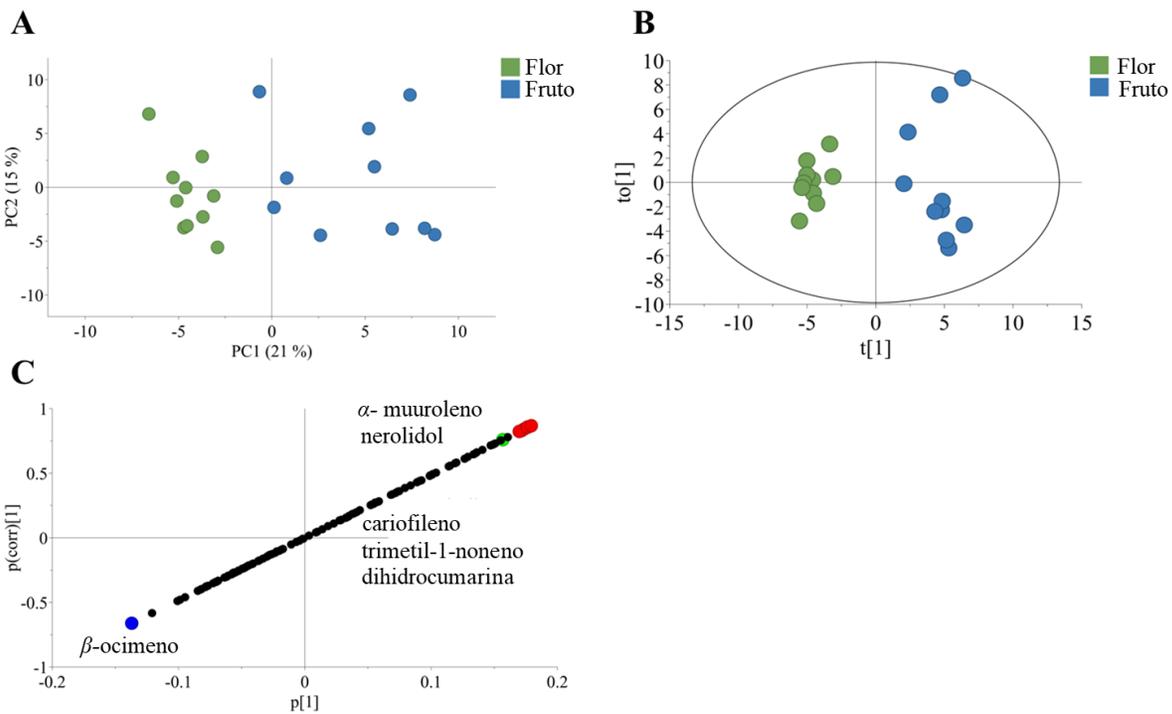


Figura 2. Análisis multivariado de volátiles emitidos por frutos y flores de guanábana (*Annona muricata* L.). **A)** Análisis de componentes principales de frutos maduros y flores de guanábana. **B)** Proyección ortogonal a análisis discriminante de estructuras latentes (OPLS-DA) de frutos maduros y flores de guanábana. **C)** Gráfico S de OPLS-DA de frutas maduras y flores de guanábana: los puntos rojos indican volátiles correlacionados con frutas y los azules con flores. El punto verde representa benzotiazol.

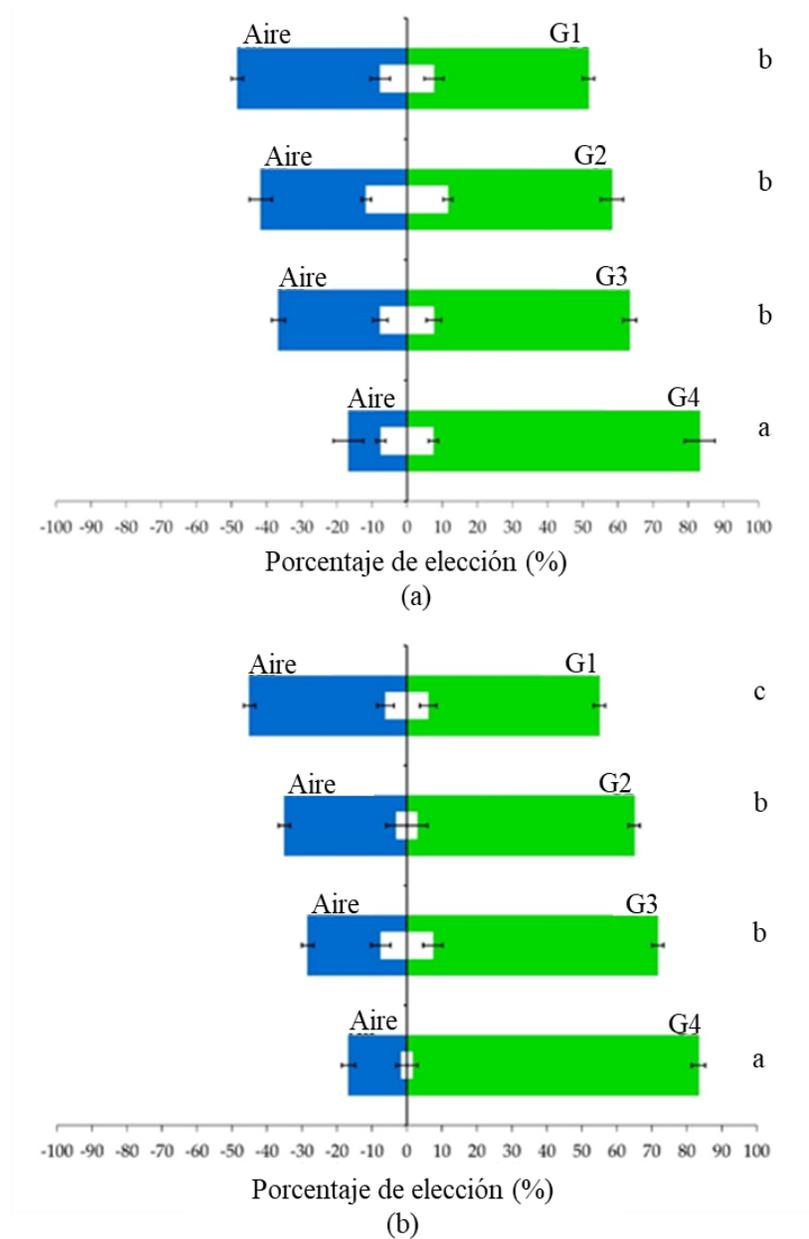


Figura 3. Preferencia olfativa de machos y hembras de *Optatus palmaris* hacia frutos de guanábana en diferentes estados fenológicos. Los estados se denominaron G1 a G4. **a)** preferencia de hembras por una sola fuente de estímulo frente al aire. **b)** preferencia de machos por una sola fuente de estímulo frente al aire. Los datos representan el porcentaje de selección de hembras y machos para un estímulo de olor ($n = 4$). Las barras negras horizontales indican valores de error estándar. Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes en una prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las barras blancas representan los valores promedio ($n = 4$) de insectos que no respondieron en cada prueba de elección. Los análisis estadísticos se realizaron por separado para los datos de machos y hembras.

Por lo tanto, para obtener más información sobre la producción volátil de frutos de guanábana, se realizó un PCA con datos de compuestos volátiles obtenidos de diferentes etapas de madurez. El análisis arrojó un modelo con cuatro PC, que explicó el 63 % de la variación total ($R^2X_{cum} = 0.63$). El modelo necesitaba tres componentes para separar las muestras en el espacio en cuatro estados de madurez. El PC1 separó las muestras G4 del resto de las muestras y capturó el 20 % de la variación total del modelo. Las muestras G1, G2 y G3 separadas por PC2 y PC3; capturaron 20 y 12 % de la variación total del modelo, respectivamente (Figura 4A).

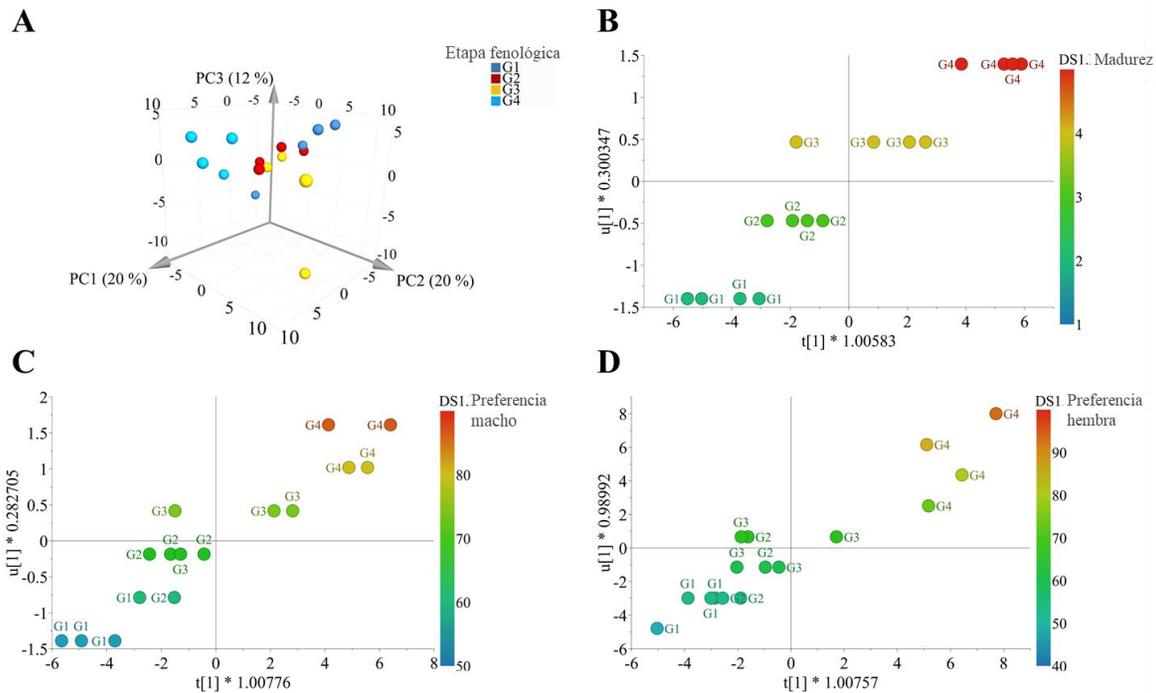


Figura 4. Análisis multivariado de datos de volátiles emitidos por frutos y flores de guanábana (*Annona muricata* L.). **A**, Análisis tridimensional de componentes principales de volátiles de frutos de guanábana coloreados según su estado de maduración. **B**, análisis de proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS, por sus siglas en inglés) según las etapas de maduración de los frutos de guanábana. **C**, Análisis OPLS para la correlación entre los volátiles emitidos por frutos de guanábana en diferentes etapas de maduración y su preferencia por el picudo macho. **D**, Análisis OPLS para la correlación entre los volátiles emitidos por los frutos de guanábana en diferentes etapas de maduración y su preferencia por el picudo hembra. En ambos casos, la preferencia por los picudos machos y hembras aumenta a medida que cambia la emisión de volátiles a lo largo de las etapas de maduración.

La clara separación de los frutos G4 del resto de los estados de madurez indicó un perfil volátil más diferenciado, lo que podría estar correlacionado con su mayor atracción observada previamente en ensayos de comportamiento. Así, el modelo PCA mostró una diferenciación volátil de los frutos de guanábana durante su maduración. Sin embargo, los grupos G1, G2 y G3

menos separados también coinciden con su falta o bajas diferencias estadísticas en los valores de atracción. Por lo tanto, las diferencias en las emisiones de volátiles a través de las etapas de madurez deben estar asociadas a diferencias cuantitativas menores más que cualitativas, al menos de G1 a G3. Por ello, el análisis supervisado debe ayudar a aclarar tales variaciones.

En este sentido, para establecer un grado de correlación entre la fluctuación volátil y el grado de madurez en frutos de guanábana, se realizó un análisis de proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS, por sus siglas en inglés) en el mismo conjunto de datos; en este modelo el grado de madurez se utilizó como variable cuantitativa “Y”. El modelo fue bien validado ($p < 0.01$) y mostró una buena correlación ($Q^2 = 0.74$) entre las emisiones de volátiles y el estado de madurez de los frutos de guanábana (Figura 4B). El gráfico de importancia de variables predictivas para la proyección (VIP_{pred}) mostró que el benzotiazol, cariofileno, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, 2,2,7,7-tetrametiloctano, diacetin glicerol, 4,4,5,7,8-pentametil dihidrocurarina, β -elemeno, 3,7-dimetildecano y éster alílico de pentadecilo de ácido oxálico están correlacionados con el aumento de la madurez de la guanábana (Figura 4C). Curiosamente, (Figura 2C), el benzotiazol fue el volátil con mayor valor de correlación con los efectos de maduración en frutos de guanábana, que no se encontró en el grupo de volátiles más correlacionados con la diferenciación entre fruto y flor (Figura 1C). Dicho valor de correlación fue alrededor de tres veces mayor que el cariofileno, que fue el segundo volátil más correlacionado con la madurez de la guanábana. Estos datos destacan la especificidad de la correlación del benzotiazol con la madurez del fruto y no a las diferencias generales entre órganos. Por el contrario, el cariofileno se correlacionó tanto con la diferenciación de órganos como con la etapa de madurez, lo que sugiere una multifuncionalidad potencial y una producción específica de tiempo y espacio (Garagounis *et al.*, 2021).

Para obtener más información sobre la variación volátil y la funcionalidad biológica, el análisis OPLS analizó la correlación entre la fluctuación volátil a través de las etapas de madurez y su grado de atracción hacia el picudo de las anonáceas. Los resultados mostraron que el grado de atracción se correlacionó con los cambios de volatilidad en los frutos, es decir, la atracción de picudos machos y hembras aumenta a medida que se incrementa la madurez que provoca cambios en la producción y emisión de volátiles en los frutos de guanábana (Figura 4D y 4E). En ambos casos los modelos fueron bien validados, para machos con $Q^2 = 0.70$ y $p < 0.01$ y para

hembras $Q^2 = 0.75$ y $p < 0.01$. Interesantemente, el valor de Q^2 para la atracción de las hembras fue mayor que el de los machos, lo que significa que, independientemente de las diferencias estadísticamente significativas, el aumento en el grado de elección de la guanábana por etapa de madurez y su correlación con la fluctuación volátil es linealmente más correlacionada en hembras que en machos. Es decir, la respuesta de las hembras a los volátiles de la planta huésped es más aguda que la de los picudos machos. Esto podría explicarse por el hecho de que las hembras usan volátiles de la planta huésped para fines diversos más que sólo alimentarse, por ejemplo, ovipositar (Honda, 1995).

El gráfico *VIPpred* mostró que el aumento del contenido de benzotiazol a través de la maduración de la guanábana se correlacionó con la preferencia del picudo de las anonáceas por frutos maduros. Aunado a esto, varios volátiles correlacionados con la etapa de madurez también están correlacionados con la atracción del picudo. Algunos ejemplos son cariofileno, (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, 4,4,5,7,8-pentametil dihidrocurmarina y β -elemeno. Compuestos como (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno y β -elemeno han sido reportados como volátiles importantes para la ubicación del huésped por el picudo del chile (*Anthonomus eugenii*) (Addesso *et al.*, 2011; Bautista-San Juan *et al.*, 2019), además del cariofileno como atrayente para el picudo del algodón (*Anthonomus grandis*) (Magalhães *et al.*, 2018). Así pues, la doble correlación de estos volátiles, tanto con madurez y atracción, refuerza la correlación entre grado de madurez frutal y el grado de preferencia por picudos a frutos más maduros. Por otro lado, la atracción también se correlacionó con volátiles específicos como 1,5-di-terc-butyl-3,3-dimetil-biciclo[3.1.0]hexan-2-ona, 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil éster ácido 2-metil-propanoico y 3,7-dimetildecano. Sin embargo, cabe recalcar que el benzotiazol fue el volátil más correlacionado con la atracción de los picudos de ambos sexos. Este volátil ha sido detectado en frutos de litchi, mango, guayaba, papaya, toronja, rambután, durian (Johnston *et al.*, 1980; Engel y Tressl 1983; Clery y Hammond, 2008; Ulrich y Wijaya 2010; Cheong *et al.*, 2011b; Ong *et al.*, 1998; Peng 2019) e incluso en la anonácea chirimoya (Idstein *et al.*, 1984). No obstante, el benzotiazol ha sido asociado únicamente a efectos antioxidantes (Dong *et al.*, 2019; Djuidje *et al.*, 2022). En este contexto, el valor de correlación alto del benzotiazol y la correlación más baja de otros compuestos sugieren por primera vez que el picudo de las anonáceas usa principalmente benzotiazol para ubicar a sus plantas hospedantes. No obstante, otros volátiles pueden ser

secundarios para la atracción principal del picudo o dan un reconocimiento de señal más específico.

CONCLUSIÓN GENERAL

La comunicación química entre especímenes del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris*) está mediada por una feromona de agregación (α -terpineol), la cual es potenciada por volátiles emitidos del fruto de su planta hospedante; dichos volátiles son simultáneamente usados como kairomona por *O. palmaris* para localizar a su hospedante.

Se determinó la presencia de alrededor de 129 compuestos volátiles de flores y frutos de guanábana con diferente estado de desarrollo. El benzotiazol, cariofileno, benzofenona y nerolidol destacaron por su correlación biológica. Son necesarios estudios adicionales de laboratorio y campo que puedan corroborar el efecto biológico de estos compuestos como kairomona, con potencial para el manejo de poblaciones del picudo de las anonáceas.

LITERATURA CITADA

- Addesso, K. M., McAuslane, H. J., & Alborn, H. T. (2011). Attraction of pepper weevil to volatiles from damaged pepper plants. *Entomologia experimentalis et applicata*, 138(1), 1-11.
- Ali, M. F., & Morgan, E. D. (1990). Chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. *Biological Reviews*, 65(3), 227-247.
- Alpizar D., Fallas M., Oehlschlager A. C., González L. M., Chinchilla C. M., & Bulgarelli J. (2002). Pheromone mass trapping of the West Indian sugarcane weevil and the American palm weevil (Coleoptera: Curculionidae) in palmito palm. *Florida Entomologist*, 85: 426-430.
- Andrés, A. J., & Andrés, H. L. (2011). Biología, Diversidad y uso sostenible de los recursos genéticos de Annonaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 141 p.
- Azuara-Domínguez, A., Terán, V.A.P., Soto, S.A., Aguilar, P.N., & Martínez, B.L. (2014). Evaluación del tipo de trampa, atrayente alimenticio y feromona de agregación en el trampeo del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal en Tamaulipas, México. *Entomotropica*, 29, 1-8.
- Badrie, N., & Schauss, A. G. (2010). Soursop (*Annona muricata* L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In *Bioactive foods in promoting health* (pp. 621-643). Academic Press.
- Bautista-Hernández, C.F., Cibrián-Tovar, J., Velázquez-González, J.C., & Rodríguez-Gómez, M.P. (2020). Evaluación en campo de atrayentes para la captura de *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Chilena de Entomología*, 46(2), 211-219.
- Bautista-San Juan, A., Cibrián-Tovar, J., López-Romero, R. M., Bautista-Martínez, N., & Gómez-Domínguez, N. S. (2019). Atracción de Adultos de *Anthonomus eugenii* (Cano) 1 a Mezclas de Compuestos Volátiles Sintéticos. *Southwestern Entomologist*, 44(3), 743-754.
- Beck, J.J., Torto, B., & Vannette, R.L. (2017a). Eavesdropping on plant-insect-microbe chemical communications in agricultural ecology: A virtual issue on semiochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(25), 5101-5103.
- Beck, J.J., & Vannette, R.L. (2017b). Harnessing insect-microbe chemical communications to control insect pests of agricultural systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(1), 23-28.
- Beran, F., Köllner, T.G., Gershenzon, J., & Tholl, D. (2019). Chemical convergence between plants and insects: Biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytologist*, 223(1), 52-67.

- Borden, J.H., Pureswaran, D.S., & Lafontaine, J.P. (2008). Synergistic blends of monoterpenes for aggregation pheromones of the mountain pine beetle (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(4), 1266-1275.
- Bruce, T.J.A., Wadhams, L.J., & Woodcock, C.M. (2005). Insect host location: A volatile situation. *Trends in plant science*, 10(6), 269-274.
- Castañeda, G. G. M. (2011). Ciclo de vida y hábitos del picudo de las Annonáceas *Optatus palmaris* Pascoe: observaciones en campo y laboratorio. Tesis. Universidad Tecnológica de la Costa. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 35 p.
- Castañeda-Vildózola, A., Morales-Trujillo, M.C., Franco-Mora, O., Valdez-Carrasco, J., & Mejía-Carranza, J. (2020). A new record of *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae) associated with *Annona* L. (Annonaceae) in the State of Mexico, Mexico. *Revista Chilena de Entomología*, 46, 397–400.
- Castañeda-Vildózola, A., Nava-Díaz, C., Hernández-Fuentes, L. M., Valdez-Carrasco, J., & ColungaTreviño B. (2009). New host record and geographical distribution of *Optatus palmaris* Pascoe 1889 (Coleoptera: Curculionidae) in México. *Acta Zoológica Mexicana*, 25(3): 663-666.
- CENIPALMA (Centro de Investigación en Palma de Aceite). (2017). Guía para la elaboración y ubicación de trampas para la captura de *Rhynchophorus palmarum* L. En línea: <http://www.cenipalma.org/sites/default/files/files/Cenipalma/guia-elaboracion-trampas-2017.pdf> Fecha de consulta 15 de junio de 2022.
- Cerdas, M. M., Umana, G., & Castro, J. J. (2005). Manual de manejo poscosecha de anona (*Annona cherimola* Mill). San José, Costa Rica, MAG. 67 p. In: Castro RJJ. 2007. Cultivo de la Anona (*Annona cherimola* Mill). Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa.
- Cham, A. K., Luna, E. G.; Robles, B. A.; Ríos, V. C.; Coronado, B. J. M., & Cambero, C. O. J. (2019). Insects associated with the soursop (*Annona muricata* L.) crop in Nayarit, México. *Florida Entomologist*, 102(2):359-365.
- Champion, G.C. (1907). Biologia Centrali-Americana. Insecta. Coleoptera, Rhynchophora Part 5; Curculionidae. Curculioninae: Porter, London, Volume 4, p. 513.
- Charmillot, P. J., Hofer, D., & Pasquier, D. (2000) Attract and kill: a new method for control of the codling moth *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94(2): 211-216.
- Cheong, K. W., Tan, C. P., Mirhosseini, H., Hamid, N. S. A., Osman, A., & Basri, M. (2010). Equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid-phase microextraction. *Food Research International*, 43(5), 1267-1276.
- Cheong, K. W., Tan, C. P., Mirhosseini, H., Chin, S. T., Man, Y. B. C., Hamid, N. S. A., ... & Basri, M. (2011a). Optimization of equilibrium headspace analysis of volatile flavor

- compounds of Malaysian soursop (*Annona muricata*): Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC× GC-TOFMS). *Food Chemistry*, 125(4), 1481-1489.
- Cheong, M. W., Liu, S. Q., Yeo, J., Chionh, H. K., Pramudya, K., Curran, P., & Yu, B. (2011b). Identification of aroma-active compounds in Malaysian pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel by gas chromatography-olfactometry. *Journal of Essential Oil Research*, 23(6), 34-42.
- Clery, R. A., & Hammond, C. J. (2008). New sulfur components of pink guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 315-317.
- Coelho, L.M.A., & Alves, R.E. (2011). Soursop (*Annona muricata* L.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Mangosteen to White Sapote*; Yahia, M.E., Ed.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK, Volume 4, pp. 363–391.
- Colunga, T. B., Reyes, T. B., & Salazar, T.J. C. (2006). Efecto de repelente de aceites esenciales sobre los barrenadores de fruto del chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). In: Memoria del 1^{er} Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Productoras y Productores Experimentadores y de Investigadores en la agricultura orgánica. Hotel Las Mercedes, Managua, Nicaragua, 26 al d9 de septiembre. Pp. 121-123.
- Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 375-400.
- Corrales, M. G. J. (1995). Observations on the biology and behavioral food of *Optatus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) in *Annona cherimola* Mill. In: Resúmenes de 2^{do}. Congreso Centroamericano y del Caribe y 3^{ro}. Costarricense de Entomología. Editorial San José ASENCO. San José, Costa Rica, 17-21 Julio. P. 6.
- Coss, A. A., Bartelt, R. J., Zilkowski, B. W., Bean, D. W., & Petroski, R. J. (2005). The aggregation pheromone of *Diorhabda elongata*, a biological control agent of saltcedar (*Tamarix* spp.): identification of two behaviorally active components. *Journal of Chemical Ecology*, 31(3): 657-670.
- Cross, J.V., Hall, D.R., Innocenzi, P.J., Hesketh, H., Jay, C.N., & Burgess, C.M. (2006). Exploiting the aggregation pheromone of strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* (Coleoptera: Curculionidae): Part 2. Pest monitoring and control. *Crop Protection*, 25(2): 155-166.
- Cruz, F.J.J., Figueroa, C.P., Alcántara, J.J.A., López, M.V., & Silva, G.F. (2019). Vegetal synergists for trapping the adult of *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, in pheromone baited traps, in *Agave angustifolia* Haw, in Morelos, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 35: 1-9.
- Dicke, M., & Sabelis, M. W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional ecology*, 131-139.

- Dickens, J.C. (1989). Green leaf volatiles enhance aggregation pheromone of boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 52: 191–203.
- Djuidje, E. N., Barbari, R., Baldisserotto, A., Durini, E., Sciabica, S., Balzarini, J., ... & Manfredini, S. (2022). Benzothiazole derivatives as multifunctional antioxidant agents for skin damage: Structure–activity relationship of a scaffold bearing a five-membered ring system. *Antioxidants*, 11(2), 407.
- Dong, B., Tang, H., Zhu, D., Yao, Q., Han, H., He, K., & Ding, X. (2021). Benzothiazole Treatment Regulates the Reactive Oxygen Species Metabolism and Phenylpropanoid Pathway of *Rosa roxburghii* Fruit to Delay Senescence During Low Temperature Storage. *Frontiers in plant science*, 12: 753261.
- Downham, M. C. A., McVeigh, L. J., & Moawad, G. M. (1995). Field investigation of an attracticide control technique using the sex pheromone of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of entomological research*, 85(4): 463-472.
- Ekundayo, O. (1989). A review of the volatiles of the Annonaceae. *Journal of Essential Oil Research*, 1(5), 223-245.
- El-Sayed, A. M., Suckling, D. M., Wearing, C. H., & Byers, J. A. (2006). Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. *Journal of Economic Entomology*, 99(5): 1550-1564.
- Eller, F. J., Bartelt, R. J., Shasha, B. S., Schuster, D. J., Riley, D. G., Stansly, P. A., ..., & Sutherland, C. A. (1994). Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): Identification and field activity. *Journal of Chemical Ecology*, 20(7), 1537-1555.
- EI-Shafie H. A. F., & Romeno F. J. (2017). Chapter 1: Semiochemical and Their Potential Use in Pest Management. In: V.D.C. Shields (Ed.). *Biological Control of Pest and Vector Insects*. IntechOpen. Fisher College of Science and Mathematics, Towson University.
- Engel, K. H., & Tressl, R. (1983). Studies on the volatile components of two mango varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 796-801.
- Epsky N.D., Morrill W.L., & Mankin R.W. (2008). Traps for Capturing Insects. En Capinera J.L. (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht. pp 3887–3901.
- Erasto, P., & Viljoen, A.M. (2008). Limonene—A Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Natural Product Communications*, 3(7), 1193–1202.
- Erb, M., & Robert, C.A.M. (2016). Sequestration of plant secondary metabolites by insect herbivores: Molecular mechanisms and ecological consequences. *Current Opinion in Insect Science*, 14, 8-11.
- Esparza, D.G., Olguin, A., Carta, L. K., Skantar, A. M., & Villanueva, R. T. (2013). Detection of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) and identification of associated nematodes in South Texas. *Florida Entomologist*, 96(4), 1513-1521.

- Figueroa-Castro P., Rojas, J. C., López-Martínez, V., González-Hernández, H., & Pérez-Figueroa, M. (2017). ¿Funciona el trapeo masivo para la reducción de poblaciones de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal en maguey espadín? Primer Congreso Nacional de Agave- Mezcal. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca. Pág. 63.
- Foster and, S. P., & Harris, M. O. (1997). Behavioral manipulation methods for insect pest-management. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 123-146.
- Galvao, S. K. L. D., M. D. S., Jesus, M. S. D., Nogueira, J. P., & Narain, N. (2017). HS-SPME optimization and extraction of volatile compounds from soursop (*Annona muricata* L.) pulp with emphasis on their characteristic impact compounds. *Food Science and Technology*, 37, 250-260.
- Garagounis, C., Delkis, N., & Papadopoulou, K. K. (2021). Unraveling the roles of plant specialized metabolites: using synthetic biology to design molecular biosensors. *New Phytologist*, 231(4), 1338-1352.
- George A.P., & Nissen R.J. (2003). Annonaceous Fruits. Editor(s): Benjamin Caballero. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, (Second Edition), Academic Press, Pages 239-243. Doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00048-1.
- González-Ritzel, A., Altesor, P., Sellanes, C., & Rossini, C. (2012). Capítulo 14. Aplicación de Feromonas Sexuales en el Manejo de Lepidópteros Plaga de Cultivos Agrícolas. In: .C. Rojas, E.A. Malo (Eds.). 2012. Temas Selectos en Ecología Química de Insectos. El Colegio de la Frontera Sur. México. Pp.343-360
- Guimarães, J. T., Almeida, P. P., Brito, M. L., Cruz, B. O., Costa, N. S., Ito, R. V. A., ... & Cruz, A. G. (2022). In vivo functional and health benefits of a prebiotic soursop whey beverage processed by high-intensity ultrasound: study with healthy Wistar rats. *Food Chemistry*, 380: 132193.
- Haenniger, S., Goergen, G., Akinbuluma, M. D., Kunert, M., Heckel, D. G., & Unbehend, M. (2020). Sexual communication of *Spodoptera frugiperda* from West Africa: Adaptation of an invasive species and implications for pest management. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
- Hallett, R. H., Oehlschlager, A. C., & Borden, J. H. (1999). Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Pest Management*, 45(3), 231-237.
- Hardee, D. D., McKibben, G. H., Rummel, D. R., Huddleston, P. M., & Coppedge, J. R. (1974). Response of boll weevils to component ratios and doses of the pheromone, grandlure. *Environmental Entomology*, 3(1), 135-138.
- Hartsel, J.A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). *Cannabis sativa* and Hemp. In Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity, 1st ed.; Gupta, R., Ed.; Academic Press: Princeton, NJ, USA, Volume 1, pp. 735-754.

- Hedin, P. A., Dollar, D. A., Collins, J. K., Dubois, J. G., Mulder, P. G., Hedger, G. H., ... , & Eikenbary, R. D. (1997). Identification of male pecan weevil pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, 23(4): 965-977.
- Hernández-Fuentes, L. M., Nolasco-González, Y., Orozco-Santos, M., & Montalvo-Gonzalez, E. (2021). Toxicidad de insecticidas contra (*Optatus palmaris* Pascoe) en guanábana. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(1), 49-60.
- Hernández-Fuentes, L. M., Virgen-Hernández, E. D., & López-Martínez, V. (2018). Eficacia biológica de insecticidas en el picudo del fruto, *Optatus palmaris* Pascoe, 1989 (Coleoptera: Curculionidae). *Entomología Mexicana*, 5: 348- 353.
- Hernández-Fuentes, L.M.; Castañeda, V.A.; & Urías, L.M.A. (2017) Weevil borers in tropical fruit crops: Importance, biology and management. In *Insect Physiology and Ecology*, 2nd ed.; Shields, V.D.C., Ed.; *IntechOpen*: Rijeka, Croatia, Volume 3, pp. 154–196.
- Hernández-Fuentes, L.M., Andrés-Agustín, J., Espíndola-Barquera, M. D. C., Castañeda-Vildózola, A., Ballesteros-Patrón, G, & Vera-Sánchez, K. S. (2016). Recursos genéticos de Anonáceas (Annonaceae) en México: situación actual y perspectivas. *Agroproductividad*, 9 (4): 3-8.
- Hernández-Fuentes, L. M, Gómez, J. R, & Andrés, A. J. (2013). Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo de guanábana. Libro Técnico Núm. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit. México. 2013. 87 p.
- Hernández-Fuentes, L. M., Bautista-Martínez, N., Carrillo-Sánchez, J. L., Sánchez Arroyo, H., Urías-López, M. A., & Salas Araiza, M. D. (2008). Control del barrenador de las semillas, *Bephratelloides cubensis* Ashmead (Hymenoptera: Eurytomidae) en guanábana, *Annona muricata* L. (Annonales: Annonaceae). *Acta Zoológica Mexicana*, 24(1), 199-206.
- Hernández-Vidal, L., López, M. H., Vidal, M. N. A., Ruiz, B. R., Castillo, R. D. G., & Chiquito, C. R. G. (2014). La situación de las Annonaceae en México: Principales plagas, enfermedades y su control. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36: 44-54.
- Hespenheide, H.A. (2001). Beetles. In *Encyclopedia of Biodiversity*, 1st ed.; Levin, S.A., Ed.; Academic Press: Princeton, NJ, USA, Volume 1, pp. 351–358.
- Honda, K. (1995). Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 30(1): 1-23.
- Idstein, H., Herres, W., & Schreier, P. (1984). High-resolution gas chromatography-mass spectrometry and-Fourier transform infrared analysis of cherimoya (*Annona cherimolia*, Mill.) volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(2): 383-389.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Jiménez-Ruíz, E. I., Sumaya-Martínez, M. T., & Bello-Lara, J. E. (2017). Tópicos del manejo poscosecha del

- fruto de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(5): 1155-1167.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Sumaya-Martínez, M. T., & Bello-Lara, J. E. (2016). Caracterización de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(6), 1261-1270.
- Johnston, J. C., Welch, R. C., & Hunter, G. L. K. (1980). Volatile constituents of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(4): 859-861.
- Karlson, P., & Lüscher, M. (1959). Pheromones' a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 155-156. In: Dicke M., Sabelis M. W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather origin of compounds. *Functional Ecology*, 2: 131-139.
- Kean, J. M., & Suckling, D. M. (2005). Estimating the probability of eradication of painted apple moth from Auckland. *New Zealand Plant Protection*, 58, 7-11.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J. G., & Hanks, L. M. (2008). A male-produced aggregation pheromone blend consisting of alkanediols, terpenoids, and an aromatic alcohol from the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(3), 408-417.
- Lako, J., Trenerry, V. C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., & Premier, R. (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101(4): 1727-1741.
- Landolt, P. J., & Phillips, T. W. (1997). Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 371-391.
- Larsson, M. C. (2016). Pheromones and other semiochemicals for monitoring rare and endangered species. *Journal of Chemical Ecology*, 42(9), 853-868.
- Leskey, T. C., Piñero, J. C., & Prokopy, R. J. (2008). Odor-baited trap trees: a novel management tool for plum curculio *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(4), 1302-1309.
- Magalhães, D. M., Borges, M., Laumann, R. A., Woodcock, C. M., Withall, D. M., Pickett, J. A., ... & Blassioli-Moraes, M. C. (2018). Identification of volatile compounds involved in host location by *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6: 98.
- Maldonado-Jiménez, E., Hernández, F. L. M., Luna, E. G., Gómez, A. J. R., Flores, C. R. J., & Santos, M. O. (2014). Bioecology of *Optatus palmaris* Pascoe (Coleoptera: Curculionidae) in *Annona muricata* L. *Southwestern Entomologist*, 39(4), 773-782.
- Maldonado-Jiménez, E. (2013). Bioecología del picudo de las anonáceas (*Optatus palmaris* Pascoe) en el cultivo de guanábana (*Annona muricata* L.). Tesis de Maestría en Ciencias

- Biológico Agropecuarias. Universidad Autónoma de Nayarit. Xalisco, Nayarit, México. 55 pp.
- Maldonado-Jiménez E, Hernández- Fuentes LM, Luna-Esquivel G, Gómez-Aguilar Roberto. (2013). Ciclo de vida de *Optatus palmaris* (Curculionidae: Baridinae) Pascoe, en laboratorio. En línea: <http://www.entomologia.socmexent.org/revista/2013/EA/1181-1185.pdf> Fecha de consulta: 28 de mayo de 2021.
- Marquez-Cardozo, C. J., Villacorta Lozano, V., Yepes Betancur, D. P., Ciro Velásquez, H. J., & Cartagena Valenzuela, J. R. (2012). Physiological and physico-chemical characterization of the soursop fruit (*Annona muricata* L. cv. Elita). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1): 6477-6486.
- Millar, J. G., McElfresh, J. S., Romero, C., Vila, M., Marí-Mena, N., & Lopez-Vaamonde, C. (2010). Identification of the sex pheromone of a protected species, the Spanish moon moth *Graellsia isabellae*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(9), 923-932.
- Mitchell, R. F., Ray, A. M., Hanks, L. M., & Millar, J. G. (2018). The common natural products (S)- α -terpineol and (E)-2-hexenol are important pheromone components of *Megacyllene antennata* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environmental Entomology*, 47(6): 1547-1552.
- Morrone, J. J. (2014). Biodiversidad de Curculionoidea (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 312-324.
- Müller, M., & Buchbauer, G. (2011). Essential oil components as pheromones. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(6), 357-377.
- Nandagopal, V., Prakash, A., & Rao, J. (2008). Know the pheromones: Basics and its application. *J. Biopestic*, 1, 210-215.
- Nordlund, D.A. & Lewis W.J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraespecific and interespecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2: 211-220.
- Oberprieler, R. G., Marvaldi, A. E., & Anderson, R. S. (2007). Weevils, weevils, weevils everywhere. *Zootaxa*, 1668(1): 491-520.
- Ocan, D., Mukasa, H. H., Rubaihayo, P. R., Tinzaara, W., & Blomme, G. (2008). Effects of banana weevil damage on plant growth and yield of East African Musa genotypes. *Journal of Applied Biosciences*, 9(2), 407-415.
- Oehlschlager, A. C., Chinchilla, C., Castillo, G., & Gonzalez, L. (2002). Control of red ring disease by mass trapping of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Florida Entomologist*, 58 (3): 507-513.
- Oehlschlager, A. C., Prior, R. N. B., Perez, A. L., Gries, R., Gries, G., Pierce, H. D., & Laup, S. (1995). Structure, chirality, and field testing of a male-produced aggregation pheromone of Asian palm weevil *Rhynchophorus bilineatus* (Montr.)(Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Chemical Ecology*, 21(10), 1619-1629.

- Oehlschlager, A. C., Chinchilla, C., & González, L. (1993a). Optimization of a pheromone based trap for the American palm weevil *Rhynchophorus bilineatus*. Proceedings, International Oil Palm Congress, 20-25 september 1993. Palm Oil Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur.
- Oehlschlager, A. C., Chinchilla, C. M., Gonzalez, L. M., Jiron, L. F., Mexzon, R., & Morgan, B. (1993b). Development of a pheromone-based trapping system for *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 86(5), 1381-1392.
- Ojeda, G., Coronado, J., Nava, R., Sulbarán, B., Araujo, D., & Cabrera, L. (2007). Caracterización fisicoquímica de la pulpa de la guanábana (*Annona muricata*) cultivada en el occidente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(2): 151-160.
- Ong, P. K., Acree, T. E., & Lavin, E. H. (1998). Characterization of volatiles in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2): 611-615.
- Osorio, O. R., Cibrián, T. J., López, C. J., Cortéz, M. H., & Cibrián, T.D. (2003). Exploration of factors to increase the effectiveness of capture of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Folia Entomológica Mexicana.*, 42: 27-36.
- Ordóñez-Reséndiz, M. M., Muñoz-Vélez, R., & Gama-Rojas, F. (2008). Curculiónidos (Coleópteros). In: Catálogo taxonómico de especies de México. Capital natural de México, vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad, S. Ocegueda y J. Llorente-Bousquets (coords.). CONABIO, México, D. F. CD1.
- Padmanabhan P., & Paliyath G. (2016). Annonaceous Fruits. Editor(s): Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, Fidel Toldrá. Academic Press. Pp. 169-173.
- Peng, J. S. M. (2019). Volatile esters and sulfur compounds in durians & a suggested approach to enhancing economic value of durians. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2): 5-15.
- Pennisi, A. M., & Agosteo, G. E. (1994). Foliar alterations by *Colleotrichum gloeosporioides* on *Annona*. *Informatore Fitopatologico*, 44: 63-64.
- Pineda-Ríos, J. M., Cibrián-Tovar, J., Hernández-Fuentes, L. M., López-Romero, R. M., Soto-Rojas, L., Romero-Nápoles, J., ... & Salomé-Abarca, L. F. (2021). α -terpineol: An Aggregation Pheromone in *Optatus palmaris* (Coleoptera: Curculionidae) (Pascoe, 1889) Enhanced by Its Host-Plant Volatiles. *Molecules*, 26(10): 2861.
- Pino, J. A., Agüero, J., & Marbot, R. (2001). Volatile components of soursop (*Annona muricata* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 13(2): 140-141.
- Piñero, J. C., & Ruiz-Montiel, C. (2012). Ecología química y Manejo de picudos (Coleoptera: Curculionidae) de Importancia Económica. In: Rojas JC, Malo EA. 2012. Temas selectos en Ecología Química de Insectos. 446 p.

- Piñero, J. C., & Prokopy, R. J. (2003). Field evaluation of plant odor and pheromonal combinations for attracting plum curculios. *Journal of Chemical Ecology*, 29(12), 2735-2748.
- Piñero, J. C., Wright, S. E., & Prokopy, R. J. (2001). Response of plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) to odor-baited traps near woods. *Journal of Economic Entomology*, 94(6), 1386-1397.
- Reddy, G. V., & Guerrero, A. (2004). Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science*, 9(5), 253-261.
- Servin V. R., García-Hernández, J., Tejas-Romero, A., Martínez-Carrillo, J. L., & Toapanta, M. A. (2008). Susceptibility of pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) (Coleoptera: Curculionidae) to seven insecticides in rural areas of Baja California Sur, Mexico. *Acta zoológica mexicana*, 24(3), 45-54.
- Sharma, A., Sandhi, R. K., & Reddy, G. V. (2019). A review of interactions between insect biological control agents and semiochemicals. *Insects*, 10(12), 439.
- Showler, A. T. (2006). Boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) damage to cotton bolls under standard and proactive spraying. *Journal of Economic Entomology*, 99(4), 1251-1257.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2019). Anuario estadístico de la producción agrícola. Producción agrícola de guanábana en 2019. En línea: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Fecha de consulta 08 de marzo de 2022.
- Solís-Fuentes, J. A., Amador-Hernández, C., Hernández-Medel, M. R., & Durán-de-Bazúa, M. C. (2010). Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de “almendra” de guanábana (*Annona muricata*, L). *Grasas y Aceites*, 61(1): 58-66.
- Stelinski, L. L., Oakleaf, R., & Rodriguez-Saona, C. (2007). Oviposition-detering pheromone deposited on blueberry fruit by the parasitic wasp, *Diachasma alloeum*. *Behaviour*, 144(4), 429-446.
- Tewari, S., Leskey, T.C., Nielsen, A.L., Piñero, J.C., & Rodriguez, S.C.R. (2014). Integrated pest management: Current concepts and ecological perspective. In *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, 1st ed.; Abrol, D.P., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, pp. 141–168.
- Tinzaara, W., Dicke, M., van Huis, A., & Gold, C. S. (2002). Use of infochemicals in pest management with special reference to the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 22(4): 241-261.
- Ulrich, D., & Wijaya, C. H. (2010). Volatile patterns of different papaya (*Carica papaya* L.) varieties. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83: 128-132.
- Vanhove, W., Feng, Y., Yu, M., Hafiz, I. O., Vanhoudt, N., Van Damme, P. L., & Zhang, A. (2020). Evaluation of attract-and-kill strategy for management of cocoa pod borer,

- Conopomorpha cramerella*, in Malaysia cocoa plantation. *International Journal of Pest Management*, 66(2), 155-162.
- Wang, H.M., Bai, P.H., Zhang, J., Zhang, X.M., Hui, Q., Zheng, H.X., & Zhang, X.H. (2020). Attraction of bruchid beetles *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) to host plant volatiles. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(12), 3035-3044.
- Webster, B. & Cardé, R. (2016). Use of habitat odour by host-seeking insects. *Biological Review*, 92: 1241–1249.
- Wongkaew, M., Sangta, J., Chansakaow, S., Jantanasakulwong, K., Rachtanapun, P., & Sommano, S. R. (2021). Volatile profiles from over-ripe purée of Thai mango varieties and their physiochemical properties during heat processing. *Plos one*, 16(3): e0248657.
- Zarate-Reyes, R. D. (1995). Diseases of the soursop, *Annona muricata* L., in Colombia: characteristics, management and control. *Fitopatología Colombiana*, 19: 68–74.

ANEXO 1

LINEALIDAD, LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ) PARA LA DETERMINACIÓN DE α -TERPINEOL

INTRODUCCIÓN

Cada año se realizan millones de análisis de cualquier tipo en todo el mundo, y con base en ellos se toman decisiones. La validación del método permite demostrar que un método es "adecuado para el propósito" (Bernal, 2014), por lo que debe ser lo suficientemente fiable como para que cualquier decisión pueda tomarse con confianza. Por lo tanto, se debe validar el método y estimar la incertidumbre sobre el resultado, con un determinado nivel de confianza (Bernal, 2014; Mohamad, 2018).

La validación del método consiste en una serie de pruebas que determinan los supuestos en los que se basa, establecen el método analítico y documentan las características de rendimiento de éste, demostrando que el método se ajusta a un propósito analítico particular (U. S. FDA, 2000). Los parámetros para la validación de los métodos analíticos son: reproducibilidad, exactitud, repetibilidad, selectividad, especificidad, linealidad, rango, límite de cuantificación, límite de detección, sensibilidad y robustez (Bernal, 2014).

Realizar la validación completa de un método implica una gran cantidad de tiempo. El objetivo de este Anexo es proporcionar información detallada acerca de los procedimientos realizados para la determinación de la linealidad, el límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) del α -terpineol, componente principal de la feromona de agregación del picudo de las anonáceas, *Optatus palmaris* (Pascoe, 1889) analizado en esta investigación a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Los tres parámetros anteriores se emplean para determinar la concentración más pequeña de un compuesto que puede ser confiablemente medido por un procedimiento analítico (ICH, 2005; Mohamad, 2018).

A continuación, se presentan las definiciones establecidas por el Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (ICH, por sus siglas en inglés) (2005) y se describen los procedimientos para la determinación de la linealidad, LOD y LOQ de α -terpineol.

Límite de detección (LOD): cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto.

Límite de Cuantificación (LOQ): cantidad más baja de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas.

Linealidad: capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR DE α - TERPINEOL

Se adquirió un estándar de α -terpineol (97%) de Acros Organics (Thermo Fisher Scientifics). Se preparó una disolución patrón de $100\ 000\ \text{ng}\ \mu\text{L}^{-1}$ de α -terpineol, para lo cual se pesó 0.1030 g en un vial de 1.5 mL en una balanza Ohaus (0.1 mg de sensibilidad). Se diluyó con 1 mL de hexano y se homogeneizó inmediatamente. A partir de este estándar se realizaron diluciones para determinar los tres parámetros mencionados.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES

En el Cuadro 1 se muestran los volúmenes tanto del estándar como del disolvente para obtener las diluciones propuestas.

Cuadro 1. Preparación de diluciones para determinar la cantidad mínima detectable de α -terpineol con base en la relación señal/ruido.

Partir de dilución ng μl⁻¹	Volúmen de α-terpineol a tomar μl	Volúmen de hexano a agregar μl	Conc. aprox. a obtener ng μl⁻¹
100,000	100	900	10,000
10,000	100	900	1,000
1,000	100	900	100
100	100	900	10
10	500	500	5
5	500	500	2.5
2.5	500	500	1.25
1.25	500	500	0.625
0.625	500	500	0.312
0.312	500	500	0.015
0.015	500	500	0.078
0.078	500	500	0.039
0.039	500	500	0.019
0.019	500	500	0.009

Preparación de diluciones peso/peso

En todo el proceso analítico con base en las buenas prácticas de laboratorio es necesario el uso de equipo de protección (bata, lentes de seguridad, guantes y mascarilla). Es deseable verificar con un marco de pesas que la balanza está trabajando bajo especificaciones. Todos los datos de peso se registraron en la bitácora del laboratorio y posteriormente en la hoja de cálculo. A manera de ejemplo se indica a continuación el procedimiento para preparar la primera disolución.

1. Verificar que el nivel de burbuja de la balanza esté en el centro para tener equilibrada la misma. Encender la balanza y esperar 30 minutos para el equipo se estabilice. Asegurarse que la balanza marque ceros, antes de pesar.



2. Colocar un vial nuevo de 1.8 mL (con tapa y etiquetado) sobre la balanza para registrar su peso.



3. Con una micropipeta colocar en el vial la cantidad de hexano correspondiente a la dilución.



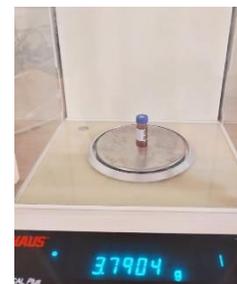
4. Cerrar el vial y colocar nuevamente sobre la balanza para obtener el peso del vial + disolvente.



5. Con una punta nueva para micropipeta (diferente a la usada para el disolvente), tomar la cantidad correspondiente de la disolución patrón del estándar analítico y adicionar al vial donde se está preparando la nueva dilución.



6. Cerrar el vial y colocar sobre la balanza analítica para obtener el peso del vial + disolvente + estándar. Inmediatamente homogenizar la disolución en un vórtex.



1. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las diluciones fueron inyectadas en un sistema CG-EM equipado con una columna HP-5MS (30 m × 0,250 mm DI y 0,25 μm , J&W Science, Folsom, CA, EE. UU.) Las condiciones de análisis se encuentran en el apartado 1.4.3. Las inyecciones en el cromatógrafo se iniciaron por las concentraciones más bajas (0.009, 0.019 y 0.039 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$).

2. DETERMINACIÓN DE LIMITE DE DETECCIÓN CON BASE EN LA RELACIÓN SEÑAL / RUIDO

De acuerdo con el ICH (2005), la determinación del LOD, con base en la relación señal/ruido entre 2:1 o 3:1 es considerada aceptable. Este parámetro se realiza comparando las señales medidas de muestras con concentraciones bajas conocidas de analito, con las de muestras sin el compuesto y establecer la concentración mínima a la que puede detectarse de forma fiable el analito.

Con base en los resultados obtenidos de los análisis de CG-EM en la Figura 1, el único pico que pudo ser integrado e identificado como α -terpineol fue el correspondiente a 0.039 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. La señal generada por dicho pico era al menos dos veces superior a la del ruido, por lo que dicha concentración fue determinada (de manera visual) como el LOD. En los cromatogramas de

0.009 y 0.019 ng μL^{-1} se observaba un pico, que no fue identificado como α -terpineol, ni pudo ser integrado a diferencia de la concentración de 0.039 ng μL^{-1} a un tiempo de retención de 10.39 min (Figura 2).

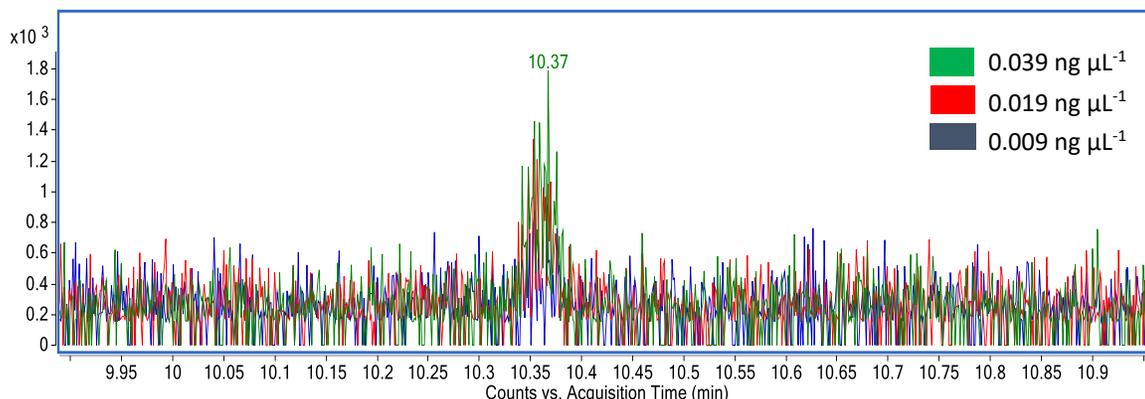


Figura 1. Sobreposición de cromatogramas de concentraciones bajas de α -terpineol para la determinación visual del límite de detección (LOD) con base en la relación señal/ruido.

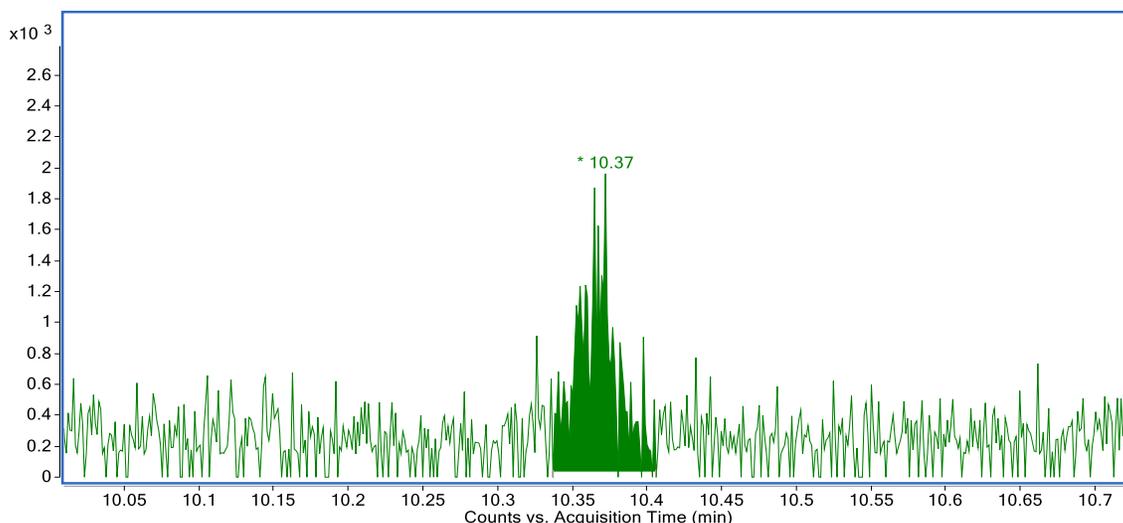


Figura 2. Integración manual del α -terpineol de 0.039 ng μL^{-1} (área = 2568).

3. PREPARACIÓN DE ESTANDARES PARA REALIZAR UNA CURVA DE CALIBRACION PESO/PESO

Con base en los resultados anteriores obtenidos, para determinar matemáticamente la linealidad, el LOD y el LOQ se prepararon diluciones para elaborar una curva de calibración a través de la cual pudieran determinarse dichos parámetros de manera confiable.

A partir de la solución madre de 100 000 ng μL^{-1} se prepararon las diluciones con los cálculos mostrados en el Cuadro 2, los cuales indican los volúmenes del estándar y del disolvente.

Cuadro 2. Preparación de diluciones para la elaboración de la curva de calibración de 15 puntos.

Partir de dilución ng μl^{-1}	Volúmen de α- terpineol a tomar μl	Volúmen de hexano a agregar μl	Conc. aprox. a obtener ng μl^{-1}
100,000	100	900	10,000
10,00	100	900	1,000
1,000	640	360	640
640	500	500	320
320	500	500	160
160	500	500	80
80	500	500	40
40	500	500	20
20	500	500	10
10	500	500	5
5	500	500	2.500
2.500	500	500	1.250
1.250	500	500	0.625
0.625	500	500	0.312
0.312	500	500	0.015
0.015	500	500	0.078
0.078	500	500	0.039

Con base en los pesos registrados durante la preparación de las diluciones se determinó la concentración final de las mismas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Pesos registrados de cada una de las diluciones de la curva de calibración.

Std conc. aprox. ng μL^{-1}	Pv	Pv + Dsv	Pv + Dsv + Std	Ci ng μL^{-1}	Pi	Pf	Cf= Ci*Pi/Pf ng μL^{-1}
		g			g		
10000	2.454	3.047	3.113	100000	0.066	0.659	10097
1000	2.502	3.084	3.147	10097	0.062	0.645	979.810
640	2.516	2.750	3.168	979.810	0.417	0.652	627.530
320	2.520	2.843	3.165	627.530	0.321	0.644	313.130
160	2.508	2.831	3.158	313.130	0.326	0.649	157.384
80	2.469	2.791	3.116	157.380	0.325	0.647	79.045
40	2.469	2.785	3.109	79.045	0.324	0.640	40.066
20	2.487	2.808	3.132	40.066	0.323	0.644	20.126
10	2.529	2.848	3.173	20.126	0.324	0.643	10.162
5	2.470	2.789	3.114	10.162	0.325	0.643	5.135
2.500	2.492	2.813	3.135	5.135	0.321	0.643	2.568
1.250	2.455	2.778	3.103	2.568	0.325	0.648	1.288
0.625	2.492	2.807	3.133	1.288	0.325	0.640	0.654
0.312	2.519	2.830	3.155	0.6549	0.324	0.636	0.334
0.156	2.516	2.644	2.783	0.3345	0.138	0.267	0.173
0.078	2.470	2.779	3.105	0.1695	0.325	0.634	0.087
0.039	2.452	2.760	3.085	0.087	0.324	0.633	0.044

Std = estándar, Pv = peso del vial, Dsv = disolvente, Ci = concentración inicial, Pi = peso inicial, Pf = peso final, Cf= concentración final.

Los siguientes cálculos muestran a manera de ejemplo el cálculo para el estándar con una concentración aproximada de 160 ng μL^{-1} , sin embargo, cabe aclarar que todos los cálculos fueron realizados en una hoja de cálculo de Excel.

1. Cálculo de peso inicial:

$$\begin{aligned}
 \text{pi} &= (\text{Pv} + \text{Dsv} + \text{Std}) - (\text{Pv} + \text{Dsv}) \\
 &= (3.1582 \text{ g}) - (2.8317 \text{ g}) \\
 &= 0.3265 \text{ g}
 \end{aligned}$$

2. Cálculo de Peso final:

$$\begin{aligned} p_i &= (P_v + D_{sv} + Std) - (P_v) \\ &= (3.1582 \text{ g}) - (2.5086 \text{ g}) \end{aligned}$$

3. Cálculo de concentración final:

$$\begin{aligned} C_f &= C_i * P_i / P_f \\ &= (313.1310392) (0.3265) / 0.6496 \\ &= 157.3849 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1} \end{aligned}$$

4. ANÁLISIS POR CG-EM PARA CADA CONCENTRACIÓN

Se inyectó 1 μL de cada una de las concentraciones preparadas en orden creciente, iniciando por la concentración más baja ($0.044 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) y terminando con $627.52 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Posterior a la inyección, la jeringa fue lavada 60 veces con una mezcla 50:50 de hexano: diclorometano y previo a la siguiente inyección se inyectó 1 μL de hexano para verificar que todo el analito eluyó de la columna.

En la Figura 3 se muestra una sobreposición de los cromatogramas obtenidos a partir del análisis por CG-EM, donde se observa el aumento gradual proporcional a la concentración.

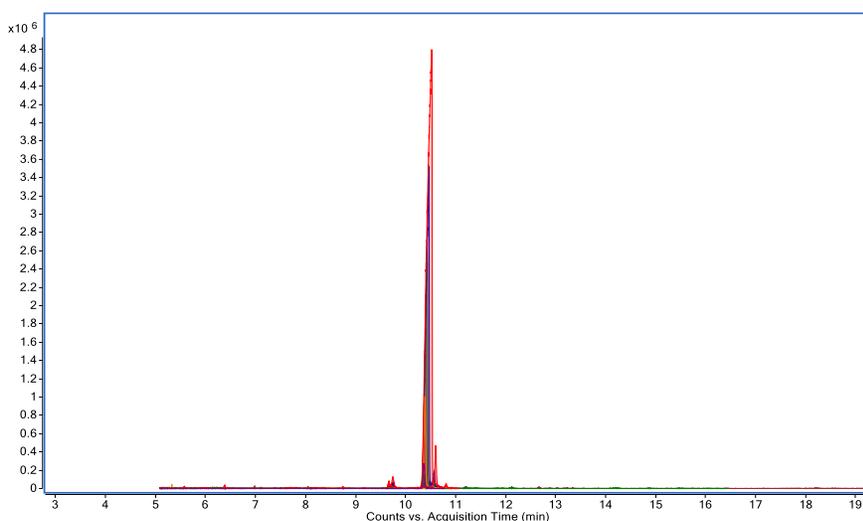


Figura 3. Sobreposición de cromatogramas de 0.044 a $627.53 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de α -terpineol.

De manera individual cada pico fue integrado de manera manual en el software MassHunter Workstation de Agilent a fin de obtener el área bajo la curva correspondiente. La Figura 4 es un ejemplo de ello. Las áreas para cada una de las concentraciones, se presentan en el Cuadro 4.

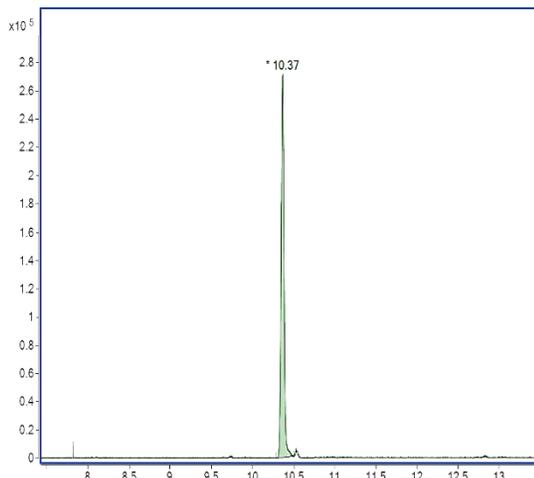


Figura 4. Integración de α -terpineol, de 10.16 ng μL^{-1} .

Cuadro 4. Áreas de α -terpineol, para la curva de calibración.

Concentración ng μl^{-1}	Área
0.044	2546
0.087	5196
0.173	12005
0.334	18462
0.654	38151
1.288	85951
2.568	161839
5.135	366609
10.161	688714
20.126	1587585
40.065	2914233
79.044	5691411
157.385	10109077
313.131	16581337
627.527	35594056

5. DETERMINACION DE LA LINEALIDAD DE α - TERPINEOL

Una vez que la linealidad puede evaluarse mediante la inspección visual de un gráfico de señales en función de la concentración del analito (ICH, 2005). Los resultados de la prueba deben ser evaluados por métodos estadísticos apropiados. Así se debe calcular el coeficiente de correlación r , la intersección con el eje y , la pendiente de la línea de regresión y la suma de cuadrados residual. Además, debe incluirse una gráfica de los datos y un análisis de la desviación de los puntos de datos reales de la línea de regresión. Con base en lo anterior, para determinar la linealidad del α -terpineol se hizo una regresión lineal y se obtuvo el R^2 . Se pudo observar que al incluir los 15 puntos de la curva de calibración en la regresión lineal, el valor de la R^2 era menor (0.9968) (Figura 5), que si se incluían únicamente las primeras 12 concentraciones de 0.44-79.04 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ($R^2= 0.9994$) (Figura 6). Asimismo, de manera visual se puede determinar, con base en las áreas y el gráfico como a partir de 157.384 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ hay una inflexión en la pendiente de la recta (indicado con línea punteada gris en la Figura 5. Por lo anterior, se determinó la linealidad para el α -terpineol hasta la concentración de 79.04 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

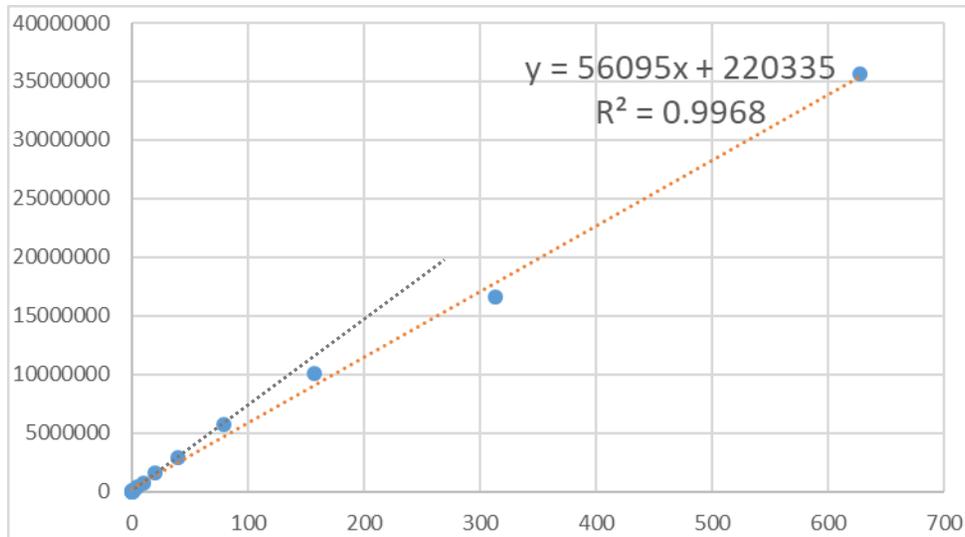


Figura 5. Representación gráfica de regresión lineal para 15 estándares de α -terpineol. Linealidad representada con línea gris.

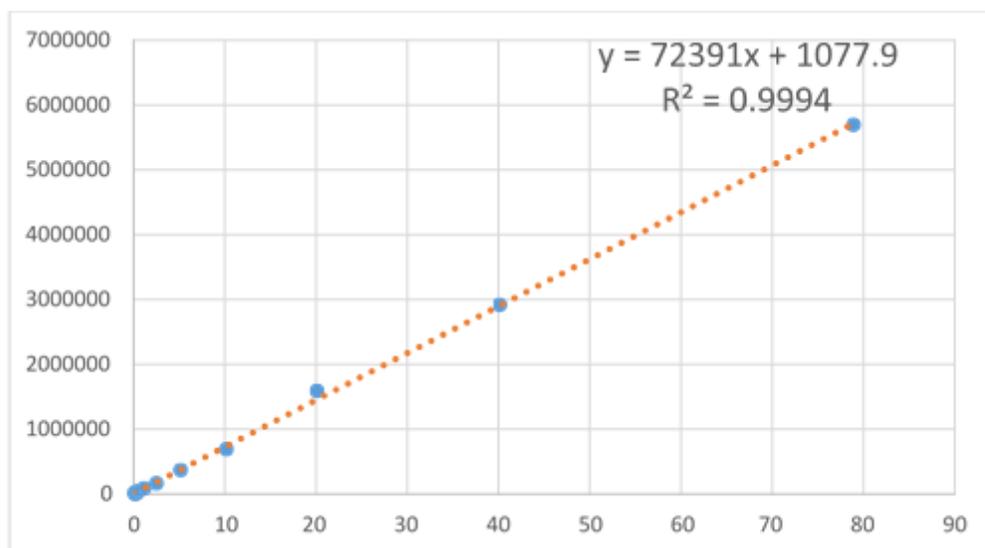


Figura 6. Representación gráfica de regresión lineal para 12 estándares de α -terpineol.

6. CÁLCULO DEL LIMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ) POR CG-EM PARA α - TERPINEOL

Diversos autores entre los que se encuentran ICH (2005), Lister (2005) y Bernal (2014) coinciden en que el LOD y LOQ, se determinen a través de las siguientes formulas:

$$\text{LOD} = 3.3 (S_y/m)$$

$$\text{LOQ} = 10 (S_y/m)$$

Donde:

S_y = Desviación Estándar de la respuesta

m = Pendiente de la curva de calibración

Para calcular los dos parámetros anteriores mediante el programa Excel se realizó el cálculo de la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente de la curva de calibración como a continuación se explica; para lo cual se emplearon los datos de áreas obtenidas de las 12 diferentes concentraciones seleccionadas de la curva de calibración.

CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTANDAR DE LA RESPUESTA

Se ingresa en la celda la siguiente instrucción: =ERROR.TIPICO.XY(después del paréntesis se seleccionan los valores correspondientes a las áreas, que en este caso se ubican en

las celdas B2:B13, quedando la instrucción de la siguiente manera: =ERROR.TIPICO.XY(B2:B13, ilustrado en Figura 7A. Posteriormente se seleccionan los valores de las concentraciones que se ubican en este caso en las celdas A2:A13, =ERROR.TIPICO.XY(B2:B13, A2:A13), mostrado en la Figura 7B. Finalmente se presiona enter para obtener el valor, que corresponde a 46007. 253.

A

	A	B	C	D	E
1	CONCENTRACIÓN	ÁREA			
2	0.044636827	2546.01			
3	0.087019825	5196.6			
4	0.173679386	12005.2			
5	0.334470461	18462.45			
6	0.654940312	38151.76			
7	1.28876649	85951.01			
8	2.568030555	161839.47			
9	5.135262841	366609.34			
10	10.16160065	688714.18			
11	20.12610128	1587585.56			
12	40.06567707	2914233.12			
13	79.0448273	5691411.48			

B

	A	B	C	D	E
1	CONCENTRACIÓN	ÁREA			
2	0.044636827	2546.01			
3	0.087019825	5196.6			
4	0.173679386	12005.2			
5	0.334470461	18462.45			
6	0.654940312	38151.76			
7	1.28876649	85951.01			
8	2.568030555	161839.47			
9	5.135262841	366609.34			
10	10.16160065	688714.18			
11	20.12610128	1587585.56			
12	40.06567707	2914233.12			
13	79.0448273	5691411.48			

Figura 7. Instrucciones para la obtención de la desviación estándar de la respuesta mediante el programa Excel.

CÁLCULO DE LA PENDIENTE DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se ingresa en la celda la siguiente instrucción: =PENDIENTE(después del paréntesis se seleccionan los valores correspondientes a las áreas, que en este caso se ubican en las celdas B2:B13, quedando la instrucción de la siguiente manera: =PENDIENTE(B2:B13, ilustrado en Figura 8A. Posteriormente se seleccionan los valores de las concentraciones que se ubican en este caso en las celdas A2:A13, =PENDIENTE (B2:B13, A2:A13), ilustrado en Figura 8B. Finalmente se presiona enter para obtener el valor de 72391.0837.

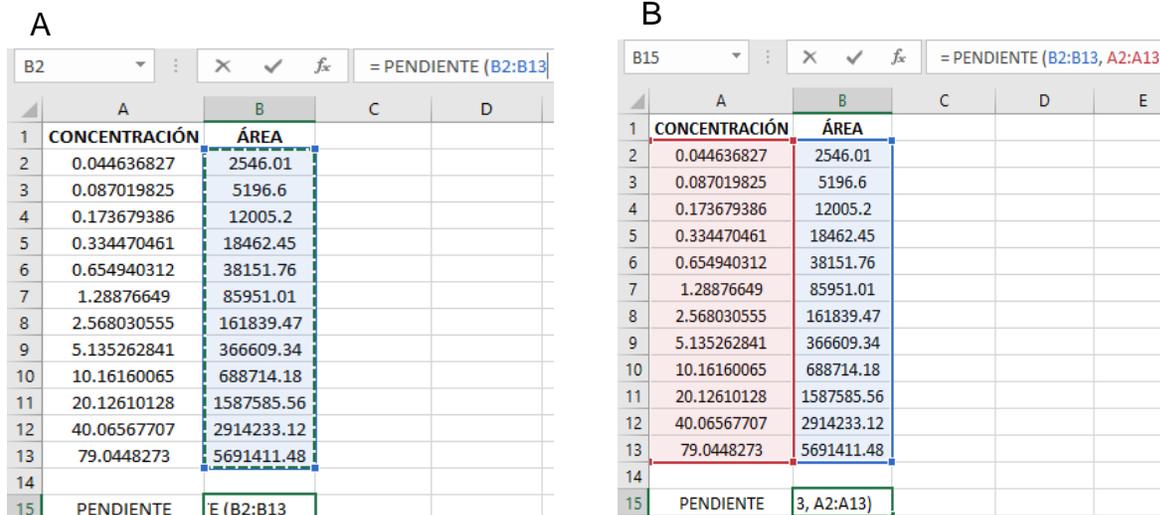


Figura 8. Instrucciones para la obtención de la pendiente de la curva de calibración con el programa Excel.

Los valores obtenidos se sustituyen en la fórmula:

$$\begin{aligned}
 \text{LOD} &= 3.3 (\text{Sy/m}) \\
 &= 3.3 (46007.253 / 72391.0837) \\
 &= 3.3 (0.63553756) \\
 &= 2.10
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{LOQ} &= 10 (\text{Sy/m}) \\
 &= 10 (46007.253 / 72391.0837) \\
 &= 10 (0.63553756) \\
 &= 6.36
 \end{aligned}$$

A pesar de que de manera visual y con apoyo a la relación señal/ruido se determinó la cantidad mínima detectable de $0.039 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, ésta fue la concentración base para la elaboración de la curva de calibración de 15 puntos, de los cuales 12 fueron los que determinaron la linealidad de manera confiable como quedó demostrado en las Figuras 5 y 6.

CONCLUSIÓN

Por CG-EM se determinó que para el α - terpineol la cantidad mínima detectable fue 2.10 ng μL^{-1} , la mínima cuantificable 6.36 ng μL^{-1} y se obtuvo una buena linealidad con un coeficiente de correlación de 0.9995 de 0.44 ng μL^{-1} a 79.04 ng μL^{-1} .

LITERATURA CITADA

- Bernal, E., & Guo, X. (2014). Limit of detection and limit of quantification determination in gas chromatography. *Advances in gas chromatography*, 3(1), 57-63.
- Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (ICH). (2005). Q2 (R1), Validation of analytical procedures: text and methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Chicago, USA.
- Food and Drug Administration (FDA). (2000). Guidance for Industry (draft): Analytical Procedures and Methods validation: chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation, Rockville: FDA.
- Lister, A. (2005). Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. In: Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Elsevier Inc. Separation Science and Technology 6(C):191-217.
- Mohamad T. (2018). Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantification (LOQ). *Organic & Medicinal Chem II.*, 7(5): 555722.

ANEXO 2

Cuadro 1. Compuestos volátiles orgánicos determinados a través de CG-EM en diferentes órganos vegetales de guanábana.

Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Compuesto	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
				Tiempo de retención	5.09	5.51	5.83	5.98	6.26	6.62	6.73	6.8	6.91
				Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-				Thiazole, 1-5-ethenyl-4-methyl-	Chloroun-decane		1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-
EFR1	G0	Flor	1	0.163044	0.155002	108,035	0.166927	1.00E-09	216,917	1.00E-09	1.00E-09	0.00600578	
EFR2	G0	Flor	1	0.0781613	1.00E-09	0.643864	1.00E-09	0.0689905	457,134	1.00E-09	1.00E-09	0.333	
EFR3	G0	Flor	1	1.00E-09	0.103668	0.395099	880,793	1.00E-09	132,873	1.00E-09	0.0364091	0.708502	
EFR4	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0104368	0.391244	0.107335	1.00E-09	132,873	1.00E-09	1.00E-09	0.325239	
EFR5	G0	Flor	1	0.629758	1.00E-09	114,585	0.289527	0.151144	132,873	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
EFR6	G0	Flor	1	0.103187	0.179144	151,163	0.454892	0.20953	132,873	1.00E-09	0.272604	0.965188	
EFR7	G0	Flor	1	0.310406	0.175512	122,646	0.16047	1.00E-09	204,997	1.00E-09	0.144833	0.992806	
EFR8	G0	Flor	1	0.218938	1.00E-09	0.350572	246,621	1.00E-09	478,961	1.00E-09	0.0443204	0.665899	
EFR9	G0	Flor	1	0.0629739	1.00E-09	0.281076	1.00E-09	1.00E-09	140,771	1.00E-09	0.345091	110,613	
EFR10	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.312151	1.00E-09	1.00E-09	732,916	544,648	1.00E-09	565,141	
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	0.0179113	0.0412708	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR2	G1	Fruto	2	0.348689	0.799334	585,378	1.00E-09	110,424	0.517859	0.416596	1.00E-09	0.546641	
FCPR3	G1	Fruto	2	0.15831	0.0292102	0.928724	0.192258	1.00E-09	0.529518	0.0530955	1.00E-09	0.663771	
FCPR4	G1	Fruto	2	0.628746	102,047	859,463	1.00E-09	113,718	0.982561	1.00E-09	1.00E-09	0.599748	

FCHR1	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.335796	207,886	0.609441	0.27006	0.575474	0.0538183	0.13128	0.723401
FCHR2	G2	Fruto	3	0.515127	0.522284	34,081	0.899409	0.447398	0.718105	0.173694	0.173726	0.73928
FCHR3	G2	Fruto	3	0.270065	108,273	117,888	1.00E-09	147,932	0.420039	303,993	1.00E-09	0.493392
FCHR4	G2	Fruto	3	0.171913	0.258762	298,086	1.00E-09	0.3095	0.323552	1.00E-09	1.00E-09	0.151079
FMR1	G3	Fruto	4	0.0874159	0.197456	213,801	1.00E-09	0.098784	0.768444	1.00E-09	0.189966	0.289337
FMR2	G3	Fruto	4	259,617	247,592	154,035	0.820368	255,366	361,839	438,029	0.26804	110,787
FMR3	G3	Fruto	4	0.0549369	0.394817	134,913	0.154756	0.16333	0.480371	1.00E-09	1.00E-09	0.187532
FMR4	G3	Fruto	4	0.321298	112,933	139,953	1.00E-09	198,636	0.809386	173,089	148,674	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	0.316971	0.184052	203,738	710,616	1.00E-09	191,776	0.760126	0.078835	0.576596
FGR2	G4	Fruto	5	0.432185	1.00E-09	244,357	0.193804	0.624868	0.715783	1.00E-09	1.00E-09	0.732847
FGR3	G4	Fruto	5	0.599177	0.725856	314,843	1.00E-09	0.797131	0.736726	0.913156	1.00E-09	20,581
GR4	G4	Fruto	5	0.161599	1.00E-09	119,365	0.138712	0.0960382	107,051	1.00E-09	0.0901138	0.668665
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.63102	935,702	1.00E-09	105,051	0.385511	182,786	1.00E-09	0.210072
FGR6	G4	Fruto	5	0.425115	1.00E-09	219,659	0.336469	0.140669	0.525133	1.00E-09	0.182399	0.782757
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.606213	1.00E-09	1.00E-09	0.296811	0.570165	1.00E-09	0.372083
FGR8	G4	Fruto	5	165,224	1.00E-09	108,316	1.00E-09	1.00E-09	0.570737	1.00E-09	1.00E-09	0.626292
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	136,781	1.00E-09	1.00E-09	176,695	1.00E-09	1.00E-09	0.887109
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	107,603	1.00E-09	1.00E-09	0.148442	1.00E-09	1.00E-09	0.502245
FGR12	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	146,296	1.00E-09	1.00E-09	0.313147	1.00E-09	1.00E-09	0.932648

Cuadro 1. Continuación.

			Compuesto	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
			Tiempo de retención	7.03	7.28	7.45	7.57	7.73	7.91	8.11	8.35
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Decane, 2,5,9-trimethyl-	.beta.-Ocimene	Heptane, 4-ethyl-2,2,6,6-tetramethyl-	Benzene, 1,2-diethyl-	2,2,7,7-Tetramethyloctane	2,2,7,7-Tetramethyloctane		p-Cymene
EFR1	G0	Flor	1	1.00E-09	930,564	0.623804	1.00E-09	0.958162	1.00E-09	0.23246	1.00E-09
EFR2	G0	Flor	1	1.00E-09	224,713	0.228865	1.00E-09	0.484428	0.0550395	0.61206	1.00E-09
EFR3	G0	Flor	1	0.264695	259,999	0.582683	1.00E-09	168,544	0.0947487	1.00E-09	1.00E-09
EFR4	G0	Flor	1	0.100555	0.91956	0.762854	1.00E-09	114,856	1.00E-09	0.64375	1.00E-09
EFR5	G0	Flor	1	1.00E-09	348,899	193,543	1.00E-09	167,483	0.0838335	18,374	1.00E-09
EFR6	G0	Flor	1	0.260031	616,659	310,241	1.00E-09	203,031	1.00E-09	0.89533	1.00E-09
EFR7	G0	Flor	1	0.316163	207,071	243,335	1.00E-09	242,657	1.00E-09	246,886	1.00E-09
EFR8	G0	Flor	1	0.170302	1,514	0.992769	1.00E-09	177,689	0.121071	178,634	1.00E-09
EFR9	G0	Flor	1	0.291131	270,795	318,036	1.00E-09	172,219	0.0192116	1.00E-09	1.00E-09
EFR10	G0	Flor	1	1.00E-09	130,255	1.00E-09	1.00E-09	0.623796	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	0.0174174	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	0.835812	0.257084	175,015	1.00E-09	203,298	0.65321
FCPR3	G1	Fruto	2	0.159612	1.00E-09	180,988	1.00E-09	0.937674	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR4	G1	Fruto	2	0.283048	1.00E-09	201,693	0.557105	218,122	1.00E-09	239,337	1.00E-09
FCHR1	G2	Fruto	3	0.316306	1.00E-09	0.893162	1.00E-09	157,681	1.00E-09	222,062	1.00E-09
FCHR2	G2	Fruto	3	0.165998	1.00E-09	103,383	1.00E-09	19,325	0.17305	170,368	1.00E-09

FCHR3	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	0.518573	0.215865	263,533	1.00E-09	180,054	146,519
FCHR4	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	0.464561	1.00E-09	101,614	1.00E-09	0.68751	0.41679
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	120,241	1.00E-09	0.705937	1.00E-09	0.94433	0.40120
FMR2	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	0.715379	0.460322	146,788	1.00E-09	320,952	212,364
FMR3	G3	Fruto	4	0.019195	1.00E-09	0.159537	0.024786	0.960685	0.040759	107,916	0.72855
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	0.156703	1.00E-09	201,189	1.00E-09	0.88983	185,874
FGR1	G4	Fruto	5	0.133156	1.00E-09	0.457623	0.759363	301,388	0.0986171	0.65142	0.45031
FGR2	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	142,119	1.00E-09	0.418825	1.00E-09	281,382	1.00E-09
FGR3	G4	Fruto	5	0.863855	1.00E-09	384,847	0.8302	380,586	0.11972	326,333	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	204,318	0.350583	270,752	1.00E-09	199,954	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.173681	0.350587	19,784	1.00E-09	113,374	0.89956
FGR6	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	103,488	1.00E-09	379,559	1.00E-09	206,105	137,741
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.586345	1.00E-09	174,899	1.00E-09	0.89553	0.33932
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	185,633	0.349691	350,412	1.00E-09	211,997	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	138,076	1.00E-09	406,364	1.00E-09	271,191	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	105,538	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.651963	1.00E-09	286,981	1.00E-09	0.588131	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.78186	1.00E-09	305,136	0.0967465	276,197	1.00E-09

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25
				Tiempo de retención	8.44	8.77	9.44	9.95	10.18	10.64	10.85	10.99
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Decane, 3,7-dimethyl-	1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	(E)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene						Pentane, 2,2,3,4-tetramethyl-
EFR1	G0	Flor	1	1.00E-09	0.387753	1140.29	1.00E-09	1.00E-09	0.0719744	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
EFR2	G0	Flor	1	0.214268	0.262726	477,009	1.00E-09	1.00E-09	0.0480196	0.0356373	1.00E-09	1.00E-09
EFR3	G0	Flor	1	0.296468	0.395494	156,613	1.00E-09	1.00E-09	341,543	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
EFR4	G0	Flor	1	0.155035	0.424954	186,504	1.00E-09	0.0434394	0.0309599	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
EFR5	G0	Flor	1	0.577954	0.589396	351,877	0.0023875	0.064437	0.131067	0.0237114	1.00E-09	1.00E-09
EFR6	G0	Flor	1	0.518332	852,646	835,745	0.0451215	0.0543278	0.108156	0.0524033	0.0226218	1.00E-09
EFR7	G0	Flor	1	0.789813	117,591	471,109	0.0696629	0.104778	0.102473	0.0652824	0.0659887	1.00E-09
EFR8	G0	Flor	1	0.140897	0.472924	796,638	0.0638078	0.0380366	866,318	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
EFR9	G0	Flor	1	0.726528	0.631749	535,745	0.0177714	0.0963587	0.0364087	0.0360633	0.0537046	1.00E-09
EFR10	G0	Flor	1	1.00E-09	0.237064	2365.96	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	0.0926047	1.00E-09	1.00E-09	0.0597146	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR2	G1	Fruto	2	0.367147	0.254073	165,221	0.302982	1.00E-09	0.479521	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR3	G1	Fruto	2	0.40275	0.260116	25,386	1.00E-09	1.00E-09	0.0819079	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.630881	230,928	0.319101	1.00E-09	0.408977	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCHR1	G2	Fruto	3	0.598091	0.52597	210,963	0.118917	0.0510444	0.1446	1.00E-09	0.0657669	1.00E-09
FCHR2	G2	Fruto	3	0.306612	0.314843	486,141	0.0801734	1.00E-09	0.2576	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09

FCHR3	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.375153	147,437	0.359346	1.00E-09	0.749962	1.00E-09	0.0643229
FCHR4	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.127741	120,814	0.0532536	1.00E-09	0.130864	1.00E-09	0.0013509
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.117796	0.360831	0.0439666	1.00E-09	0.086796	1.00E-09	1.00E-09
FMR2	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.660784	578,325	0.536119	0.184482	0.679231	1.00E-09	0.043598
FMR3	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.19308	146,196	0.0647881	0.0103749	0.21864	1.00E-09	1.00E-09
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.32411	99,091	0.156457	1.00E-09	0.318215	1.00E-09	0.46567
FGR1	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.163105	221,764	0.324036	0.0456636	137,524	1.00E-09	0.133307
FGR2	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.582011	137,487	0.262703	1.00E-09	0.481231	0.0597594	0.0454397
FGR3	G4	Fruto	5	100,224	0.898341	12,038	0.180299	1.00E-09	0.236331	1.00E-09	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	0.356248	0.400073	329,188	1.00E-09	1.00E-09	0.107366	0.0449315	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.339587	311,239	0.353902	1.00E-09	0.503785	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.282796	111,467	0.134612	1.00E-09	0.185064	1.00E-09	0.345834
FGR7	G4	Fruto	5	0.356169	0.112537	394,415	1.00E-09	1.00E-09	0.250647	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	118,509	0.437567	622,678	0.152551	1.00E-09	0.463016	1.00E-09	0.273246
FGR9	G4	Fruto	5	140,107	0.629875	308,192	0.0712036	1.00E-09	641,732	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	0.568088	1.00E-09	1.00E-09	0.0400535	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	116,835	0.297575	23,945	1.00E-09	1.00E-09	0.272164	1.00E-09	0.442798
FGR12	G4	Fruto	5	131,104	0.521852	349,188	0.22761	1.00E-09	0.733967	0.594327	0.883503

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33
				Tiempo de retención	11.48	11.71	11.96	12.15	12.39	12.68	13.45	13.96
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez		Propanoic acid, 2-methyl-, hexyl ester	3,4-Hexanedione, 2,2,5-trimethyl-	1-Hexene, 3,5,5-trimethyl-			Benzothiazole	Caprolactam	
EFR1	G0	Flor	1	0.351285	0.0634903	1.00E-09	0.158236	0.067178	0.173709	0.174469	1.00E-09	
EFR2	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0892116	0.0598543	1.00E-09	0.027956	1.00E-09	0.278419	1.00E-09	
EFR3	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0719565	0.0466871	1.00E-09	1.00E-09	0.00352346	0.134861	1.00E-09	
EFR4	G0	Flor	1	0.0037287	0.0688274	1.00E-09	1.00E-09	0.003039	1.00E-09	1.00E-09	0.001909	
EFR5	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0639206	0.03979	1.00E-09	0.045229	0.105689	0.371274	0.026610	
EFR6	G0	Flor	1	0.113142	0.0603395	0.0679984	1.00E-09	0.046580	0.207034	1.00E-09	0.078674	
EFR7	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0520498	0.0514586	0.0020910	0.077757	1.00E-09	1.00E-09	0.043820	
EFR8	G0	Flor	1	0.0626453	0.0918902	0.0623707	1.00E-09	0.075194	1.00E-09	0.344645	0.051103	
EFR9	G0	Flor	1	0.0300647	0.100688	0.0387149	1.00E-09	0.10461	1.00E-09	0.906742	0.068268	
EFR10	G0	Flor	1	0.538014	0.100059	0.0656036	1.00E-09	1.00E-09	0.24385	0.268695	0.191559	
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.111187	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR2	G1	Fruto	2	0.031311	0.171944	0.165139	1.00E-09	1.00E-09	577,811	0.265175	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.0911113	0.0110647	0.0351137	1.00E-09	1.00E-09	0.299995	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	0.0706561	0.182271	0.208483	1.00E-09	1.00E-09	0.987854	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.0270475	0.0811962	0.0856107	1.00E-09	0.074069	0.135583	0.078722	0.030090	

FCHR2	G2	Fruto	3	0.0336593	0.0929083	0.0982734	1.00E-09	1.00E-09	0.363284	0.217967	1.00E-09
FCHR3	G2	Fruto	3	0.0074391	0.258182	0.232771	0.0690017	1.00E-09	500,205	0.186404	1.00E-09
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0032801	0.0434404	0.0639666	1.00E-09	1.00E-09	156,335	0.0859731	1.00E-09
FMR1	G3	Fruto	4	0.0015800	0.0549292	1.00E-09	0.00224191	1.00E-09	0.123137	1.00E-09	1.00E-09
FMR2	G3	Fruto	4	0.0952832	0.39575	0.309514	0.136953	1.00E-09	0.564938	0.0408373	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.1552	0.0402219	0.00141446	0.0139311	0.0672901	0.0377466	1.00E-09
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	599,679	1.00E-09	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.454936	0.332538	0.21731	1.00E-09	106,638	0.00156152	0.374919
FGR2	G4	Fruto	5	0.0724549	0.158447	0.194191	0.0813075	0.0196178	435,822	1.00E-09	1.00E-09
FGR3	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.100968	0.149812	1.00E-09	1.00E-09	300,215	0.642003	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.0538341	0.0789855	1.00E-09	1.00E-09	0.351655	0.709608	0.0575907
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.30816	0.364561	1.00E-09	1.00E-09	181,932	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.283867	0.138219	0.127605	0.0200079	210,557	0.520597	1.00E-09
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.108263	0.0959747	0.0831229	1.00E-09	159,405	0.281213	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.26753	0.202115	1.00E-09	1.00E-09	240,851	0.385021	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.178524	0.170252	1.00E-09	1.00E-09	260,414	0.637249	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.326555	0.123058	0.170252	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	0.0149611	0.196508	0.123058	0.170252	0.114361	322,189	0.479495	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.2808	0.140047	0.254145	1.00E-09	267,969	0.514509	1.00E-09

Cuadro 1. Continuación.

			Compuesto	C34	C35	C36	C37	C38	C39	C40	C41
			Tiempo de retención								
			Madurez	14.39	14.7	14.98	15.13	15.31	15.48	15.74	15.98
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	1-(3,3-Dimethylbutyn-1-yl)-2,2-dimethylcyclopropene	Hexane, 3,3-dimethyl-		Pentanal, 2-methyl-	3,4-Hexanedione, 2,2,5-trimethyl-	Decane, 3-bromo-	1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester
EFR1	G0	Flor	1	267,874	1.00E-09	0.005753	0.063490	0.022057	0.07829	0.113899	0.0671582
EFR2	G0	Flor	1	0.142712	0.029811	1.00E-09	0.009826	1.00E-09	0.10192	0.104722	0.049317
EFR3	G0	Flor	1	0.0528775	0.097374	0.025536	0.055216	0.00482103	0.10897	0.156407	0.0811677
EFR4	G0	Flor	1	0.246036	1.00E-09	1.00E-09	0.056849	1.00E-09	0.04585	1.00E-09	1.00E-09
EFR5	G0	Flor	1	0.0341919	1.00E-09	1.00E-09	0.060260	1.00E-09	0.04448	0.091681	1.00E-09
EFR6	G0	Flor	1	0.444	1.00E-09	1.00E-09	0.058176	0.000793065	0.03344	0.066395	0.0093115
EFR7	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.003824	0.047875	0.0160617	0.05990	0.076372	0.0236244
EFR8	G0	Flor	1	0.0583387	0.019899	0.001608	0.074146	0.007254	0.08346	0.12492	0.0656018
EFR9	G0	Flor	1	0.140915	1.00E-09	1.00E-09	0.093253	1.00E-09	0.09215	0.137788	0.0548756
EFR10	G0	Flor	1	974,122	1.00E-09	1.00E-09	0.079145	1.00E-09	0.11131	1.00E-09	0.0248446
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.001134	0.004800	1.00E-09	1.00E-09	0.13287	0.144085	0.0936388
FCPR2	G1	Fruto	2	0.0538724	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.19587	0.232897	1.00E-09
FCPR3	G1	Fruto	2	0.0217553	1.00E-09	1.00E-09	0.043349	1.00E-09	0.08286	0.091726	0.0486656
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCHR1	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.050329	1.00E-09	0.069266	1.00E-09	0.18149	0.203382	0.15238
FCHR2	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.059402	1.00E-09	1.00E-09	0.0496605	0.07176	0.107933	1.00E-09

FCHR3	G2	Fruto	3	0.0312377	0.082283	0.081863	0.061376	0.654447	0.14902	0.195445	0.0871595
FCHR4	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.012479	1.00E-09	0.014732	0.0228849	0.03676	0.033843	0.021979
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.038224	0.021878	0.021225	0.0013843	0.09738	0.049573	0.0554419
FMR2	G3	Fruto	4	0.0547444	0.278916	0.098727	0.087247	0.201856	0.18973	0.237878	0.149448
FMR3	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.046203	0.039231	0.051580	1.00E-09	0.07355	0.093214	0.0624862
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.255278	0.17934	0.295724	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	0.00290304	175,965	0.390435	0.380764	0.195664	0.30024	0.292249	0.123032
FGR2	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.088452	1.00E-09	0.077809	0.120551	0.18013	0.226408	0.128738
FGR3	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.091836	0.037207	0.114333	1.00E-09	0.17053	0.252604	0.114279
FGR4	G4	Fruto	5	0.369991	0.040931	0.008019	0.059301	0.0114435	0.13087	0.181823	0.0806193
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.077566	0.158742	0.039319	0.389875	0.25376	0.212302	0.130929
FGR6	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.101725	0.16742	0.133719	0.298311	0.25183	0.284124	0.142848
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.049594	0.167424	0.133718	0.298312	0.10088	0.147895	0.0559186
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.094777	0.126097	0.228445	0.22879	0.22005	0.204966	0.0784164
FGR9	G4	Fruto	5	0.0657234	0.030118	0.168978	0.193324	0.222845	0.20239	0.232687	0.0286782
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	115,946	0.3211	0.376626	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	369,141	0.088974	0.160238	0.106326	1.00E-09	0.08517	0.144248	0.0331532
FGR12	G4	Fruto	5	0.00779191	0.032147	0.134489	0.071908	0.151973	0.15855	0.135134	1.00E-09

Cuadro 1. Continuación.

			Compuesto	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48
			Tiempo de retención	16.08	16.26	16.54	16.74	16.84	17.33	17.84
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Hexane, 3,3-dimethyl-		Ethanone, 1-(3-ethyloxiranyl)-	Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	Glycerol 1,2-diacetate	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-
EFR1	G0	Flor	1	0.016790	1.00E-09	0.0237175	0.0333581	1.00E-09	1.00E-09	0.0894011
EFR2	G0	Flor	1	0.057737	0.006240	1.00E-09	0.0174141	1.00E-09	0.0664055	0.0641708
EFR3	G0	Flor	1	0.116495	270,591	0.0310803	1.00E-09	0.012934	0.0160222	0.010755
EFR4	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.0232668	1.00E-09	0.000864	0.0549761	0.824593
EFR5	G0	Flor	1	0.011502	0.049120	1.00E-09	0.0555516	301,415	0.0757456	0.00249997
EFR6	G0	Flor	1	0.011424	0.023231	0.0111362	1.00E-09	906,363	1.00E-09	1.00E-09
EFR7	G0	Flor	1	0.035115	0.028437	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.00318615	0.0813759
EFR8	G0	Flor	1	1.00E-09	395,993	1.00E-09	1.00E-09	252,032	0.0413913	1.00E-09
EFR9	G0	Flor	1	0.012006	0.008048	0.0261883	1.00E-09	248,753	1.00E-09	0.0247077
EFR10	G0	Flor	1	0.015511	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	302,885	1.00E-09	0.044002
FCPR1	G1	Fruto	2	0.089926	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.002554	0.046804	1.00E-09
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.191334	1.00E-09	0.212705	439,743
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0636097
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	12,998
FCHR1	G2	Fruto	3	0.049215	0.064257	1.00E-09	0.0625243	1.00E-09	0.0647795	0.0554166

FCHR2	G2	Fruto	3	0.054889	0.088255	1.00E-09	0.069171	285,212	0.112931	0.137875
FCHR3	G2	Fruto	3	0.129903	0.146705	0.00821527	0.437995	0.058682	0.374278	0.460367
FCHR4	G2	Fruto	3	0.022857	0.055471	1.00E-09	0.0946255	1.00E-09	0.0832792	0.0656214
FMR1	G3	Fruto	4	0.020494	0.020745	0.0167421	1.00E-09	252,588	0.0308228	1.00E-09
FMR2	G3	Fruto	4	0.287979	0.058153	0.0310226	0.814077	1.00E-09	0.780787	0.202321
FMR3	G3	Fruto	4	0.047777	0.069798	0.00637506	0.11291	1.00E-09	0.0805672	0.0486553
FMR4	G3	Fruto	4	0.24455	0.079609	1.00E-09	0.471934	1.00E-09	0.587329	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	196,309	109,015	0.183845	0.219346	376,606	0.864166	0.0722395
FGR2	G4	Fruto	5	0.113113	0.151535	0.023295	0.248956	342,389	1.00E-09	0.264964
FGR3	G4	Fruto	5	0.108472	0.084235	1.00E-09	0.12482	0.049635	1.00E-09	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.030182	1.00E-09	1.00E-09	447,243	0.0454203	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	0.080627	0.237665	0.449609	1.00E-09	405,049	0.522055	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.109054	0.17327	1.00E-09	0.647802	294,065	0.724647	0.273645
FGR7	G4	Fruto	5	0.051971	0.12004	1.00E-09	0.340669	157,329	0.482351	0.186802
FGR8	G4	Fruto	5	0.079464	0.0687097	1.00E-09	0.730408	844,528	0.772457	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	0.083440	0.0384045	1.00E-09	0.527426	346,436	0.689496	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	161,525	0.210011	0.651855	322,344	0.537699	0.153982
FGR11	G4	Fruto	5	0.006332	0.142555	1.00E-09	0.596049	401,798	0.864166	0.181944
FGR12	G4	Fruto	5	0.063153	0.0891381	1.00E-09	0.50579	213,379	0.639272	0.170724

Cuadro 1. Continuación.

Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Compuesto	C49	C50	C51	C52	C53	C54
				Tiempo de retención	18.05	18.14	18.52	19.33	19.44	19.54
				Decane, 3-bromo-	1,3,6,10-Dodecatetraene, 3,7,11-trimethyl-, (Z,E)-	Caryophyllene	Humulene	N,N'-(2-Hydroxytrimethylene) diphthalimide	Oxalic acid, allyl nonyl ester	
EFR1	G0	Flor	1	0.0255308	0.0140149	0.300425	0.024114	0.117142	0.0571334	
EFR2	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.270343	0.0225496	1.00E-09	0.0423957	
EFR3	G0	Flor	1	0.146108	1.00E-09	0.0294545	0.0608578	1.00E-09	0.0828602	
EFR4	G0	Flor	1	0.0936956	1.00E-09	0.181783	0.0608578	1.00E-09	0.0644218	
EFR5	G0	Flor	1	0.0202401	1.00E-09	0.170571	0.0368824	1.00E-09	0.101921	
EFR6	G0	Flor	1	0.0401912	0.0153788	0.0995547	1.00E-09	0.0971422	0.0361316	
EFR7	G0	Flor	1	0.0505737	0.0175377	0.445411	0.0341708	1.00E-09	0.0409478	
EFR8	G0	Flor	1	0.0711762	0.0109565	0.121034	0.0160275	0.0570389	0.0626911	
EFR9	G0	Flor	1	0.0761017	0.0158601	0.198541	1.00E-09	0.13366	0.0431835	
EFR10	G0	Flor	1	0.0660228	1.00E-09	0.272048	0.0518485	0.980415	0.0357047	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.110647	1.00E-09	0.62039	1.00E-09	0.297176	0.0759436	
FCPR2	G1	Fruto	2	0.202227	0.2735	154,834	160,881	1.00E-09	0.165278	
FCPR3	G1	Fruto	2	0.0696398	1.00E-09	0.907135	0.0485933	1.00E-09	0.0714389	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	669,364	0.581476	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.0731704	0.041232	0.107541	0.0414241	1.00E-09	0.0864136	
FCHR2	G2	Fruto	3	0.0955433	0.0590257	0.881867	0.0853526	0.107775	0.0616562	

FCHR3	G2	Fruto	3	0.286086	0.233067	316,199	0.299745	1.00E-09	0.18917
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0457834	0.0794539	0.477777	0.0381447	1.00E-09	0.0376349
FMR1	G3	Fruto	4	0.0304033	0.0289398	0.00372409	0.0165324	0.207803	0.0389981
FMR2	G3	Fruto	4	0.363661	0.240438	0.421258	0.0890672	1.00E-09	0.332157
FMR3	G3	Fruto	4	0.0824854	0.0373096	0.0482983	0.0324191	1.00E-09	0.0599476
FMR4	G3	Fruto	4	0.269952	0.309016	0.268719	1.00E-09	1.00E-09	0.404114
FGR1	G4	Fruto	5	210,911	0.289476	0.341433	0.214708	0.0190876	0.304452
FGR2	G4	Fruto	5	0.283775	0.253861	0.270039	0.0558558	0.119243	0.181106
FGR3	G4	Fruto	5	0.159788	0.159647	0.174024	3.49E-06	1.00E-09	0.125584
FGR4	G4	Fruto	5	0.157045	1.00E-09	0.0277846	0.02177	0.21149	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	0.617135	0.323704	0.223067	0.108734	0.535033	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.310418	0.276717	146,816	0.197221	0.064038	0.192214
FGR7	G4	Fruto	5	0.227477	1.00E-09	102,677	0.112343	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	0.360381	0.285673	0.966434	0.148744	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	0.392502	0.266432	0.526147	0.113596	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	121,166	0.230715	1.00E-09	0.320482	1.00E-09	0.0744345
FGR11	G4	Fruto	5	0.416924	0.300585	0.393417	0.161828	1.00E-09	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	0.417833	0.125837	0.534909	0.17889	0.0677432	0.165557

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C55	C56	C57	C58	C59	C60	C61
				Tiempo de retención	19.78	19.98	20.18	20.33	20.42	20.51	20.69
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-one, 1,5-bis(1,1-dimethylethyl)-3,3-dimethyl-	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methylethyl)-, [S-(E,E)]-	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl isohexyl ester	.gamma.-Elemene	.alpha.-Muurolene			Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-
EFR1	G0	Flor	1	0.0251095	0.0738538	0.0164891	0.058351	0.0188517	0.025154	0.739281	
EFR2	G0	Flor	1	0.00696072	0.0032263	1.00E-09	0.029934	1.00E-09	0.008494	0.662334	
EFR3	G0	Flor	1	0.0582114	0.100236	0.0684689	0.125537	0.0890045	138,427	0.656507	
EFR4	G0	Flor	1	0.0254303	1.00E-09	0.0281256	0.031455	0.0141716	1.00E-09	367,062	
EFR5	G0	Flor	1	0.0419628	0.103823	1.00E-09	0.044156	0.0337215	0.024825	0.397833	
EFR6	G0	Flor	1	0.0122731	0.0266481	1.00E-09	0.024440	0.0150183	1.00E-09	0.175545	
EFR7	G0	Flor	1	0.034028	0.0463599	0.0122566	0.042142	0.0143436	1.00E-09	0.424631	
EFR8	G0	Flor	1	0.0842517	0.121707	0.0466957	0.054022	0.0220778	204,268	0.713625	
EFR9	G0	Flor	1	0.023586	0.162182	0.0251923	0.040029	0.0259819	0.008887	0.766212	
EFR10	G0	Flor	1	0.0899261	0.112263	0.0066442	0.040029	0.0064069	0.249126	0.698108	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.580369	0.0452374	1.00E-09	0.170115	0.0328592	0.215638	0.394496	
FCPR2	G1	Fruto	2	0.562839	132,259	1.00E-09	0.620776	0.464853	1.00E-09	0.859164	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.0887065	1.00E-09	0.052733	1.00E-09	1.00E-09	0.592531	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.303316	1.00E-09	0.295055	0.282371	1.00E-09	0.628378	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.078576	0.121303	0.0326376	0.064595	0.0488084	0.028899	0.689315	

FCHR2	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.0824138	1.00E-09	0.087316	0.0557513	1.00E-09	0.381452
FCHR3	G2	Fruto	3	0.971922	0.137604	0.0376711	0.239254	0.216816	0.107039	107,695
FCHR4	G2	Fruto	3	0.228678	0.0471265	1.00E-09	0.028362	0.0264591	1.00E-09	0.258894
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.0867308	0.0283199	0.045863	0.0313075	0.018284	0.235951
FMR2	G3	Fruto	4	0.171396	0.246218	0.0647428	0.169083	0.400228	0.092947	0.940153
FMR3	G3	Fruto	4	0.0274885	0.0580827	1.00E-09	0.078989	0.0492758	0.025597	0.529867
FMR4	G3	Fruto	4	111,776	1.00E-09	1.00E-09	0.140254	0.145334	0.25841	161,493
FGR1	G4	Fruto	5	0.028901	0.328527	0.315176	179,041	20,415	716,926	689,083
FGR2	G4	Fruto	5	0.373537	0.18506	0.0623161	0.144779	0.148451	0.074185	0.730193
FGR3	G4	Fruto	5	0.163061	0.158385	1.00E-09	0.167694	0.0928748	0.044200	108,618
FGR4	G4	Fruto	5	0.0998784	0.0870583	1.00E-09	0.0596041	0.0629298	1.00E-09	0.721174
FGR5	G4	Fruto	5	121,057	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.396286	0.123743	0.920394
FGR6	G4	Fruto	5	185,723	0.258002	0.0599379	0.208979	0.307075	0.168677	133,588
FGR7	G4	Fruto	5	117,183	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.138864	0.133379	0.671733
FGR8	G4	Fruto	5	219,225	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.201311	0.101087	105,293
FGR9	G4	Fruto	5	219,968	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.270228	0.113375	108,752
FGR10	G4	Fruto	5	225,842	0.424968	0.142952	110,146	108,974	101,258	813,786
FGR11	G4	Fruto	5	283,022	0.11542	0.072619	0.168534	0.299194	0.174382	106,974
FGR12	G4	Fruto	5	256,398	0.0999694	0.0341426	0.117218	0.302352	0.119776	0.798877

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C62	C63	C64	C65	C66	C67	C68
				Tiempo de retención	20.93	21.14	21.29	21.49	21.74	21.87	22.44
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-			Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	Dihydrocoumarin, 4,4,5,7,8-pentamethyl	
EFR1	G0	Flor	1	0.139955	0.108711	0.234486	0.214411	0.283792	1.00E-09	1.00E-09	
EFR2	G0	Flor	1	0.124578	0.124134	0.256881	0.204781	0.188827	1.00E-09	1.00E-09	
EFR3	G0	Flor	1	0.158514	0.133912	0.395725	0.280461	0.0265464	0.0293878	1.00E-09	
EFR4	G0	Flor	1	0.116884	0.0896224	0.190328	0.159664	0.0588438	0.00896224	1.00E-09	
EFR5	G0	Flor	1	0.0691046	0.0602703	0.151052	0.137667	0.135096	0.221598	1.00E-09	
EFR6	G0	Flor	1	0.0396144	0.0260602	0.0940864	0.0822625	0.0145913	0.329666	0.0834715	
EFR7	G0	Flor	1	0.0997548	0.0779001	0.163906	0.125022	0.147051	1.00E-09	1.00E-09	
EFR8	G0	Flor	1	0.128449	0.118682	0.275428	0.233304	0.0832265	0.410407	0.0434279	
EFR9	G0	Flor	1	0.117724	0.115476	0.239889	0.226582	0.0643513	0.15756	0.0414293	
EFR10	G0	Flor	1	0.134498	0.133224	0.248754	0.229976	0.0499027	0.217843	0.0225745	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.199679	0.148384	0.334396	0.309192	0.13227	0.027002	1.00E-09	
FCPR2	G1	Fruto	2	141,786	1.00E-09	0.335064	104,453	0.292364	0.248591	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	0.136513	0.0806965	0.105097	0.157063	0.116633	0.0357556	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	0.634179	1.00E-09	1.00E-09	0.46939	1.00E-09	113,535	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.168213	0.151001	0.309813	0.26807	0.201596	0.498077	1.00E-09	

FCHR2	G2	Fruto	3	0.1568	0.119421	0.244334	0.178937	0.150637	116,372	0.0693615
FCHR3	G2	Fruto	3	0.353246	0.123273	0.377165	0.423625	0.104164	0.738574	0.0145612
FCHR4	G2	Fruto	3	0.073817	0.0255514	0.0638804	0.0592453	0.0280708	0.0948314	1.00E-09
FMR1	G3	Fruto	4	0.111914	0.110003	0.215168	0.191061	0.152445	0.131723	0.0424472
FMR2	G3	Fruto	4	0.366761	0.222582	0.398013	0.382499	0.246436	452,839	0.0731283
FMR3	G3	Fruto	4	0.12202	0.111879	0.254308	0.21044	0.181114	0.25191	1.00E-09
FMR4	G3	Fruto	4	0.254069	1.00E-09	0.299472	0.454819	1.00E-09	0.880093	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	0.53997	0.119439	22,564	155,146	11,427	276,725	0.267878
FGR2	G4	Fruto	5	0.235916	0.23975	0.424813	0.358794	0.143334	0.761793	1.00E-09
FGR3	G4	Fruto	5	0.231698	0.208743	0.436691	0.390635	0.282652	0.426579	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	0.156614	0.145936	0.311561	0.277166	0.138435	101,679	0.0544388
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.41	0.473574	1.00E-09	147,638	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.433958	0.239444	0.453516	0.415708	0.350163	154,201	0.107297
FGR7	G4	Fruto	5	0.27362	1.00E-09	0.291413	0.232672	1.00E-09	0.786278	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	0.330137	1.00E-09	0.35834	0.293948	1.00E-09	192,275	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	0.337779	1.00E-09	0.370024	0.319324	1.00E-09	143,212	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	0.450485	0.0387499	196,397	0.790155	0.465243	178,156	0.1529
FGR11	G4	Fruto	5	0.310626	0.153007	0.315553	0.388466	0.21251	16,245	0.0761188
FGR12	G4	Fruto	5	0.252968	0.1139	0.276824	0.350967	0.116342	151,607	0.0359086

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C69	C70	C71	C72	C73	C74	C75	C76
				Tiempo de retención	22.51	22.67	22.89	23.07	23.33	24.18	24.34	24.46
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester				Benzophenone			2-Piperidinone, N-[4-bromo-n-butyl]-	
EFR1	G0	Flor	1	0.10563	1.00E-09	1.00E-09	0.15872	1.00E-09	0.0389632	0.0940149	0.0278728	
EFR2	G0	Flor	1	0.11739	1.00E-09	1.00E-09	0.147798	1.00E-09	1.00E-09	0.0363082	0.0433528	
EFR3	G0	Flor	1	0.107427	1.00E-09	1.00E-09	0.396904	1.00E-09	0.0623093	0.0625247	0.00594936	
EFR4	G0	Flor	1	0.138815	1.00E-09	1.00E-09	0.232505	1.00E-09	0.0172718	0.162819	0.0187343	
EFR5	G0	Flor	1	0.0830871	0.0749788	0.00444781	0.0389669	0.0340283	0.0177299	0.0275099	0.0123721	
EFR6	G0	Flor	1	0.0550321	0.122409	0.0677489	0.136951	1.00E-09	0.00323881	0.0356103	0.0814639	
EFR7	G0	Flor	1	0.0724007	1.00E-09	1.00E-09	0.0901844	1.00E-09	0.050419	0.0258225	1.00E-09	
EFR8	G0	Flor	1	0.1	0.157643	0.0658947	0.0652311	0.0793318	0.0817529	0.054032	0.0706636	
EFR9	G0	Flor	1	0.0653697	0.0540052	0.0167933	0.0695468	0.038338	0.0589763	0.0998134	0.0060928	
EFR10	G0	Flor	1	0.0879012	0.121383	1.00E-09	0.0478857	1.00E-09	0.00556057	0.0417636	1.00E-09	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.0609571	1.00E-09	1.00E-09	0.0381146	1.00E-09	0.0703873	0.137078	0.0627706	
FCPR2	G1	Fruto	2	0.289203	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	0.0857231	1.00E-09	1.00E-09	0.0792771	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	0.26538	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0975285	1.00E-09	0.067369	0.0516361	1.00E-09	
FCHR2	G2	Fruto	3	0.147539	0.254044	0.12592	0.0935523	0.0835522	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	

FCHR3	G2	Fruto	3	0.45485	0.091483	0.0171575	0.115008	1.00E-09	0.0250558	0.0633335	0.0860827
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0782971	1.00E-09	1.00E-09	0.0412386	1.00E-09	0.0125286	0.019291	0.0123267
FMR1	G3	Fruto	4	0.0759314	0.031587	1.00E-09	0.0241343	0.0051410	0.0494805	0.0223352	0.00407366
FMR2	G3	Fruto	4	0.689476	0.018171	1.00E-09	0.0446599	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	0.178141	0.023548	1.00E-09	0.0736117	1.00E-09	0.0783889	0.0359018	1.00E-09
FMR4	G3	Fruto	4	0.772911	1.00E-09	1.00E-09	0.308548	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	12,434	0.376752	0.165551	0.196945	0.0895284	0.155824	0.193619	0.400615
FGR2	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.180677	0.12579	0.0590472	0.123171	0.127788
FGR3	G4	Fruto	5	0.193879	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	0.106292	0.278376	0.176722	0.0724114	0.12485	1.00E-09	0.0744634	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	0.802611	0.392099	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.566477	0.269588	0.0979106	0.166913	1.00E-09	0.121897	0.0888032	0.0729669
FGR7	G4	Fruto	5	0.293074	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	0.484847	0.541911	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	0.518968	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	0.752774	0.295442	0.0552114	0.0720463	0.115984	0.211778	0.0502816	0.450208
FGR11	G4	Fruto	5	0.635015	0.225727	0.0903792	0.178403	0.119344	0.0904794	0.121306	0.0815817
FGR12	G4	Fruto	5	0.573683	0.261438	0.156844	0.160614	0.0657096	0.0288572	0.0806784	0.0422768

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C77	C78	C79	C80	C81	C82	C83	C84
				Tiempo de retención	24.67	24.8	25.4	25.52	25.58	25.72	25.82	26.01
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez				1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	Eicosane, 1-iodo-	1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-		1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester
EFR1	G0	Flor	1	0.0318422	0.0779678	0.109426	0.0797315	0.0692978	0.0459645	0.294506	0.213771	
EFR2	G0	Flor	1	0.0274827	1.00E-09	0.102255	0.149549	0.140255	0.0776877	0.329201	0.251114	
EFR3	G0	Flor	1	0.0506773	0.0552572	0.228445	0.215141	0.136563	0.0662123	0.35512	0.282969	
EFR4	G0	Flor	1	0.0238953	0.0532054	0.0594602	0.133436	0.0866914	0.00579554	0.158667	0.161477	
EFR5	G0	Flor	1	0.0337522	1.00E-09	0.0662979	0.0365845	1.00E-09	1.00E-09	0.202145	1.00E-09	
EFR6	G0	Flor	1	0.0774154	0.136551	1.00E-09	0.0186786	0.0178967	1.00E-09	0.104768	1.00E-09	
EFR7	G0	Flor	1	1.00E-09	0.00310283	0.0715317	0.0784516	0.0748726	0.0519109	0.220595	0.13681	
EFR8	G0	Flor	1	0.217977	0.146064	0.130833	0.0717895	0.0798947	0.0646636	0.382636	1.00E-09	
EFR9	G0	Flor	1	0.0782463	0.133108	0.147829	0.0543686	0.0942275	1.00E-09	0.376138	0.391308	
EFR10	G0	Flor	1	0.051453	0.0578837	0.121953	0.0410596	0.0852119	1.00E-09	0.275276	1.00E-09	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.0287924	0.0608259	0.205806	0.764985	1.00E-09	0.426074	0.606962	0.598157	
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.373873	0.257238	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0753445	0.0807055	1.00E-09	0.142516	0.127527	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.0278697	0.051348	0.145326	0.0449472	0.0791446	0.0715913	0.432245	0.292562	
FCHR2	G2	Fruto	3	0.151285	0.102532	0.148238	0.0719148	0.0784455	0.0532479	0.325002	0.411343	

FCHR3	G2	Fruto	3	0.237374	1.00E-09	0.0998131	0.1382	0.101989	0.0332601	0.270054	0.234018
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0370173	0.0413327	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0750757	0.0581905
FMR1	G3	Fruto	4	0.0218691	0.0859664	0.106689	0.101497	0.130343	0.015493	0.26889	0.234366
FMR2	G3	Fruto	4	0.00087242	0.0514441	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.00297312	1.00E-09	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	0.060458	0.136989	0.129189	0.0692983	0.0508003	0.0448589	0.32824	0.279852
FMR4	G3	Fruto	4	0.365665	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.598599	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	148,052	0.540474	208,991	11,097	0.072563	0.425064	0.417813	0.0636986
FGR2	G4	Fruto	5	0.23718	0.0714833	0.232379	0.130244	0.179497	0.0839288	0.544735	1.00E-09
FGR3	G4	Fruto	5	0.137901	1.00E-09	0.188411	0.132764	1.00E-09	1.00E-09	0.505256	0.418743
FGR4	G4	Fruto	5	0.199069	0.0680694	0.154401	0.0594369	0.0835976	1.00E-09	0.385935	0.370773
FGR5	G4	Fruto	5	0.40449	0.490071	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.693802
FGR6	G4	Fruto	5	0.362034	0.145977	0.256052	0.163792	0.195271	0.072024	0.599264	0.852523
FGR7	G4	Fruto	5	0.215321	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.347847	0.36095
FGR8	G4	Fruto	5	0.273315	0.247111	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.44724	0.521388
FGR9	G4	Fruto	5	0.344976	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.425279	0.529481
FGR10	G4	Fruto	5	171,401	0.599772	239,474	109,043	1.00E-09	0.466429	0.441545	0.0223593
FGR11	G4	Fruto	5	0.301401	0.242271	0.152271	0.0979088	0.0913308	0.071615	0.420155	0.515337
FGR12	G4	Fruto	5	0.345395	0.31263	0.112395	0.0485846	0.0589749	0.0111144	0.267932	1.00E-09

Cuadro 1. Continuación.

			Compuesto	C85	C86	C87	C88	C89	C90	C91	C92
			Tiempo de retención	26.28	26.53	27.36	27.94	28.49	28.67	29.03	29.34
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester						
EFR1	G0	Flor	1	0.129054	0.202701	1.00E-09	0.0714746	1.00E-09	0.0118835	1.00E-09	0.00747212
EFR2	G0	Flor	1	0.155514	0.202892	1.00E-09	0.0161068	0.0393273	1.00E-09	0.00162302	0.0146565
EFR3	G0	Flor	1	0.185579	0.236138	1.00E-09	0.0358705	0.0262439	0.0131655	0.0323214	0.0227614
EFR4	G0	Flor	1	1.00E-09	0.231513	0.0401699	0.0355951	0.0188672	0.0222455	1.00E-09	1.00E-09
EFR5	G0	Flor	1	0.107412	0.137361	0.0168914	0.0590178	0.00121164	0.0307308	0.0290897	0.044018
EFR6	G0	Flor	1	0.0550265	0.103409	0.043663	0.0796171	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
EFR7	G0	Flor	1	0.128085	0.16228	1.00E-09	0.0104036	0.00307506	0.0148198	0.00793166	0.0189106
EFR8	G0	Flor	1	0.180636	0.22859	0.0266316	0.0429703	1.00E-09	0.0364256	0.0205217	0.0175332
EFR9	G0	Flor	1	0.182829	0.233097	0.0463152	0.0303249	1.00E-09	1.00E-09	0.0142808	1.00E-09
EFR10	G0	Flor	1	0.137053	0.145587	0.0583899	0.0764083	1.00E-09	1.00E-09	0.0140477	0.00576622
FCPR1	G1	Fruto	2	0.560359	0.314216	1.00E-09	0.0512799	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.00467654
FCPR2	G1	Fruto	2	0.212183	0.317669	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.111715	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCHR1	G2	Fruto	3	0.20913	0.23849	1.00E-09	0.0482552	0.0547712	0.0615215	1.00E-09	0.0237626
FCHR2	G2	Fruto	3	0.140728	0.17422	1.00E-09	0.0854705	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09

FCHR3	G2	Fruto	3	0.171969	0.27511	1.00E-09	0.168771	1.00E-09	1.00E-09	0.0679905	0.0106367
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0370114	0.0547358	0.00213516	0.0345665	1.00E-09	0.0150618	1.00E-09	1.00E-09
FMR1	G3	Fruto	4	0.147416	0.192651	0.0217573	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.00502449	0.00542533
FMR2	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0644443	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	0.21868	0.233539	1.00E-09	0.113447	1.00E-09	0.0298103	1.00E-09	1.00E-09
FMR4	G3	Fruto	4	0.350967	0.303714	1.00E-09	0.22371	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	0.0341938	0.492762	1.00E-09	0.124956	0.0237678	141,866	0.547786	1.00E-09
FGR2	G4	Fruto	5	0.267815	0.440066	0.0671882	0.105008	1.00E-09	1.00E-09	0.0160699	0.0171443
FGR3	G4	Fruto	5	0.315772	0.356897	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	0.141323	0.285046	1.00E-09	0.0851414	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.38429	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.186835	0.379756	0.0961177	0.322697	0.0177149	0.0596664	0.0099075	1.00E-09
FGR7	G4	Fruto	5	0.199884	0.260735	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.292177	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.378186	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.574604	1.00E-09	0.303158	0.734963	0.316499	0.296198	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	0.201753	0.30114	0.197619	0.211552	1.00E-09	1.00E-09	0.0835021	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	0.120943	0.251268	0.109254	0.165988	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C93	C94	C95	C96	C97	C98	C99	C100
				Tiempo de retención	29.68	29.86	29.95	30.46	30.78	30.95	31.28	31.54
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez		Phthalic acid, cyclobutyl tridecyl ester	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl ester						
EFR1	G0	Flor	1	0.0319496	0.122714	0.017976	0.026014	0.0344486	1.00E-09	0.0844527	0.030252	
EFR2	G0	Flor	1	0.105516	0.048725	0.0285927	0.0763952	0.0424303	1.00E-09	0.115727	0.0279958	
EFR3	G0	Flor	1	0.0772237	0.0989337	1.00E-09	555,363	0.0283159	1.00E-09	0.00397479	0.0475538	
EFR4	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.156885	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0364291	0.0421582	
EFR5	G0	Flor	1	0.0326428	1.00E-09	0.0527142	0.0134661	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.00179957	
EFR6	G0	Flor	1	1.00E-09	0.243682	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0052187	0.00682147	
EFR7	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0713572	0.0585927	0.0394163	0.0126176	0.0581721	1.00E-09	0.01824	
EFR8	G0	Flor	1	0.0748055	0.104618	0.0446773	0.883538	0.0334142	0.0495835	0.0687002	0.0196018	
EFR9	G0	Flor	1	0.0842852	0.147071	0.0264261	1.00E-09	0.0313658	1.00E-09	1.00E-09	0.0669311	
EFR10	G0	Flor	1	0.103159	0.0351273	0.0461456	0.0413681	0.00764874	0.0538339	0.016658	0.0359341	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.00708426	0.0898189	0.0592825	0.105986	1.00E-09	1.00E-09	0.113726	0.0430149	
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.0792829	0.058421	0.0381738	0.151865	0.0403791	0.105627	0.102285	0.0590972	

FCHR2	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0585087	1.00E-09	1.00E-09
FCHR3	G2	Fruto	3	0.0697888	0.268376	1.00E-09	0.0366872	0.0275427	0.0426615	1.00E-09	0.00738992
FCHR4	G2	Fruto	3	0.00690153	0.146528	1.00E-09	0.0215653	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0092955
FMR1	G3	Fruto	4	0.0194315	1.00E-09	0.0272618	0.044498	0.0224051	0.0133443	1.00E-09	0.0171103
FMR2	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.459163	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.164279	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	0.119928	107,888	1.00E-09	0.0568318	1.00E-09	0.176006	0.326366	0.157078
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.285957	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	0.239132	0.468196	134,708	486,152	1.00E-09	0.0491446	0.250804	0.297728
FGR2	G4	Fruto	5	0.078107	0.191649	0.147811	0.0824784	0.111524	0.113418	0.121575	0.077845
FGR3	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.178863	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	0.0698062	0.0812369	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.123016	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.0197221	0.243366	0.0483946	1.00E-09	1.00E-09	0.0877889	0.0620094	0.0361656
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.849679	594,197	1.00E-09	0.276433	0.0451809	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	0.0875608	0.567646	1.00E-09	1.00E-09	0.0698364	0.00618734	0.117991	0.0811624
FGR12	G4	Fruto	5	0.0613761	0.144691	0.0335601	0.0266928	0.00965348	0.0293096	0.0217115	1.00E-09

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C101	C102	C103	C104	C105	C106	C107	C108
				Tiempo de retención	33.55	33.98	34.2	34.41	34.54	34.84	34.97	35.25
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez									
EFR1	G0	Flor	1	0.0287526	1.00E-09	0.0750434	0.0652829	0.140549	0.0543288	140,602	0.11152	
EFR2	G0	Flor	1	0.0523558	1.00E-09	0.0464656	0.0697256	0.0757391	0.126709	121,937	0.122979	
EFR3	G0	Flor	1	48,704	0.0309315	0.0222178	0.097749	0.108519	0.0248488	0.777443	0.138461	
EFR4	G0	Flor	1	0.0183596	0.0512473	1.00E-09	0.0944571	0.133443	0.0374081	119,953	0.109505	
EFR5	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0436959	1.00E-09	0.142846	
EFR6	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0247237	1.00E-09	0.013765	0.00565683	0.00856289	0.174097	0.0279902	
EFR7	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0319647	0.0781659	1.00E-09	0.697696	0.0955846	
EFR8	G0	Flor	1	0.721309	1.00E-09	0.0524668	1.00E-09	0.172911	0.058476	0.205167	0.149995	
EFR9	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0576259	0.0787622	0.0802024	0.00566209	1.00E-09	0.115516	0.13995	
EFR10	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.0390268	0.0738772	1.00E-09	0.0361951	0.103618	0.133367	
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	0.110176	0.150521	0.16141	0.127223	0.493591	0.301421	
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.771428	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0303403	0.0493527	1.00E-09	0.471721	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.546517	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.0280694	0.095473	0.0856913	0.110049	0.0673459	0.840769	0.166523	
FCHR2	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	0.0592979	0.0532388	0.0910579	1.00E-09	0.106609	0.0876384	

FCHR3	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.0453562	1.00E-09	0.0413496	0.0786764	1.00E-09	0.930302	0.114795
FCHR4	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	0.0192125	0.00843281	0.0214418	0.00265082	0.378732	0.0261003
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.0241483	1.00E-09	0.0553813	1.00E-09	0.0338477	0.0180658	0.108148
FMR2	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.151434	1.00E-09	0.152295	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.00429341	0.0926869	0.0545199	0.080674	0.044572	0.524439	0.118841
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	175,269	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.7005	0.240918	241,719	0.989345	1.00E-09	0.209204
FGR2	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.0379755	0.135249	0.0250778	0.0561599	0.136859	0.339339	0.224308
FGR3	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.121953	1.00E-09	0.916126	0.212477
FGR4	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0526891	0.0514991	0.089567	0.115658	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0867531	0.0612093	0.108925	0.0797886	0.205864
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	578,226	0.138891	0.516296	1.00E-09	543,463	105,478	1.00E-09	0.814461
FGR11	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.0548753	1.00E-09	1.00E-09	0.0769041	1.00E-09	0.204875	0.114055
FGR12	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0745362	0.0579202	1.00E-09	0.141619	0.0796862

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C109	C110	C111	C112	C113	C114	C115	C116
				Tiempo de retención	35.39	35.66	35.88	36.05	36.15	37.27	37.7	38.46
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Hydrazine-carboxamide								
EFR1	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.103404	0.0645849	1.00E-09	161,306	0.0857497	0.088261	
EFR2	G0	Flor	1	0.0022742	0.0164127	0.0778554	0.0252135	1.00E-09	188,373	0.148834	0.0486461	
EFR3	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.0570985	511,324	0.0817678	133,716	0.180045	0.0534365	
EFR4	G0	Flor	1	0.0515979	1.00E-09	1.00E-09	0.0842197	1.00E-09	0.86188	0.135975	0.0225537	
EFR5	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.0446775	1.00E-09	1.00E-09	1,031	0.819092	1.00E-09	
EFR6	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0019688	0.0346065	1.00E-09	1.00E-09	111,005	0.0391597	1.00E-09	
EFR7	G0	Flor	1	0.0193193	1.00E-09	0.0443403	1.00E-09	1.00E-09	0.879898	0.32959	0.0326868	
EFR8	G0	Flor	1	0.041611	1.00E-09	0.0563066	0.829295	0.133263	440,199	0.267327	0.0598535	
EFR9	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09	0.0737417	1.00E-09	0.0184848	162,579	0.0918945	0.0317113	
EFR10	G0	Flor	1	0.0079888	0.0363533	0.0621708	1.00E-09	1.00E-09	153,637	0.0984924	1.00E-09	
FCPR1	G1	Fruto	2	0.0934459	1.00E-09	0.16577	1.00E-09	0.164042	0.76047	0.221225	0.157436	
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.712395	1.00E-09	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0306657	0.434781	0.0617293	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.635369	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	0.0368522	0.0340898	0.0628124	0.0214497	1.00E-09	160,779	0.0662125	0.0734316	
FCHR2	G2	Fruto	3	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	317,118	0.107045	0.0512796	

FCHR3	G2	Fruto	3	0.0184092	0.0260779	0.0440279	0.026466	1.00E-09	140,539	0.116216	1.00E-09
FCHR4	G2	Fruto	3	0.00433503	1.00E-09	0.0174244	1.00E-09	0.0128992	436,379	0.0368663	1.00E-09
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.0274483	0.0274063	1.00E-09	1.00E-09	194,507	0.0511538	0.0367608
FMR2	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.00866107	1.00E-09	1.00E-09	0.361515	0.0995936	0.637905	1.00E-09
FMR3	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.0140278	0.0652418	1.00E-09	0.0516843	0.507319	0.182111	1.00E-09
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.461996	262,151	145,817	1.00E-09
FGR1	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.0826698	43,628	1.00E-09	653,689	1.00E-09	1.00E-09
FGR2	G4	Fruto	5	0.0354332	0.127191	0.106157	1.00E-09	0.0384366	378,546	0.22607	0.0816432
FGR3	G4	Fruto	5	0.132065	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	146,704	0.168887	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	209,279	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.0821815	1.00E-09	1.00E-09	337,153	0.0668381	1.00E-09
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.878354	1.00E-09	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	116,266	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	258,703	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	596,052	101.94	383,966	129,849	0.0901909
FGR11	G4	Fruto	5	0.0856926	0.0348741	1.00E-09	0.0490872	1.00E-09	258,116	0.0905245	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	0.0601522	1.00E-09	1.00E-09	29,709	0.20688	0.0468984

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C117	C118	C119	C120	C121	C122	C123	C124
				Tiempo de retención	38.72	39.01	39.13	39.65	39.79	40.46	41.73	41.99
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez	Diethylene glycol dibenzoate			Tetradecane, 1-iodo-		Phthalic acid, di(2-propylpentyl) iodo-ester	Decane, 1-iodo-	Dodecane, 1-iodo-	
EFR1	G0	Flor	1	0.0784304	0.00182982		0.0421479	0.046551	0.267249	0.147811	0.103887	0.11824
EFR2	G0	Flor	1	0.086449	1.00E-09		0.223794	0.0397861	0.454514	0.387398	0.428471	0.101017
EFR3	G0	Flor	1	0.101631	0.0341934		0.172803	0.0666123	0.151632	0.195401	0.178835	537,087
EFR4	G0	Flor	1	0.168862	0.0208313		0.111118	0.0745443	0.378004	0.169183	0.146121	0.0605057
EFR5	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0658684		0.153378	1.00E-09	0.893166	1.00E-09	0.769731	1.00E-09
EFR6	G0	Flor	1	0.0876753	1.00E-09		0.0484324	1.00E-09	0.175373	0.0629461	0.0302585	0.0456928
EFR7	G0	Flor	1	1.00E-09	1.00E-09		0.0865023	1.00E-09	0.124982	0.136409	0.124403	0.0522283
EFR8	G0	Flor	1	0.174215	1.00E-09		0.199725	1.00E-09	0.373849	0.221991	0.187446	101,389
EFR9	G0	Flor	1	0.157924	1.00E-09		1.00E-09	1.00E-09	249,922	0.0923835	0.0812478	0.0928277
EFR10	G0	Flor	1	0.201707	1.00E-09		1.00E-09	1.00E-09	0.318993	0.128312	0.00654138	0.133738
FCPR1	G1	Fruto	2	0.200134	0.0526304		0.193567	1.00E-09	1.00E-09	0.368706	0.325729	0.0874189
FCPR2	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09		1.00E-09	1.00E-09	0.231569	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCPR3	G1	Fruto	2	0.0942122	1.00E-09		0.106634	1.00E-09	0.466622	0.0556269	0.107095	1.00E-09
FCPR4	G1	Fruto	2	0.372748	1.00E-09		1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FCHR1	G2	Fruto	3	0.0329564	1.00E-09		0.034743	0.11559	1.00E-09	0.0856414	0.0341551	0.152442
FCHR2	G2	Fruto	3	0.195926	1.00E-09		0.0965727	1.00E-09	1.00E-09	0.166234	0.2072	1.00E-09

FCHR3	G2	Fruto	3	0.0637544	1.00E-09	0.0894005	1.00E-09	0.512626	0.215811	0.180091	0.0717401
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0323568	1.00E-09	0.0442855	1.00E-09	0.0600727	0.0759051	0.0896748	0.023424
FMR1	G3	Fruto	4	0.203114	1.00E-09	0.067015	1.00E-09	1.00E-09	0.135913	0.0927247	0.168815
FMR2	G3	Fruto	4	0.123321	1.00E-09	0.716372	1.00E-09	0.313159	110,571	211,492	0.0103026
FMR3	G3	Fruto	4	1.00E-09	1.00E-09	0.197357	1.00E-09	0.591322	0.160394	0.25184	0.0778251
FMR4	G3	Fruto	4	0.92192	1.00E-09	267,259	1.00E-09	0.53576	421,661	541,309	241,968
FGR1	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR2	G4	Fruto	5	0.161904	1.00E-09	0.133859	1.00E-09	0.713671	0.217274	0.248259	0.222482
FGR3	G4	Fruto	5	0.14539	1.00E-09	0.213669	1.00E-09	0.40396	0.330826	0.317311	0.164324
FGR4	G4	Fruto	5	0.198232	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.0622158	1.00E-09	0.076406
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.169027	1.00E-09	1.00E-09	0.0239866	1.00E-09	0.0704668	0.0859459	0.101775
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.269105	1.00E-09	0.201412	1.00E-09
FGR8	G4	Fruto	5	0.344446	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.319363	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.454497	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	182,032	1.00E-09	989,506	1.00E-09	0.457198	0.131537	0.0772464	0.0663651
FGR11	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	0.457197	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	0.0919879	1.00E-09	0.0836399	1.00E-09	0.492819	0.129502	1.00E-09	0.0256568

Cuadro 1. Continuación.

				Compuesto	C125	C126	C127	C128	C129
				Tiempo de retención	42.31	42.68	42.95	43.32	43.68
Identificador	Fenología	Órgano	Madurez		Heptacosane	Eicosane, 1-iodo-			
EFR1	G0	Flor	1	0.178327	0.269137	0.0680628	0.233515	0.105741	
EFR2	G0	Flor	1	0.0618177	0.284388	0.416104	0.232782	1.00E-09	
EFR3	G0	Flor	1	1.00E-09	0.22007	0.154888	0.185958	476,646	
EFR4	G0	Flor	1	0.0265604	0.864726	0.170083	0.195646	1.00E-09	
EFR5	G0	Flor	1	424,391	1.00E-09	0.634712	0.351965	0.419842	
EFR6	G0	Flor	1	1.00E-09	0.0870264	0.0698729	0.0801606	0.0117851	
EFR7	G0	Flor	1	0.107028	0.135179	0.133759	0.127252	1.00E-09	
EFR8	G0	Flor	1	1.00E-09	0.121355	0.107579	0.35757	0.930824	
EFR9	G0	Flor	1	0.153015	0.418573	0.1116	258,716	0.100607	
EFR10	G0	Flor	1	0.398613	0.373309	0.161763	0.349968	1.00E-09	
FCPR1	G1	Fruto	2	1.00E-09	490,122	0.219689	0.207118	1.00E-09	
FCPR2	G1	Fruto	2	0.17027	1.00E-09	1.00E-09	0.184258	1.00E-09	
FCPR3	G1	Fruto	2	1.00E-09	0.12043	0.0852258	0.228221	1.00E-09	
FCPR4	G1	Fruto	2	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	
FCHR1	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.145814	0.0734739	0.216979	0.125118	
FCHR2	G2	Fruto	3	1.00E-09	0.361093	0.194919	0.300984	0.0769353	

FCHR3	G2	Fruto	3	0.0372557	0.251525	0.215598	0.702414	0.109592
FCHR4	G2	Fruto	3	0.0139638	0.060408	0.0928256	0.0990605	0.021981
FMR1	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.265911	0.168484	0.348382	0.243147
FMR2	G3	Fruto	4	0.079528	1.00E-09	415,547	0.372805	0.3316
FMR3	G3	Fruto	4	0.0833395	1.00E-09	0.188176	0.49145	0.130036
FMR4	G3	Fruto	4	1.00E-09	0.473242	526,396	0.27375	273,824
FGR1	G4	Fruto	5	0.251909	314,998	239,207	0.0130572	1.00E-09
FGR2	G4	Fruto	5	0.10486	0.227294	0.219934	0.379511	0.22305
FGR3	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.526016	0.30106	0.2122	1.00E-09
FGR4	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.462328	0.065149	0.56676	0.0938768
FGR5	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.363251	1.00E-09	0.76706	1.00E-09
FGR6	G4	Fruto	5	0.129505	0.265595	0.0617308	0.461481	1.00E-09
FGR7	G4	Fruto	5	1.00E-09	0.470433	0.198257	1.00E-09	0.184769
FGR8	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	124,036	1.00E-09
FGR9	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	111,053	1.00E-09
FGR10	G4	Fruto	5	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09	1.00E-09
FGR11	G4	Fruto	5	0.047228	1.00E-09	0.114444	0.265185	1.00E-09
FGR12	G4	Fruto	5	383,741	1.00E-09	0.00850689	0.291367	0.121669